UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Padronização de cultura de pele humana para avaliação de
toxicidade e eficácia de produtos cosméticos**

Cláudio de Jesus Ribeiro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof.^a Dr.^a Mitsuko Taba Ohara

São Paulo
2003

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Ribeiro, Claudio de Jesus
R484p² Padronização de cultura de pele humana para avaliação de
toxicidade e eficácia de produtos cosméticos / Claudio de
Jesus Ribeiro. -- São Paulo, 2003.
80p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Ohara, Mitsuko Taba

1. Cosméticos : Segurança : Tecnologia 2. Análise
toxicológica : Sistema de qualidade I. T. II. Ohara,
Mitsuko Taba, orientador.

668.55 CDD

Claudio de Jesus Ribeiro

Padronização de cultura de pele humana para avaliação de
toxicidade e eficácia de produtos cosméticos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Mitsuko Taba Ohara
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedico este trabalho a todos os bons professores que, com seus ensinamentos, contribuíram para minha formação profissional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo Ribeiro e Maria Anita Ribeiro, por sempre terem me encorajado nos estudos.

Aos meus irmãos

As professoras Mitsuko Taba Ohara por ter me aceito como orientado, Gláucia Santelli pelo apoio inicial, Eliana Parisi, Marisa Roma Herson e, especialmente, a professora Patrícia Gama, cuja ajuda foi de fundamental importância para que este projeto pudesse ser realizado.

Aos colegas do ICB Jean, Daniela, Ana, Eunice, Luciana Jordão e Luciana Harumi.

Aos colegas da FCF Luciana Scotti, Renata, Daclé e Luciana Meneghelli.

Aos técnicos de laboratório Junior (ICB), Raphael (ICB) e Silvana Altran (HC-FM).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
ABREVIATURAS E SIGLAS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. LEGISLAÇÃO	3
2.1.1. Definição de cosmético	3
2.1.2. Avaliação de eficácia e segurança dos produtos cosméticos	4
2.1.3. Uso de animais em avaliações de produtos cosméticos	5
2.2. PELE HUMANA	7
2.2.1. Epiderme	7
2.2.2. Derme	11
2.3. SISTEMA PIGMENTAR CUTÂNEO	13
2.3.1. Melanócito	13
2.3.2. Melanogênese e Melanina	14
2.3.3. Melanossomas	19
2.4. CULTURA DE PELE	21
3. OBJETIVO	25

4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. MATERIAIS	26
4.1.1. Fragmentos de pele	26
4.1.2. Meios de cultura	26
4.1.3. Reagentes e solventes	26
4.1.4. Equipamentos	27
4.1.5. Outros materiais	28
4.2. MÉTODOS	28
4.2.1. Preparação das soluções	28
4.2.2. Preparo das amostras de pele	31
4.2.3. Definição do meio e condições de cultura	31
4.2.4. Influência do tamanho do fragmento	32
4.2.5. Avaliação da influência do soro fetal bovino (SFB), TGF- α e ácido retinóico na manutenção do tecido em cultura.	32
4.2.6. Avaliação da influência da luz ultravioleta (UV) na manutenção dos fragmentos de pele em cultura e atividade dos melanócitos	33
4.2.7. Análise morfológica do tecido	34
4.2.8. Análise do pigmento de melanina	35
4.2.9. Análise de melanócitos DOPA-positivos	36
5. RESULTADOS	37
5.1. Definição do meio e condições de cultura	37
5.2. Influência do tamanho do fragmento	49
5.3. Influência do Soro Fetal Bovino (SFB) e TGF- α na cultura	40
5.4. Influência do ácido retinóico	41

5.5. Análise do pigmento de melanina	41
5.6. Análise de melanócitos DOPA positivos	44
5.7. Avaliação da influência da luz ultravioleta (UV) na manutenção dos fragmentos de pele em cultura e atividade dos melanócitos	46
 6. DISCUSSÃO	 49
 7. CONCLUSÕES	 63
 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 64

LISTADE FIGURAS

	pg.
FIGURA 1	12
FIGURA 2	17
FIGURA 3	20
FIGURA 4	24
FIGURA 5	36
FIGURA 6	41
FIGURA 7	42
FIGURA 8	43
FIGURA 9	45
FIGURA 10	46
FIGURA 11	47
FIGURA 12	48
FIGURA 13	49
FIGURA 14	50
FIGURA 15	51

ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEE: Comunidade Econômica Européia
CONEP: Comissão Nacional de Ética na Pesquisa
COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DHICA: Ácido carboxílico 5,6 dihidroxiindol
DMEM: Meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
FDA: Food and Drug Administration
HE: Hematoxilina e eosina
HC-USP: Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo
12-HETE: 12-hidroxeicosatetrenóico
15-HETE: 15-hidroxeicosatetrenóico
13-HODE: 13-hidroxiocetadecadienóico
ICB-USP: Instituto Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
IL: Interleucina
IM: Índice de mitose
INCI: International Nomenclature Cosmetics Ingredients
MEM: Meio essencial mínimo
mL: Mililitro
MSH: Hormônio Melanócito Estimulante
OCT: Oxacalcitriol
OTC: Over the Counter
PGE2: Prostaglandina E2
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
SFB: Soro fetal bovino
TGF- α : Transforming growth factor-alfa
TRP: Proteína relacionada a tirosinase
UV: Ultravioleta
UVA: Ultravioleta A
UVB: Ultravioleta B

RESUMO

A legislação brasileira para cosméticos exige que os apelos mercadológicos desses produtos sejam comprovados. Os testes *in vivo* utilizando animais para avaliação desta categoria de produtos ou os princípios ativos nela contidos são, atualmente, bastante criticados. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um modelo de cultura de pele humana e avaliar a viabilidade dos melanócitos durante o período de 7 dias. A manutenção do tecido foi avaliada pela observação microscópica após coloração com HE e Masson, os melanócitos ativos pela reação de DOPA e a melanina pela coloração Fontana-Masson. Fragmentos de pele com 2mm² mantidos em meio de Leibovitz à temperatura ambiente e atmosfera com 95% de ar e 5% de CO₂, sofreram menos alterações morfológicas comparados aos mantidos em DMEM à temperatura de 37°C, 5% de CO₂, 40% de O₂ e 55% de N₂. Fragmentos com 20mm² mantidos em Leibovitz apresentaram alterações semelhantes aos de 2mm². Células em divisão foram observadas em amostras de pele mantidas em Leibovitz enriquecido com SFB e ácido retinóico. A presença de melanina foi verificada durante todo o período de cultura, bem como a dos melanócitos, que se mostraram DOPA reativos. A radiação UVA/UVB, empregada com a finalidade de verificar se os melanócitos sofriam alguma alteração na atividade e morfologia, não provocou qualquer mudança nestas células, por outro lado induziu uma redistribuição da melanina nos queratinócitos dos fragmentos irradiados. Os resultados obtidos mostraram que é possível manter pele humana em cultura por 7 dias, bem como a viabilidade dos melanócitos e sugere ser possível a aplicação do modelo estudado em futuros ensaios de eficácia e segurança de produtos tópicos.

ABSTRACT

The Brazilian law for cosmetics demands that the marketing of these products should be proofed. The tests *in vivo* utilizing animals for evaluation of this category of products or the active components in it, are very criticized nowadays. The present work had as an objective to develop a model of culture of human skin, and evaluate the viability of the melanocytes during a period of 7 days. The maintenance of the tissue was evaluated by the microscopic observation after coloring with HE and Masson, the active melanocytes by the DOPA reaction and the melanin by coloring of Fontana-Masson. Fragments of skin with 2mm² kept in Leibovitz at room temperature and atmosphere with 95 % of air and 5 % of CO₂, presented less morphologic alterations than the ones kept in DMEM at the temperature of 37, 5% of CO₂, 40% of O₂ and 55% of N₂. Fragments with 20mm² kept in Leibovitz presented similar alterations to the 2mm². Mitotic cells were observed in samples of skin kept in enriched Leibovitz with FBS and retinoic acid. The presence of melanin was verified through all of the period of culture as well as the melanocytes that were DOPA-reactive. The radiation UVA/UVB, used with the aim of verifying if the melanocytes presented any alteration in the activity and morphology, didn't provoke any changes in the cells, on the other hand it induced a redistribution of the melanin in the keratinocytes of the irradiated fragments. The results obtained showed that it is possible to keep the human skin in culture for 7 days as well as the viability of melanocytes, and suggests the possibility of application of the studied model in future research on the efficacy and the safety of topic products.

1. INTRODUÇÃO

Produtos cosméticos devem ser seguros ao usuário e apresentarem eficácia quanto à atividade declarada. Constantemente, a indústria cosmética lança novos produtos com diversificados apelos de atividade. Desta forma, espera-se que testes comprovando os apelos de marketing e a segurança desses produtos sejam realizados.

Os testes deveriam ser conduzidos em humanos, todavia nem sempre isso é possível, pois ainda se desconhece o potencial de reação adversa que possa vir a ser causada pelos novos produtos. A segunda preferência é a realização de testes em animais, entretanto, há restrições para a utilização deste modelo. Cientificamente, há diferenças bioquímicas e estruturais significativas entre as peles de animais e de seres humanos e, conseqüentemente, extrapolações de resultados podem não ser precisas (MAJMUDAR & SMITH, 1998). Além disto, tem havido grande pressão para a redução e a substituição de animais de laboratório por outros modelos (MAJMUDAR & SMITH, 1998, PONEC et al. 2000).

Face a esses problemas, as técnicas *in vitro* passaram a ser uma necessidade e são utilizadas para a seleção de matérias primas no desenvolvimento de produtos cosméticos e dermatológicos. Os modelos *in vitro* utilizando cultura de células e pele equivalente têm provado sua utilidade para verificar a segurança e eficácia, além da escolha de matérias primas ativas mais adequados (MAJMUDAR & SMITH, 1998).

As culturas celulares em monocamadas são ferramentas úteis para a seleção de muitos compostos ativos, porém nestes modelos, há ausência da estrutura pluriestratificada da pele e da camada córnea que modula a absorção de produtos aplicados *in vivo*. Outra limitação deste tipo de cultura é a sua aplicação na avaliação de produtos cosméticos não aquosos. Lipídios ou produtos sólidos não podem ser colocados em contato direto com a cultura de células, devido à solubilidade no meio. Além disso, os componentes testados podem apresentar várias interações com o meio de cultura (MELONI et al., 1995; DAMOUR et al., 1998).

Com a evolução dos métodos de cultura de células em monocamadas e devido as suas limitações, houve a necessidade de criar um modelo de pele mais real e que se pudesse aproximar ao máximo da pele que se observa ao natural, ou seja, uma estrutura de múltiplas camadas, onde uma superfície está exposta à atmosfera e a outra é servida por complexo de capilares e nervos. O progresso principal foi conquistado com a integração de células em estruturas tridimensionais, formando a pele equivalente ou reconstituída (SHROOT, 1992), ou seja, um modelo de pele semelhante a humana com a derme e todas as camadas da epiderme. Todavia a pele equivalente também apresenta limitações, pois não tem os anexos cutâneos e é mais porosa que a pele humana (AUGER et al., 1998).

A cultura de pele pode ser uma alternativa adequada para avaliação de produtos cosméticos para os quais a aplicação de outras técnicas ainda é falha. Esta técnica permite contornar os problemas apresentados pelos modelos em cultura de células em monocamadas e pele equivalente, além de ser um método rápido.

As análises biológicas em cultura de pele são de grande valia para os estudos de princípios ativos e produtos cosméticos, pois podem fornecer resultados preliminares sobre a eficácia dos mesmos, após os quais passariam para os testes *in vivo* utilizando animais e/ou humanos. Isto vem de encontro a atual situação das avaliações de eficácia que procuram minimizar ao máximo e, se possível, abolir as metodologias *in vivo* utilizando animais de laboratório.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Legislação

2.1.1 Definição de Cosmético.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em sua Resolução RDC nº 79, de 28 de agosto de 2000, e a 6ª emenda da Diretiva 76/768 da Comunidade Econômica Européia (CEE) definem: “produtos cosméticos, produtos de higiene e perfumaria como sendo preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado” (MASSON, 1999, RDC nº 79/00). Para o Food and Drug Administration (FDA) “cosméticos são produtos que, quando aplicados no corpo humano, limpam, embelezam, promovem atração ou alteram a aparência da pele, sem afetar a sua estrutura ou função”. Segundo a mesma agência, produtos considerados cosméticos, mas que tratam ou previnem doenças ou, ainda, afetam a estrutura ou função da pele humana são considerados como drogas e devem seguir o estatuto de medicamento..São os conhecidos como “Over the Counter” (OTC) e integram a maioria dos produtos considerados cosméticos na Europa e Brasil (MASSON, 1999; FDA, 1999).

No Brasil e em outros países é comum, quando um produto cosmético afeta de maneira considerável a estrutura da pele, denominá-lo de cosmecêutico, termo criado por Kligman há 20 anos atrás (KLIGMAN, 2002). No entanto, não existe em nossa legislação nenhuma definição para este termo, bem como nos Estados Unidos, onde o FDA não reconhece o termo cosmecêutico, enquadrando os produtos tópicos em medicamentos, cosméticos ou combinação dos dois (FDA, 1999).

2.1.2 Avaliação de Eficácia e Segurança dos Produtos Cosméticos

Os componentes de um produto cosmético devem estar descritos nos compêndios técnicos da “International Nomenclature Cosmetics Ingredients” (INCI) garantindo, assim, maior segurança. Não devem apresentar nenhum risco à saúde humana nas condições de uso preconizadas ou, razoavelmente previsíveis (ingestão/aplicação acidental) (MASSON, 1999).

Diferente da União Européia, para a qual os cosméticos pertencem a uma única categoria de produtos (MASSON, 1999), no Brasil, a RDC 335/99 classifica os produtos cosméticos, de higiene e perfumaria quanto ao grau de risco que representam à saúde humana correlacionado com a sua segurança de uso em duas categorias gerais de produtos, a saber: produtos com risco mínimo (grau 1) e produtos com risco potencial (grau 2) (RDC 355/99). A mesma classificação é mantida pela RDC 79/00 (RDC 79/00). O grau de risco é o nível de efeitos adversos que cada tipo de produto pode ou não oferecer considerando sua formulação, finalidade e modo de uso. Os critérios para esta classificação foram definidos considerando a finalidade de uso do produto, áreas do corpo abrangidas, modo de usar e cuidados a serem observados quando de sua utilização (RDC nº 335/99, RDC nº 79/00).

Os produtos classificados como grau 1 devem ser notificados à ANVISA, com antecedência mínima de 30 dias à sua comercialização no mercado brasileiro, não necessitando de registro. Estes produtos não podem conter em sua composição filtros solares, substâncias que constem da lista de componentes proibidos em cosméticos e as substâncias de uso restrito, específicas para produtos classificados como Grau de Risco 2, relacionadas no anexo XV da Portaria 71/96 e suas atualizações. O rótulo destes produtos deverá estar de acordo com o estabelecido nos artigos 93 e 94 do Decreto 79.094/77, alterado pelo Decreto 83.239/79, no Anexo XVII da Portaria 71/96 e suas atualizações e deverá constar ainda: Resolução (Res.) ANVS nº 335/99 e o número da Autorização de Funcionamento da empresa junto ao Ministério da Saúde (RDC nº 335/99).

Os produtos classificados como grau 2 são aqueles com indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados quanto ao modo e restrições de uso. Estes produtos só podem ser comercializados após registro e, para tal, é exigida a apresentação dos resultados das avaliações de segurança e eficácia (RDC nº 335/99).

A resolução 335/99 em seu artigo 4º determina: "O fabricante ou importador deverá possuir dados comprobatórios que atestem a qualidade, segurança e eficácia de seus produtos e a idoneidade dos respectivos dizeres do rótulo, os quais deverão ser apresentados aos órgãos de vigilância sanitária, sempre que solicitados ou por ocasião das inspeções" (RDC nº 335/99). Isto obriga os fabricantes de produtos cosméticos a avaliarem seus produtos quanto à eficácia, segurança e qualidade, seja em qual for a categoria que os mesmos se enquadrem.

Nos Estados Unidos da América, o FDA não exige, mas incentiva os fabricantes de cosméticos a realizarem qualquer teste que demonstre que seus produtos são seguros para uso. Os fabricantes de cosméticos, nesse país, assim como no Brasil, são responsáveis pela segurança dos produtos fabricados. Os cosméticos americanos que não tenham sido testados adequadamente quanto à segurança devem conter no rótulo: "WARNING-The safety of this product has not been determined" (FDA, 2002).

2.1.3 Uso de Animais em Avaliações de Produtos Cosméticos

A avaliação da segurança e eficácia de produtos tópicos é realizada, com frequência, em modelos experimentais utilizando animais como cobaias, coelhos, camundongos e ratos. No entanto, esta prática científica tornou-se polêmica nos últimos anos. O fato de não realizar experimentos com animais é responsável até por apelos cosméticos como "CRUELTY-FREE" ou "NOT TESTED ON ANIMALS", colocados nos rótulos de produtos cosméticos em países como nos Estados Unidos.

Na Europa, o uso de animais com o propósito de pesquisas, produção de vacinas e especialmente para o teste de produtos permanece um problema sensível. Há um movimento no sentido de extinguir o uso destes com a finalidade de pesquisas. Isto levou o Conselho da União Européia a aprovar legislações (diretiva 86/609/EEC) que regulamentam o uso de animais em experimentação científica. Assim sendo, a avaliação de matérias primas empregadas em cosméticos e o produto final devem estar de acordo com a diretiva 76/768/EEC (GUIDELINE, 1999).

O artigo 4 da 6ª emenda (1993) da diretiva 76/768/EEC estabelece que os países membros devem proibir a comercialização de produtos cosméticos contendo matérias primas ou combinações destas testadas em animais, após 30 de junho de 2002. A partir desta data, uma 7ª emenda entraria em vigor substituindo os testes em animais (STEINBERG, 2000). Entretanto, o estabelecimento desta emenda não foi concretizado até a data acima estipulada (STEINBERG, 2002)

O FDA defende que as pesquisas e testes obtenham o máximo de informações possíveis, utilizando um número mínimo de animais e empreguem o máximo de métodos humanos disponíveis, além de incentivar o uso de metodologias *in vitro* e ensaios bioquímicos (FDA, 1999). Esta iniciativa vem de encontro ao conceito dos 3 R's (PEREIRA et al., 1998):

“Replacement” (Substituição): utilização de qualquer método científico alternativo à utilização de vertebrados vivos conscientes.

Pode ser considerada relativa (quando há utilização de animais, mas sem os expor a desconforto) e absoluta (quando não há qualquer utilização de animais).

“Reduction” (Redução): não se podendo eliminar completamente a utilização de animais em experiências procura-se reduzir, substancialmente, a quantidade a ser usada.

“Refinement” (Refinamento): Procura tomar medidas que possam melhorar o bem estar do animal e minimizar o sofrimento a que estão sujeitos durante os experimentos.

A proibição total do uso de animais em experimentação não é possível sem causar graves problemas de segurança, pois os métodos substitutos, atualmente disponíveis, cobrem apenas parte ínfima das necessidades, além do uso de voluntários ser possível somente após confirmar ausência de risco comprovado por outros métodos (MANSSON, 1999).

No Brasil, o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) regulamenta o uso de animais para experimentações em laboratórios (COBEA), já o uso de voluntários humanos é regulamentado pela Comissão Nacional de Ética na Pesquisa (CONEP) (RDC 196/96).

2.2. Pele Humana

As avaliações da eficácia e segurança de produtos cosméticos e de tratamento cutâneo implicam no conhecimento da estrutura da pele e de seu funcionamento.

Em análises histológicas pode se observar duas camadas básicas: a epiderme e a derme e, logo abaixo, encontra-se uma camada formada por tecido adiposo considerada como uma camada subcutânea, a hipoderme (FORSLIND 1995, PUGLIESE, 1996).

2.2.1 Epiderme

A epiderme consiste numa complexa estrutura constituída de diferentes camadas que representa os queratinócitos em vários estágios de diferenciação. Este processo inicia na camada germinativa e termina com a descamação dos corneócitos (MORETTO et al. 1999).

As camadas são conhecidas como basal, espinhosa, granulosa, e córnea (Figura 1) (FORSLIND 1995); uma quinta camada, a lúcida, é encontrada entre

a córnea e granulosa (SELBY, 1957), na palma das mãos e sola dos pés (GARTNER E HIAT, 1999).

Figura 1. Epiderme e suas diferentes camadas.

(Adaptado de GOLDSCHMIDT e RAYMOND, 1971)

A camada córnea é queratinizada e formada por células poligonais mortas e planas, os comeócitos, com cerca de $1\mu\text{m}$ de espessura e $40\mu\text{m}$ de largura (GOLDSCHMIDT & KLIGMAN, 1967), variando o diâmetro e área superficial dependendo da região do corpo (PLEWIG & MARPLES, 1970), sexo e idade (PLEWIG, 1970). Estas células estão unidas entre si lateralmente por sobreposição de suas margens com 5 ou 6 comeócitos vizinhos (KEDDIE & SAKAI, 1965). A camada córnea é o resultado final do processo de diferenciação celular pelo qual passa a epiderme (CHRISTOPHERS & KLIGMAN, 1964; GOUVEIA, 1980), e que começa na camada germinativa ou basal, onde muitos filamentos de queratina ou citoqueratina (tonofilamentos) intracelulares são sintetizados e ancorados a superfície das células e tendem a convergir sobre os desmossomas (ELIAS & FRIEND, 1975).

Durante a queratinização, cadeias polipeptídicas adjacentes com resíduos SH livres das moléculas de cisteína unem-se através de ligações covalentes fortes, formando pontes dissulfídicas que resultam na formação da queratina, proteína rica em enxofre, altamente resistente e com característica

fibrosa (MATOLTSY, 1976). A quantidade de queratina produzida pela pele humana varia de acordo com a área do organismo e, segundo GOLDSCHMIDT & KLIGMAN (1963), há uma tendência das regiões proximais das extremidades serem mais ativas que as distais. Neste estudo observaram que a palma da mão produz $3,5\text{g/m}^2/\text{dia}$ ao passo que o antebraço produz $0,1\text{g/m}^2/\text{dia}$.

Para BAKER & KLIGMAN (1967), o tempo de renovação da camada córnea difere de uma área para outra do corpo. Nas costas, a renovação ocorre mais lentamente, em torno de $15,3 \pm 5,6$ dias, seguida pelo antebraço ($13,3 \pm 1,5$ dias), parte superior das mãos ($20,8 \pm 2,3$ dias), testa ($6,3 \pm 2,3$ dias), perna ($19,6 \pm 2,5$ dias), abdome ($9,6 \pm 2,9$ dias) e couro cabeludo ($9,6 \pm 1$ dias). O tempo de renovação celular de toda a epiderme é de aproximadamente o dobro da camada córnea, assim, segundo BAKER & KLIGMAN (1967), o “turnover” da pele humana deve ser determinado de acordo com a região estudada. Eles acrescentam, ainda, que a renovação de células córneas é intensificada por fatores químicos e físicos como a radiação ultravioleta (UV).

Além das desigualdades no período de renovação celular, as diferentes partes do corpo apresentam espessura variada da camada córnea, interferindo diretamente na permeabilidade cutânea (BAKER & KLIGMAN, 1967), que também é influenciada por diferenças inter-raciais. KOMPAORE et al. (1993), avaliaram *in vivo*, por laser Doppler, o “lag time” da metil nicotina, um vasodilatador local, aplicada sobre a camada córnea de negros, caucasianos e asiáticos. A permeabilidade foi maior em asiáticos e caucasianos que em negros. Resultados semelhantes foram verificados por WILLIAMS et al. (1991), que mostraram ser a nitroglicerina menos absorvida em peles de negros que de brancos e asiáticos.

Junto aos comeócitos, encontra-se um grupo de lipídeos com função de prevenir a desidratação das camadas subjacentes, formar barreira e oferecer resistência à absorção percutânea, além de atuarem como “cimento”, fixando as células queratinizadas umas às outras, impedindo o seu desprendimento (ELIAS & FRIEND, 1975). Esses lipídeos consistem em mistura de colesterol, ceramidas e ácidos graxos livres e estão dispostos em bicamadas em torno

dos corneócitos (MAO-QIANG et al., 1995, SCHREINER et al., 2000). Estas bicamadas são originárias de pequenas organelas conhecidas como corpos lamelares, sintetizados nas células das camadas espinhosa e granular (PONEC et al. 2000), e que liberam seu conteúdo na forma de camadas lipídicas para os espaços entre os corneócitos da camada córnea recém formada (MATOLTSY, 1976; DOWNING, 1992).

Segundo MAO-QIANG et al. (1993 e 1995), para a perfeita recuperação da barreira lipídica em pele tratada com acetona é necessária a aplicação concomitante dos lipídeos descritos anteriormente. A aplicação isolada ou misturas incompletas dos mesmos retarda a formação da bicamada, aumentando a perda transepidermal de água.

Entre a camada córnea e a camada espinhosa da epiderme está a camada granulosa, com a espessura de uma ou duas camadas de células (ODLAND, 1959). Além dos corpos lamelares, nas células desta região, encontram-se grânulos de querato-hialina, que são pequenos corpúsculos arredondados ou ovais com tamanhos variados (BREATHNACH & WYLLIE, 1966; MATOLTSY & MATOLTSY, 1970), compostos de material protéico rico em aminoácidos com enxofre como a cisteína (MATOLTSY & MATOLTSY, 1970).

Abaixo da camada granulosa encontra-se a espinhosa formada por várias fileiras de células sendo as mais profundas poliédricas e as superficiais mais achatadas (STEVEN & LEWE, 2001) e com grânulos de querato-hialina (BREATHNACH & WYLLIE, 1966). As células desta camada encontram-se unidas entre si pelos desmossomas, que são junções celulares de adesão (MATOLTSY, 1975). Os queratinócitos espinhosos abrigam também as tonofibrilas, que são formados nas células basais e consistem de filamentos citoqueratina que cruzam todo o citoplasma e terminam sobre as placas de desmossomas, estabilizando, desta maneira, a epiderme (SELBY, 1957; MATOLTSY, 1975).

As células espinhosas são originadas a partir da camada basal, que consiste de uma fileira de células germinativas aderidas entre si pelos

desmosomas (SELBY, 1957). A porção inferior das células desta camada encontra-se aderente à membrana basal, que forma a interface entre a epiderme e a derme subjacente (FORSLIND 1995). Estruturas conhecidas como hemidesmosomas, complexos juncionais especializados, fornecem fixação estável dos queratinócitos basais à membrana basal (BRIGGAMAN & WHEELER, 1975, BORRADORI & SONNENBERG, 1999). É nesta região onde se observa a maior proporção de células em divisão, todavia acima da mesma é possível verificar células em mitose (PENNEYS et al. 1970).

Na epiderme encontram-se os melanócitos, células originadas da crista neural e especializadas na produção de pigmento (Figura 1) e as células de Langerhans, que são apresentadoras de antígeno (RÉGNIER et al., 1998).

2.2.2 Derme

A derme consiste de um tecido resistente e elástico que proporciona resistência física ao corpo frente a agressões mecânicas que, além de fornecer nutrientes à epiderme, abriga os apêndices cutâneos, vasos sanguíneos e linfáticos, células de natureza conjuntiva e de origem sanguínea (RUBIN & VIGLIOGLIA, 1989; PUGLIESE, 1996; MOORE & WILKINSON, 1990). É dividida em duas regiões, uma que se encontra em contato direto com a epiderme, a derme papilar, e a outra logo abaixo, a derme reticular (WEST, 1994 e FORSLIND, 1995).

Esta parte da pele é formada por uma estrutura de fibras protéicas (colágeno e elastina) associadas a uma matriz extracelular (glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas).

O principal componente fibroso da derme é o colágeno (WEINSTEIN & BOUCEK, 1960). Esta proteína é sintetizada pelos fibroblastos na forma de um precursor, o procolágeno e este, uma vez no meio extracelular, sofre ação enzimática dando origem a unidades de tropocolágeno que polimerizam formando as fibras de colágeno (CHURCH et al. 1971).

A elastina exerce uma função complementar as fibras de colágeno, permitindo extensa deformação da pele que retoma passivamente ao estado original quando suspensa a força aplicada (KIELTY et al. 2002).

A fibra elástica resulta da união de dois componentes; o primeiro consiste de unidades polipeptídicas básicas solúveis (tropoelastina ou elastina solúvel) interligadas por ligações covalentes a desmosina e isodesmosina. Formam, desta maneira, uma rede fibrilar que se deposita sobre o segundo componente da fibra elástica, as microfibrilas, filamentos protéicos distintos da tropoelastina e que se encontram unidos por ligações covalentes (UITTO, 1979, KIELTY et al. 2002).

Em microscopia de luz e com coloração específica, distinguem-se 3 tipos de fibra elástica na derme papilar: oxitalânicas, elaunínicas e elásticas. As primeiras são finas, dispõem-se de forma perpendicular a junção derme-epiderme e irradiam para a epiderme; estas fibras encontram-se ligadas ao plexo eulânico que por sua vez está conectado as fibras elásticas espessas na derme reticular (COTTA-PEREIRA et al., 1976).

Na derme, encontram-se, ainda, as glicosaminoglicanas, polí-carboidratos lineares aniônicos em virtude de seus numerosos grupos carboxilados, sulfatados ou ambos. Esses compostos são conhecidos como: ácido hialurônico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatana, sulfato de heparana e heparina (LAMBERG & STOOLMILLER, 1974) e podem-se ligar covalentemente a uma proteína para formar macromoléculas denominadas de proteoglicanas (MATHEWS, 1965, LAMBERG & STOOLMILLER, 1974). Esses compostos são altamente hidrofílicos com forte capacidade de retenção de água, sendo responsáveis pela turgescência cutânea (STEVEN & LEWE, 2001).

2.3 Sistema Pigmentar Cutâneo

2.3.1 Melanócito

Os melanócitos são células dendríticas responsáveis pela produção da melanina. Encontram-se localizados na camada basal da epiderme apoiados sobre a membrana basal, de onde projetam dendritos verticalmente e horizontalmente para queratinócitos das camadas suprabasais (Figura 2), nos quais descarregam a melanina produzida (ROBINS, 1991). No folículo piloso encontram-se estas células no infundíbulo e no ápice da papila dérmica (VIGLIOGLIA & RUBIN, 1989). O conjunto do melanócito e os queratinócitos associados constituem uma unidade funcional denominada unidade melânica epidérmica (GILCHREST et al., 1996).

Figura 2. Unidade melânica epidérmica mostrando o melanócito entre as células basais e seus dendritos projetados entre os queratinócitos suprabasais.

Fonte: www.zonamedica.com.ar/categorias/medicinailustrada/piel/melanocito.htm

A distribuição dos melanócitos varia consideravelmente entre indivíduos e de uma região para outra no corpo. Além disso, estas células, dependendo da região analisada, diferem na forma e tamanho, podendo ser bipolares ou emitirem projeções em muitas direções, adquirindo forma estrelar (SZABÓ 1954; STARICCO & PINKUS 1956).

Para STARICCO & PINKUS (1956), nos genitais encontra-se a maior quantidade de melanócitos por mm^2 , em seguida nos membros superiores, cabeça e pescoço. As pernas, abdome e peito são os locais onde há menor densidade por mm^2 . No abdome e peito, estas células apresentam forma

bipolar enquanto nas pernas, braços, cabeça e genitais possuem forma estrelar. Todavia, em cultura celular, a forma pode mudar de bipolar para dendrítica, de acordo com a intensidade de radiação UV recebida e meio de cultura utilizado (RAMIREZ-BOSCA et al. 1992).

Não há, geralmente, nenhuma correlação entre o número de melanócitos e a cor da pele vista em diferentes raças (SZABÓ 1954; ROBINS, 1991). O número permanece mais ou menos constante, mas seu grau de atividade é geneticamente variável, implicando na variação racial e individual da cor da pele (STEVEN & LEWE, 2001).

O número de melanócitos ativos diminui com a idade (HERZBERG & DINEHARDT, 1989). GILCHREST et al. (1979) estudaram o efeito do envelhecimento sobre estas células em voluntários de 28 a 80 anos. Os resultados encontrados foram: diminuição do número de melanócitos DOPA-reativos por mm^2 com o envelhecimento em ambos locais de coleta de amostra de pele, área exposta e não exposta à radiação solar; a taxa de declínio foi de 8% por década de vida na região não exposta.

Segundo HADADD e colaboradores, independente da idade, a diminuição do número de melanócitos é de 8 a 20% a cada 10 anos, após os 30 anos (HADADD et al. 1998).

A radiação solar, por emitir os raios ultravioletas A (UVA) (320-400nm) e B (UVB) (280-320nm) é um dos fatores externos que interferem na atividade dos melanócitos. O UVB aumenta o número de células DOPA reativas na maioria dos fototipos de pele (BESSOU et al., 1996), independente da idade (GILCHREST et al. 1979).

2.3.2 Melanogênese e Melanina

A melanina, pigmento que dá cor à pele e aos cabelos, é sintetizada nos melanossomas, organelas produzidas no interior do melanócito. O processo de síntese deste pigmento é conhecido como melanogênese.

Em condições normais, a quantidade de melanina é regulada pela constante produção nos melanócitos e degradação nos queratinócitos (IMOKAWA e MOTEGI, 1993), sendo facilmente localizada na epiderme pela prata amoniaca (GOLDSCHMIDT & KLIGMAN, 1967).

As funções básicas da melanina são: proteção contra a radiação ultravioleta (KOBAYASHI et al., 1993; GILCHREST et al., 1996); e absorção dos radicais livres gerados no citoplasma dos queratinócitos (GILCHREST et al., 1996, STURM, 1998). Estas funções são atribuídas à eumelanina (pigmento de cor marrom a preto), pois a feomelanina (pigmento de cor amarelo a vermelho) sofre degradação sob ação do UV e conseqüente diminuição da sua capacidade de absorver este tipo de radiação; forma, ainda, radicais livres, contribuindo para aumento de lesões de pele induzidos pelo UV (AGIN et al., 1980). Três outras funções podem ser conferidas à melanina, a de camuflagem, absorvedora de calor (MORISON, 1985) e aparência (WOLF et al., 2001).

A via bioquímica básica da melanogênese consiste na oxidação da tirosina a DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina), que por sua vez é oxidada a dopaquinona, ambas reações bioquímicas são catalisadas pela tirosinase (Figura 3) (RILEY 1997; POTTERF & HEARING, 1998). O primeiro passo deste processo, a conversão de tirosina a DOPA, é decisivo, considerando que os seguintes ocorrem de maneira espontânea em pH fisiológico (STURM, 1998) e estão sob controle genético (PROTA, 1980). A tirosina é crítica para a síntese da melanina (POTTERF & HEARING, 1998) e sua maior disponibilidade resulta no aumento da melanogênese (SMIT et al., 1997 e 1998; WENCZL et al., 1998).

A dopaquinona formada pode reagir com o oxigênio ou enxofre (Figura 3). No primeiro caso, ocorre ciclização interna da molécula resultando no dopacromo que, por sua vez, sofre reações espontâneas formando o indol 5,6 quinona ou oxidação e tautomerização catalítica formando o ácido 2-carboxílico 5,6-dihidroxiindol (DHICA). Como resultado final deste processo tem-se a formação da eumelanina. A reação da dopaquinona com enxofre (cisteína)

forma cisteinildopa e intermediários de benzotiazina com posterior copolimerização e formação da feomelanina (RILEY, 1997; ROBINS, 1991; WILMOTT et al., 1997). Há, ainda, um terceiro tipo de melanina, os tricocromos, que pertencem ao grupo das feomelaninas e são encontrados em cabelos ruivos (PROTA, 1980; VIGLIOGLIA & RUBIN, 1989).

Os tipos de pele, segundo FITZPATRICK et al. (2002) podem ser classificados, de acordo com a resposta à exposição ao sol, em I, II, III, IV, V e VI. THODY et al. (1991) estudaram a presença de feomelanina e eumelanina em peles tipo I, II, e III e, ambas, foram encontradas em todos os fototipos estudados. Resultado semelhante foi encontrado por SMIT et al. (1998) utilizando cultura de melanócitos de peles do tipo I e VI.

Figura 3. Biossíntese das melaninas a partir da tirosina.
(Adaptado de PROTA, 1980; POTTERF e HEARING, 1998).

* oxidação

A tirosinase é uma metaloenzima que contém cobre em sua estrutura e dois sítios de ligação: um para a oxidação da DOPA e outro para a ligação da tirosina (ROBINS, 1991). Como muitas outras enzimas, é sintetizada na forma inativa nos ribossomas dos melanócitos e, em seguida, ativada e transferida para dentro dos pré-melanossomas (WILMOTT et al., 1997). Esta enzima é mais ativa em peles negras (IWATA et al. 1990).

São identificadas 4 formas ligeiramente diferentes de tirosinase (isoenzima), denominadas T₁, T₂, T₃ e T₄. A T₄ é a mais efetiva na conversão da DOPA e dopacromo em melanina, enquanto a T₁ retarda a atividade (HEARING et al., 1982). As formas T₂ e T₃, solúveis no citoplasma, são responsáveis por aproximadamente 10% da atividade total da enzima, enquanto a T₄, ligada às membranas dos melanossomas, por cerca de 90% (WILMOTT et al., 1997).

Outras enzimas participam da biossíntese da melanina, embora a função das mesmas pareça ser menos crítica. São proteínas relacionadas à tirosinase 1 e 2 (TRP1 e TRP2) (Figura 3) e enzimas inibidoras da melanogênese (GILCHREST et al., 1996).

A atividade da tirosinase e o conteúdo de melanina aumentam sob a ação da radiação UVA/B (RAMIREZ-BOSCA et al., 1992), que pode influenciar os melanócitos de forma direta ou indireta, induzindo a liberação de determinados mediadores químicos pelos queratinócitos, fibroblastos e outras células da pele (GILCHREST, et al. 1996). A histamina (YOSHIDA et al., 2002) e diacilglicerol (GILCHREST, et al. 1996) são dois exemplos de mediadores liberados pela ação do UV e que estimulam a melanogênese.

O aumento na pigmentação da pele pela ação da luz UV, o bronzeado, ocorre em duas fases distintas: a pigmentação imediata e a lenta. A primeira inicia durante a exposição à luz UV, atingindo o pico máximo imediatamente após a exposição e regride em minutos ou dias. Neste tipo de pigmentação não está envolvida a síntese de novo pigmento, e a cor da pele deve-se a redistribuição dos melanossomas nas células. Este bronzeado não oferece fotoproteção. Já a pigmentação lenta ou tardia envolve o aumento da síntese

de melanina, aumento do número de melanócitos ativos e seus dendritos e observa-se, nesta fase, maior transferência dos melanossomas para os queratinócitos. Esta pigmentação inicia-se 3 a 4 dias após a exposição à radiação UV, atingindo pico máximo em aproximadamente 10 dias a 3-4 semanas. O retorno aos níveis basais de produção de melanina é lento e ocorre após semanas (GILCHREST, et al. 1996).

A cor da eumelanina produzida na pele é influenciada pelo tipo de radiação UV incidente. O pigmento produzido pela indução com a radiação UVB parece mais castanho, comparado ao pigmento produzido pela radiação UVA (KOLLIAS, 1995).

Além de fatores físicos, luz UV e calor, que podem aumentar a atividade da tirosinase (NAKAZAWA et al., 1998), os químicos também são responsáveis pela melanogêneses. IMOKAWA & MOTEGI (1993), avaliaram, em cultura de pele de cobaia, o efeito de vários desses mediadores sobre a síntese de melanina. Os resultados mostraram que a prostaglandina E2 (PGE2), os leucotrienos, o fator de crescimento de fibroblastos, o TGF- α (na concentração de 10ng/mL) e a associação de psoraleno com ultravioleta A (PUVA) aumentaram a melanogênese, enquanto as interleucinas (IL) 1 e 6 causaram efeito inibitório.

O hormônio estimulante do melanócito (MSH) causa mudanças na proliferação e morfologia dos melanócitos em cultura e induz a síntese de melanina. Este hormônio liga-se a receptores específicos (MC1R) na membrana destas células, estimulando o aumento de AMPc e, conseqüente, aumento da produção de melanina e a captação de tirosina (POTTERF & HEARING, 1998).

O mecanismo de reparo do DNA também resulta no aumento da melanogênese. GILCHREST et al. (1993) demonstraram aumento de atividade da tirosinase e síntese de melanina em culturas de melanócitos humanos e células de melanoma S91 irradiadas e tratadas com T4 endonuclease V, enzima envolvida no reparo dos dímeros de pirimidina formados pela ação da radiação UV no DNA. Esses dímeros, adicionados em culturas de células de

melanoma de ratos e melanócitos humanos, mostraram incremento do conteúdo de melanina e a aplicação tópica, em cobaias, levou ao aumento da pigmentação local (ELLER et al., 1994).

2.3.3 Melanossomas

No interior do melanócito são formados os melanossomas, organelas complexas constituídas por membranas, proteínas de estrutura, tirosinase e outras possíveis proteínas funcionais. Dois tipos básicos de melanossomas podem ser formados: os eumelanossomas, pretos ou marrons, e os feomelanossomas, amarelos ou vermelhos (PROTA, 1992).

No processo de melanização dos melanossomas são identificados quatro estágios diferentes de maturação dos mesmos: estágio I, II, III e IV. O eumelanossoma inicia seu ciclo de vida (estágio I) numa forma esférica sem a presença de melanina, porém com tirosinase ativa e provavelmente uma matriz protéica. No estágio II, esta organela torna-se oval e forma uma estrutura de membranas internas e, no passo seguinte, ocorre a síntese de melanina que é depositada sobre as membranas formadas anteriormente. No estágio IV, ou maduro, não se verifica a presença da tirosinase ativa e o eumelanossoma apresenta-se totalmente opaco, carregado de pigmento, sendo nesta fase denominado de grânulo de melanina (PROTA, 1992, ROBINS, 1991). Na produção de feomelanossomas, também, são identificados os quatro estágios de desenvolvimento descritos anteriormente, entretanto os mesmos permanecem esféricos durante todos os estágios de maturação (LAMBALOT, 1982, STURM, 1998).

Os melanossomas com melanina são transferidos para os queratinócitos vizinhos, dependendo do tamanho, de forma individualizada ou agregada (WOLFF & KONRAD, 1971; KONRAD & WOLFF, 1973). Este processo, por sua vez, tem correlação direta com a intensidade da pigmentação cutânea (OLSON et al., 1973) (Figura 4).

Figura 4. Distribuição dos melanossomas nos queratinócitos em diferentes raças. (Adaptado de ROBINS, 1991).

Um estudo antropológico de peles Caucasóides, Mongolóides e Negróides mostrou que nas duas primeiras raças os melanossomas são menores e encontram-se agrupados e circundados por membrana, todavia na raça Mongolóide encontram-se mais compactados comparados aos Caucasóides. Já nos Negróides, observa-se aumento do número de melanossomas e os mesmos são maiores e não se encontram agrupados (SZABÓ et al. 1969), além de estarem distribuídos em toda a epiderme, enquanto nos caucasóides são encontrados principalmente na camada basal e estão ausentes em outras camadas da pele (OLSO et al., 1970; YOSIPOVITCH & THENG, 2002).

As hipóteses para explicar o mecanismo de transferência dos melanossomas para as células epidermais são três: processo de fagocitose pelo qual o queratinócito fagocita a extremidade do dendrito do melanócito (KLAUS, 1969); secreção direta ("injeção") destas organelas no citoplasma do queratinócito e liberação dos melanossomas no espaço extracelular, que, em seguida, serão incorporados aos queratinócitos (ROBINS, 1991).

Uma vez dentro dos queratinócitos, os grânulos de melanina organizam-se sobre o núcleo e esta distribuição típica tem como função protegê-lo da luz solar (PROTA, 1992; GILCHREST et al., 1996).

A radiação UV aumenta o tamanho dos melanossomas em todas as raças acima descritas (TODA et al, 1972), sem, contudo, alterar a forma de

agrupamento dos mesmos, que permanecem aglomerados naqueles das raças Caucasóides e Mongolóides e individualizados nos Negróides (SZABÓ et al., 1969).

O tipo de radiação interfere na distribuição dos melanossomas na epiderme. A exposição ao UVA (340-400nm) induz a distribuição destas estruturas preferencialmente nos queratinócitos próximos a membrana basal (KOLLIAS, 1995), além de aumentar a taxa de transferência dos mesmos (BESSOU et al., 1996), enquanto a exposição ao UVB (290-320nm) induz a distribuição por toda a epiderme (KOLLIAS, 1995).

Os melanossomas e a melanina, conforme influências genéticas, são digeridos na camada espinhosa, nas peles das raças branca ou mongolóide, ou chegam quase intactos na camada córnea, na pele negróide (LAMBALAT, 1982). Para OLSON et al. (1970), as enzimas lisossomais encontradas na epiderme participam da degradação da melanina, e nos Caucasóides, estas enzimas, provavelmente por influência genética, aceleram este processo.

2.4 Cultura de Pele

A cultura de tecido, particularmente, da pele humana é uma opção ao uso da pele equivalente e cultura de células para se estudar a eficácia e toxicidade de ativos e/ou produtos cosméticos. Este tipo de procedimento consiste na remoção de uma amostra representativa do tecido a ser estudado e mantê-lo em condições artificiais (PRUNIÉRAS et al. 1976).

A técnica de cultura de órgãos foi introduzida no início do século passado, e tem como objetivo manter as funções e organização histológica do tecido em cultura similar às observadas *in vivo* (TROWELL, 1959; TAMMI & MAIBACH, 1987). Entre os vários órgãos que podem ser mantidos em cultura, a pele humana oferece um modelo *in vitro* de grande interesse para pesquisas, já que representa um sistema isolado, com potencial metabólico mais próximo do observado na pele do adulto normal, comparado à pele fetal ou cultura de células epidermais (REAVEN & COX, 1968).

A princípio a metodologia utilizada apresentava limitações e por isso foi muito pouco aplicada em estudos científicos. O desenvolvimento de meios de cultura semi-sintéticos ou sintéticos e novas técnicas para cultivo permitiram maior exploração deste recurso científico (TAMMI & MAIBACH, 1987).

A metodologia inicial para cultura de tecido foi proposta por TROWELL (1952). Mais tarde foi aperfeiçoada e, em linhas gerais consistia em manter o órgão a ser estudado sob uma rede de aço que por sua vez era mantida flutuando sob o meio de cultura. Esta montagem era protegida por uma câmara preenchida com gás e mantida em ambiente a temperatura de 37°C (TROWELL, 1959). Os fundamentos da técnica de cultura de órgãos propostos por TROWELL (1959) são utilizados até hoje nos estudos que envolvem cultura de pele.

A sobrevivência de um tecido retirado do organismo humano depende de muitos fatores ambientais, aos quais o órgão é exposto após ser removido; estes fatores críticos serão diferentes dependendo do grau de especialização do tecido. Assim, a sobrevivência de fígado ou rins é mais difícil do que de um órgão menos especializado como a pele. Além disso, os tecidos adultos são mais difíceis de serem mantidos *in vitro* que as células isoladas (SARKANY et al., 1965).

Independente da técnica e condições de cultura utilizadas, a pele adulta e fetal tem a capacidade de sobreviver por alguns dias *in vitro*, e sob condições favoráveis, continuam a crescer e diferenciar (REAVEN & COX, 1968).

A cultura de pele pode servir como uma ferramenta de estudos não só para melhorar a compreensão de eventos bioquímicos e fisiológicos que ocorrem no tecido cutâneo normal ou com determinada patologia, como também para avaliação da eficácia, toxicidade e segurança de produtos tópicos.

VAN de SANDT et al (1995) utilizaram-se desta técnica para avaliar a irritação *in vitro* provocada por dodecil sulfato de sódio, cloreto de benzalcônio e folmaldeído. Estas substâncias induziram a liberação do mediador proinflamatório ácido 12-hidroxicosatetrenóico (12-HETE) em cultura de pele

de coelho. Em pele humana, além desta substância, encontraram 15-HETE e ácido 13-hidroxiocetadecadienóico (13-HODE). Alterações histológicas revelaram variado grau de alterações da epiderme.

RIJNKELS et al. (2001) propuseram um modelo de cultura de pele de cobaia para estudos toxicológicos e fotoquímicos. Os parâmetros avaliados foram: apoptose, viabilidade dos queratinócitos e morfologia do tecido. As amostras foram irradiadas com UVB e mantidas em cultura por até 6 dias, após os quais os fragmentos tratados, mostraram aumento de degeneração do tecido cutâneo, maior perda da viabilidade dos queratinócitos e maior grau de apoptose. As alterações observadas aumentaram à medida que a intensidade de radiação foi mais alta e o tempo de aplicação do UVB mais longo.

SCHOKET et al. (1988) propuseram um protocolo para estudo toxicológico com o objetivo de avaliar, por método cromatográfico, danos causados ao DNA em amostras de pele humana mantidas em cultura por 24, horas submetidas à aplicação tópica de alcatrão de hulha, creosoto e betume. Os três compostos estudados foram capazes de ligarem-se covalentemente ao DNA alterando-o.

BACKVALL et al. (2002) sugeriram um modelo de cultura de pele para estudar alterações no DNA induzidas pela radiação UV, de onde concluíram que o UV induziu lesões no DNA de pele em cultura, mas estas foram reparadas gradualmente durante o período de incubação. Além disso, o nível de lesões nas amostras irradiadas foi superior aos observados nas tratadas com filtro solar e, a morfologia da pele em cultura manteve-se preservada por mais de 5 dias.

A vitamina A, importante no controle da diferenciação e proliferação do tecido epitelial, foi avaliado por CARON (1968), segundo o qual, nenhuma mudança representativa foi verificada quando a mesma foi adicionada diretamente no meio de cultura. Já o ácido retinóico, um derivado desta vitamina, foi capaz de modular o crescimento e diferenciação da epiderme (TAMMI et al., 1985), bem como aumentar o teor de ácido hialurônico nesta região (TAMMI et al. 1989) e estimular células da derme, em peles protegidas e

expostas ao sol, com conseqüente aumento de proteína e matriz extracelular (VARANI et al., 1994).

BOISNIC et al. (1999) avaliaram o efeito da luz UVA e de um creme contendo retinoaldeído aplicado sobre fragmentos de 1 cm² de pele humana, mantidos em cultura por 21 dias. A radiação UVA induziu alterações nas fibras elásticas e colágenas e a aplicação do creme contendo retinaldeído melhorou as características da derme. A síntese de colágeno, medida pela incorporação da prolina marcada, foi maior nas amostras de pele submetidas ao UVA seguida por tratamento com creme a base de retinaldeído.

Um modelo de cultura de pele humana mantida em frascos, com meio de cultura e agitação constante por um período de 5 dias foi utilizado por KONDO et al. (2000) para comparar a eficácia da vitamina D3 e um novo análogo o 22-oxacalcitriol (OCT), sobre a epiderme de peles com psoríase. O método utilizado mostrou ser viável para o estudo *in vitro* da vitamina D3 no tratamento desta enfermidade.

A formação de porfirinas em pele normal, com carcinoma de células basais e queratocarcinomas tratadas com ácido- δ -aminolevulínico foi estudada por FRITSCH et al. (1997). Eles identificaram e quantificaram estes compostos nas amostras de pele e no meio utilizado na cultura, e encontraram maior biossíntese dos mesmos e metabolitos específicos nos tecidos tumorais.

Apesar de ainda ser pouco explorada em avaliações da eficácia e toxicidade de ativos e formulações cosméticas, a cultura de pele é uma ferramenta de estudo que pode auxiliar os pesquisadores que trabalham nesta área, já que as legislações atuais tendem a restringir o uso de animais para testes destas categorias de produtos e, somado a este fator, têm-se os movimentos de marketing contra produtos testados em animais.

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um modelo de cultura de pele humana e avaliar a viabilidade de melanócitos, para futuras aplicações em protocolos de avaliação da eficácia e segurança de ativos e/ou produtos cosméticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Fragmentos de pele

Fragmentos de pele de voluntárias com idade entre 20-40 anos submetidas a mamoplastia redutora, provenientes de materiais humanos, doados segundo as Leis Nacionais de Transplantes ao Banco de Tecidos do ICHC da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP) (ofício CEP nº 13).

4.1.2 Meios de cultura

Meio de cultura Leibovitz (Sigma) tamponado com 0,12% de bicarbonato de sódio - pH 7,4 e suplementado com 50µg/mL de ampicilina.

Meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma) pH 7,4 e suplementado com 50µg/mL de ampicilina.

4.1.3. Reagentes e Solventes

Ácido acético de pureza analítica (p.a) (Casa americana)

Ácido fosfomolibdico p.a

Ácido fosfotungstico p.a

Ácido pícrico dp.a

Ampicilina sódica grau de pureza farmacêutico (Calbiochem)

Álcool 95º grau de pureza farmacêutico (Zulu)

Ácido retinóico grau de pureza farmacêutico (Galena)

Azul de anilina p.a

Bouin

Bicarbonato de sódio p.a
Brometo de sódio p.a (Casa Americana)
Dimetil sulfoxido (DMSO) p.a (Nuclear)
Eosina p.a (Merck)
Fosfato de sódio dibásico p.a (Synth)
Fosfato de potássio monobásico p.a (Synth)
Formaldeído 37% (Formol) p.a (Casa Americana)
Fucsina p.a
Hematoxilina p.a (Merck)
Hidróxido de sódio p.a (Synth)
Hidróxido de amônio R p.a (Arex Química)
Hipossulfito de sódio p.a (Casa Americana)
Laranja G p.a
L-DOPA grau de pureza farmacêutica
Nitrato de prata p.a (Synth)
Óxido de mercúrio p.a (Synth)
Parafina
Poli-L-isina p.a (Sigma)
Soro Fetal Bovino (Cultilab)
Sulfato de alumínio e amônio (alume amoniacal) p.a
"Transforming Growth Factor alpha" TGF- α (Gibco)
Xilol p.a (Synth)

4.1.4. Equipamentos

Agitador magnético (Fanem mod. 257)
Autoclave (Fabbe-Primar mod. 103)
Banho de água com termostato (Novatécnica mod. NT 268)
Balança analítica (Sauter mod. D7470)
Bomba de vácuo (Tecnal mod. TE 058)

Estufa com atmosfera de 5% de CO₂, 50% N₂, 45% O₂ e temperatura 37°C.

(Forma Scientific)

Estufa de secagem (Fanem mod. 010/2)

Fluxo laminar Vertical (Veco) mod. VLFS 12)

Hotbox – Câmara de Incubação (Billups-rothenberg)

Lâmpada ultravioleta (Phillips mod. HPA 400S)

Micrótomo (Microm)

pHmetro (Micronal mod. B374)

4.1.5. Outros Materiais

Material de vidraria em geral

Material cirúrgico em geral

Pré-filtro AP20 em microfibra de vidro 25mm de diâmetro (Millipore).

Placas em acrílico com 35mm de diâmetro

Lupa (Nicon)

Pipetador automático (Drummond Scientific mod.19008)

Micropipetas

Termômetro

4.2 Métodos

4.2.1. Preparação das Soluções

Ampicilina sódica 5% (p/v)

Preparou-se a solução dissolvendo 250mg de ampicilina sódica em 5mL de água destilada. A solução foi armazenada em geladeira e renovada a cada 90 dias.

L-dopa 0,1% (p/v) pH 7,4

Dissolveu-se 0,1g de L-DOPA numa mistura de 24mL de solução de fosfato de sódio dibásico 0,88% (p/v) e 8mL de fosfato de potássio monobásico 0,9% (p/v). Completou-se o volume para 100,0mL com água destilada.

Nitrato de prata 3% (p/v)

Dissolveram-se 3g de nitrato de prata em quantidade suficiente de água destilada para um volume final de 100,0mL.

Hidróxido de sódio 25% (p/v)

Dissolveram-se 25g de hidróxido de sódio em quantidade suficiente de água destilada para um volume final de 100,0mL.

Fosfato de sódio dibásico 0,88% (p/v)

Dissolveram-se 0,88g de fosfato de sódio dibásico em quantidade suficiente de água destilada para um volume final de 100,0mL.

Fosfato de potássio monobásico 0,9% (p/v)

Dissolveram-se 0,9g de fosfato de potássio monobásico em água destilada para um volume final de 100,0mL.

Formol 3,7% (v/v)

Diluíram-se 10mL de formaldeído (37%) em quantidade suficiente de água destilada para um volume final de 100,0mL.

Hipossulfito de sódio 5% (p/p)

Dissolveram-se 5g de hipossulfito de sódio em 95g de água destilada.

Brometo de sódio 2N

Dissolveram-se 10,29g de brometo de sódio em 24mL de fosfato de sódio dibásico 0,88% e 24mL de fosfato de potássio monobásico 0,9%,

completando o volume final para 100,0mL com água destilada. O pH da solução final foi ajustado para 7,4.

Solução de ácido retinóico 20mg/mL

Dissolveram-se 0,02g de Ácido Retinóico em 1mL de DMSO.

Solução de Bouin

Foram misturados 50mL de ácido acético com 250,0mL de formol e 750,0mL solução de ácido pícrico.

Solução de prata amoniacal (uso)

Foram misturados 90mL de solução de nitrato de prata a 3% com 25mL de solução de hidróxido de sódio a 25% e, em seguida, adicionou-se lentamente hidróxido de amônio até ocorrer a formação de solução de cor cinza claro, quando então foi acrescentado mais 10mL da solução de nitrato de prata. A solução assim preparada foi mantida em repouso por 24 horas, após o qual foi filtrada e armazenada em geladeira. No momento de uso diluiu-se uma parte da solução descrita em duas de água destilada.

Hematoxilina de Harris

Dissolveram-se 5g de hematoxilina cristalizada em 100,0mL de álcool (95%) e 20g de sulfato de alumínio em 1000,0mL de água quente. As duas soluções foram misturadas e fervidas rapidamente. Adicionaram 3g de óxido de mercúrio (vermelho) e retornou para fervura até adquirir coloração vermelha escura. Esfriou-se e adicionou 4ml de ácido acético. Esta solução foi filtrada antes do uso.

Fucsina ácida

Dissolveram-se 2g de fucsina ácida e 2g de laranja G em 400mL de água.

Solução fosfotungstica 5% (p/v)

Dissolveram-se 5g de ácido fosfomolibdico e 5g de ácido fosfotungstico e quantidade de água suficiente para volume final de 200,0mL.

Solução de anilina acética 1% (p/v)

Dissolveu-se 1g de azul de anilina em quantidade suficiente de solução de ácido acético a 1% para volume final de 100,0mL.

4.2.2. Preparo das Amostras de pele

Após coleta as amostras foram limpas, no laboratório de Microcirurgia Plástica do Hospital das Clínicas (HC-USP), por imersão em álcool 70% (v/v) por 30 segundos e, em seguida, em solução salina 0,9%. O material foi colocado no meio DMEM e mantido em gelo durante o transporte para o laboratório no departamento de Histologia e Embriologia do (ICB-USP), onde foram conduzidas as culturas.

Com auxílio de lupa, o tecido adiposo e parte do excesso da derme foram removidos e a pele foi cortada para a obtenção de fragmentos com cerca de 2 e 20mm².

4.2.3. Definição do Meio e Condições de Cultura

Duplicatas de fragmentos de pele com 2mm², preparadas, segundo item 4.2.2, foram depositadas sobre filtro AP20 e, em seguida, foram colocados em placas estéreis (35mm de diâmetro), nas quais adicionou-se 1mL de meio Leibovitz suplementado com ampicilina, procurando manter o fragmento numa interface ar/líquido. As placas foram incubadas em ambiente com 5% de CO₂, e 95% de ar saturado com vapor de água à temperatura ambiente (25±2°C) (MALO et al., 1983, GOLDFEDER, 1996). Em paralelo, amostras foram mantidas em meio DMEM, tamponado para pH 7,4, incubadas em estufa com 5% de CO₂, 55% de N₂ e 40% de O₂ a 37°C (TAMMI e SANTTI, 1982).

Os meios de cultura foram trocados a cada 48 horas.

As amostras foram coletadas, após obtenção dos fragmentos controle (T_0), nos tempos 24 horas (T_{24}), 48 horas (T_{48}), 72 horas (T_{72}) e 96 horas (T_{96}) e 7 dias (T_{7d}) após o início da cultura.

4.2.4. Avaliação da Influência do Tamanho do Fragmento

Para verificar a influência do tamanho do fragmento de pele utilizado para cultura, duplicatas de fragmentos de pele com tamanhos de 2mm^2 e 20mm^2 foram incubadas em meio Leibovitz, suplementado com ampicilina nas mesmas condições de cultura descritas no item 4.2.3.

Coletas de amostras de fragmentos de peles para análise comparativa entre os diferentes tamanhos de tecido foram feitas nos tempos T_0 , T_{24} , T_{48} , T_{72} , T_{96} e T_{7d} .

4.2.5 Avaliação da Influência do Soro Fetal Bovino (SFB), TGF- α e Ácido Retinóico na Manutenção do Tecido em Cultura.

Duplicatas de fragmentos de pele com 20mm^2 foram mantidas em meio Leibovitz enriquecido com 10% de soro fetal bovino, por um período de 7 dias. Em paralelo foram cultivados fragmentos controles utilizando apenas meio Leibovitz.

As amostras para avaliações foram coletadas nos tempos T_0 , T_{48} , T_{96} e T_{7d} .

Para analisar a influência do TGF- α na cultura, duplicatas de fragmentos de peles foram mantidas em meio Leibovitz por 48 horas, após as quais receberam suplementação de $5\text{ }\mu\text{L}/10\text{mL}$ de meio de TGF- α . Os fragmentos foram mantidos em meio suplementado por 36 horas, sendo uma amostra coletada após 12 horas da suplementação e outra no termino das 36 horas, em paralelo foram mantidos fragmentos controles.

Na análise da influência do ácido retinóico fragmentos de peles foram mantidos em meio Leibovitz com $1\text{ }\mu\text{g}$ de ácido retinóico /mL de meio e o tempo

total da cultura foi de 7 dias. O DMSO usado como veículo, na concentração final de 0,0005% no meio de cultura, não causa qualquer alteração no tecido (VARANI et al., 1994).

As amostras para avaliações foram coletadas nos tempos T_{48} , T_{96} , e T_{7d} . Para cada um destes tempos foram cultivadas, em paralelo, amostras controle sem adição de ácido retinóico.

4.2.6. Avaliação da Influência da Luz Ultravioleta (UV) na Manutenção dos Fragmentos de Pele em Cultura e Atividade dos Melanócitos.

Fragmentos de pele com 20mm² mantidos em Leibovitz foram expostos à radiação ultravioleta com espectro na faixa do UVA e UVB emitida por lâmpada Phillips HPA 400S (Figura 5) mantida a 30cm das amostras. Foi realizada uma exposição diária durante 3 dias consecutivos com duração de 5 minutos cada, totalizando, ao final de 3 dias, 15 minutos de irradiação. As amostras foram coletadas T_{48} , T_{96} e T_{7d} após a primeira irradiação. A amostra T_{48} foi coletada logo após a última irradiação.

Figura 5: Espectro da radiação ultravioleta emitido pela lâmpada Phillips HPS 400S, obtido de acordo com informações do fabricante.

4.2.7. Análises Histológicas

4.2.7 Análise Morfológica do Tecido

Após cada tempo estipulado nos experimentos descritos anteriormente, as amostras foram fixadas em Bouin por 12 horas e incluídas em parafina.

A inclusão em parafina foi realizada após desidratação seriada em etanol e xilol. O processo de desidratação consistiu no seguinte: manutenção dos fragmentos por 1 hora em álcool 95°, seguido por mais 2 horas em etanol absoluto com troca após a primeira hora; imersão em xilol por duas horas, com troca após a primeira hora de imersão. Os fragmentos desidratados foram passados numa seqüência de 3 banhos de parafina à 37°C, com duração de uma hora cada e incluídas em parafina.

Cortes de 5µm de espessura foram desparafinizados em xilol/etanol, hidratados e corados em Hematoxilina/Eosina (HE) ou Masson.

A desparafinização e hidratação consistem em passar as lâminas com os fragmentos de tecido numa seqüência de solventes, com tempo de duração de 3 minutos cada. Inicia-se com duas imersões em xilol, seguido por outras em etanol absoluto, etanol 95° e etanol 70°. Termina-se com passagem em água corrente por 5 minutos.

Feita a hidratação as lâminas foram mergulhadas em solução de hematoxilina por 2 minutos, lavadas em água corrente por 3 minutos e mergulhadas em eosina por 1 minuto. Após esse processo, procede-se a desidratação das amostras coradas utilizando uma seqüência de solvente que consiste em etanol 95°, etanol absoluto, xilol/etanol, e três imersões em xilol. Cada imersão obedece ao tempo de 3 minutos.

Os fragmentos corados por Masson foram lavados primeiro em água de torneira até desaparecer a cor amarela do fixador, em seguida em água destilada por 5 minutos e, então, corados pela hematoxilina de Harris por 2,5 minutos, lavados em água de torneira por 5 minutos e por mais 5 minutos em água destilada. Na seqüência, os fragmentos foram corados pela fucsina-

escarlate por 3 minutos e novamente lavados em água destilada por 10 minutos; foram então, tratadas com ácido fosfotúngstico-ácido fosfomolibdico por 10 minutos e coradas pelo azul de anilina-acético por 5 minutos. Por fim, foram lavadas em água destilada por 5 minutos, seguida por solução de ácido acético a 1% por 3 minutos e, novamente, em água destilada por mais 5 minutos. Após esse processo procedeu a desidratação conforme descrito anteriormente.

Os fragmentos assim corados foram acrescidos de Etellan e protegidos com lamínulas.

4.2.8 Análise do Pigmento de Melanina

O método histoquímico usado para estudo da pigmentação da pele está baseado na redução do nitrato de prata amoniacal para prata metálica pelos grânulos de eumelanina (PROTA, 1992).

Fragmentos de pele mantidos em Leibovitz por 7 dias foram coletados a cada 24 horas e incluídos em parafina (como descrito no item 4.2.7). Cortes com 5µm de espessura foram feitos e corados pela técnica de Fontana-Masson (BANCROFT, 1996), modificada por BARBOSA et al (1984) para corar grânulos de melanina. A modificação proposta permite o uso de solução de prata mais diluída e redução no tempo de coloração com aumento da temperatura para até 75°C. O presente estudo utilizou a temperatura de 60°C, mantendo o tempo de 15 minutos.

Amostras do tecido, após montagem em lâmina com poli-L-lisina, foram desparafinizadas em xilol/etanol (como descrito no item 4.2.7) e hidratadas em água por 10 minutos. Em seguida, foram colocadas em solução de prata amoniacal à 60°C e mantidas por 15 minutos, após os quais foram lavadas em água corrente por 3 minutos com posterior imersões em solução de hipossulfito de sódio a 5% por 1 minuto e lavadas em água corrente por 3 minutos. Posteriormente foram desidratadas em etanol/xilol e montadas em Etellan.

O pigmento de eumelanina também foi analisado em preparado total de epiderme, conforme padronização feita no laboratório.

Nesse processo a epiderme foi separada da derme, após incubação dos fragmentos de pele em solução de brometo de sódio 2N a temperatura de 37°C por 45 minutos.

A epiderme, assim obtida, foi corada com prata amoniacal por 1 minuto à 60°C, lavada em água corrente por 3 minutos, mergulhada em solução de hipossulfito de sódio a 5% por 1 minuto e, novamente, lavada em água corrente por 3 minutos, desidratada em etanol/xilol (como descrito no item 4.2.7) e montada em lâminas como lado dermal para cima.

4.2.9 Análise de Melanócito DOPA-positivo

A verificação de melanócitos DOPA reativos foi feita utilizando a técnica de STARICCO & PINKUS (1956), com modificações no tempo de incubação (GILCHREST et al, 1979 e IMOKAWA & MOTEGI, 1993). Para avaliação de melanócitos DOPA positivo, amostras foram coletadas nos tempos T_0 , T_{48} , T_{96} e T_{7d} e incubadas em solução de brometo de sódio 2N a temperatura de 37°C por 45 minutos, após os quais a epiderme foi removida, lavada com água destilada e incubada a 37°C em solução de DOPA 0,1% tamponada para pH 7,4, por 5 horas. Após esse período, as amostras foram fixadas em formol a 10% por 12 horas, desidratadas em álcool e xilol e montadas (como descrito no item 4.2.7.1) em lâminas com a face dermal para cima.

5. RESULTADOS

5.1 Definição do Meio e Condições de Cultura

As amostras de peles mantidas durante 7 dias em DMEM à 37°C e Leibovitz à temperatura ambiente, coletadas a cada 24 horas e analisadas por microscopia de luz apresentaram os seguintes resultados:

Os fragmentos cultivados em DMEM foram os que apresentaram maiores níveis de degeneração. Em 24 horas, verificou-se uma pequena separação da derme e epiderme e as células edemaciadas apresentaram-se com núcleos em picnose (cromatina condensada) (Figura 6B). Este processo foi se intensificando e, no sétimo dia da cultura, observou-se necrose em praticamente toda extensão do tecido (Figura 6D). As amostras cultivadas em Leibovitz mostraram maior integridade da estrutura da pele durante todo o tempo de cultivo (Figura 6C e E). Alterações na morfologia do tecido foram mais evidentes no sétimo dia de cultura, no entanto, a separação da derme da epiderme, diferentemente daquela observada nas amostras mantidas em DMEM (Figura 6D), foi visível com mais frequência apenas nas bordas dos fragmentos. A quantidade de núcleos picnóticos nas culturas em Leibovitz também foi bem menor comparada às mantidas em DMEM.

Figura 6. Fotomicrografias de fragmentos de pele humana mantidos em DMEM à temperatura de 37°C e Leibovitz à temperatura ambiente. **A** fragmento controle (T_0); coloração HE. x 150; **B** DMEM (T_{24}); célula edemaciada (seta) e ausência de camada córnea; coloração HE. x 600; **C** Leibovitz (T_{96}); coloração Masson. x 300; **D** DMEM(T_{7d}); ★ folículo piloso em degeneração; *separação da epiderme da derme; coloração HE. x 150. **E** Leibovitz (T_{7d}); preservação de todas as camadas da epiderme; coloração Masson. x 150.

5.2 Influência do Tamanho do Fragmento

Na avaliação da influência do tamanho das amostras, as alterações morfológicas observadas nos fragmentos com 2mm² e 20mm², cultivados em Leibovitz, foram praticamente as mesmas em todos os tempos de coleta (T₀, T₂₄, T₄₈, T₇₂, T₉₆ e T_{7d}). A figura 7 mostra o aspecto geral de um fragmento de pele com tamanhos de 2mm² e 20mm², após 96 horas de cultura.

Figura 7. Fotomicrografia de pele humana fornecendo uma visão panorâmica do tecido mantido em Leibovitz por 96 horas. **A** fragmento de pele com 2mm²; **B** fragmento de pele com 20mm². Coloração HE. x 150.

5.3 Análise da Influência do Soro Fetal Bovino (SFB) e TGF- α na Cultura

Os fragmentos cultivados com TGF- α não apresentaram qualquer alteração em nível de divisão celular, quando comparados aos fragmentos controles, nos diferentes períodos de incubação. Todavia, as amostras enriquecidas com SFB apresentaram células em mitose após 48 horas de cultura (Figura 8).

Figura 8. Fotomicrografias de fragmento de pele humana mantido em Leibovitz suplementado com SFB; fragmento com 48 horas de cultura, apresentando células em divisão (setas); coloração HE. x 900.

5.4 Influência do Ácido Retinóico

As amostras de pele que receberam ácido retinóico na concentração de $1\mu\text{g/mL}$ de meio de cultura mostraram separação da camada córnea da epiderme viável a partir de 48 horas (Figura 9A). No entanto, esta alteração não seguiu um padrão quanto ao tempo de início e intensidade da mesma para as duas amostras estudadas. Após 48 horas de cultura foi observada célula em divisão na camada basal (Figura 9C). Na camada espinhosa, neste mesmo tempo de estudo, observa-se as junções celulares integras assegurando a coesão das células desta região e manutenção da morfologia da mesma (Figura 9D). Já no sétimo dia de cultura ocorreram, na amostra de pele de uma das voluntárias, alterações acentuadas na região de junção derme e epiderme. Nota-se, analisando a figura 9B, separação completa das duas camadas principalmente nas bordas dos fragmentos.

5.5 Análise do Pigmento de Melanina

As figuras 10 (A e B) e 11 mostram pigmentos de melanina revelados pelo nitrato de prata amoniacal nos tempos T_0 e T_{7d} . No tempo T_0 os grânulos de melanina estão distribuídos nas células da camada basal da epiderme e células adjacentes de forma organizada. É possível notar a melanina concentrada dentro dos espaços celulares bem delimitados, com concentração na parte apical das células. Esta organização foi considerada padrão, neste estudo, para o tecido cutâneo (Figura 10A e 11A). Já no T_{7d} os grânulos de melanina continuam presentes tanto na camada basal como em células adjacentes, no entanto, apresentam distribuição mais desorganizada. Não é possível verificar, em algumas regiões, delimitação nítida deste pigmento (Figura 10B e 11B).

A figura 10 C mostra a melanina, evidenciada como pontos negros, em preparados totais de peles incubadas com nitrato de prata amoniacal por um minuto.

Figura 9. Fotomicrografia de fragmentos de pele humana mantidos em meio de cultura Leibovitz e tratados com ácido retinóico 1µg/ml. Coloração HE. **A** (T₄₈); ausência da camada córnea. x 150. **B** (T_{7d}); * separação da epiderme da derme. x 150; **C** (T₄₈); célula em divisão. x 900; **D** (T₄₈); camadas espinhosa bem preservada mostrando as junções celulares (seta). x 900.

Figura 10. Fotomicrografias de fragmentos pele humana evidenciando, de forma panorâmica, grânulos de melanina revelados pelo nitrato de prata amoniacal em toda extensão do fragmento. **A** controle (T_0); concentração da melanina na parte apical das células (seta); **B** $T_{(7d)}$; distribuição mais desorganizada da melanina. x 300; **C** (T_{48}); preparado total de pele. x 150.

Figura 11. Fotomicrografia de uma papila da epiderme mostrando grânulos de melanina revelados pelo Nitrato de Prata Amoniacal. **A** controle (T_0); **B** $T_{(7d)}$. x 900.

5.6 Análise de Melanócitos DOPA positivos

A figura 12 mostra melanócitos viáveis determinados por reação com DOPA.

É possível observar a presença de melanócitos DOPA reativos em todos os tempos de cultura com resultados bastante semelhantes nos tempos T_0 a T_{96} (Figura 12B e C, respectivamente). No T_{7d} , melanócitos ativos estão presentes em toda a extensão do fragmento, no entanto, os mesmos apresentam-se menos reativos, comparados aos demais tempos.

A figura 12A mostra melanócitos DOPA reativos, evidenciando os prolongamentos carregados com melanina.

Figura 12. Fotomicrografia de preparado total de epiderme humana mantida em Leibovitz e incubada com DOPA 0,1%. **A** (T₄₈); * melanócito bipola. x 900; **B** controle (T₀) e **C** (T₉₆). x 150.

5.7 Avaliação da Influência da Luz Ultravioleta (UV) na Manutenção dos Fragmentos de Pele em Cultura e Atividade dos Melanócitos.

As amostras de pele em cultura não mostraram nenhuma alteração na morfologia por ação da luz ultravioleta nas condições de estudo empregadas. Os fragmentos corados com HE mostram-se bem preservados em T₉₆ e T_{7d} (Figura 13A e B). As junções celulares encontram-se integras ao final de 96 horas (Figura 13A) e, todas as camadas da epiderme são facilmente identificadas no final de 7 dias (Figura 13B).

Os melanócitos mantiveram preservados e ativos durante todo o período de cultura, todavia, os resultados mostram que não houve alteração na forma ou intensidade de coloração destas células (Figura 13C e D) e nem aparente alteração da quantidade.

A melanina, nos fragmentos controle (Figura 14A), está concentrada em algumas regiões e quase ausente noutras. Já nos fragmentos irradiados este pigmento encontra-se distribuído de maneira mais uniforme por toda a extensão da amostra, com maior concentração na parte apical dos queratinócitos (Figura 14B e C).

Figura 13. Fotomicrografia de fragmentos de pele humana em meio de cultura Leibovitz irradiados com UVA/UVB. **A** (T_{96}); junções celulares preservadas; coloração HE. x 900. **B** (T_{7d}); preservação morfológica da epiderme, mostrando a camada basal, espinhosa, granulosa e córnea; coloração HE. x 150. **C** e **D** preparado total de epiderme humana mantida em Leibovitz e incubada com DOPA 0,1%. **C** (T_{48}); melanócito distribuídos por toda a extensão da epiderme. x 300; **D** melanócito bipolar (T_{96}). x 600.

Figura 14. Fotomicrografias de fragmentos pele humana evidenciando grânulos de melanina revelados pelo Nitrato de Prata Amoniacal em toda extensão do fragmento. **A** controle (T_0); regiões com concentrações de melanina intercaladas com regiões com baixa quantidade deste pigmento. X 300. **B** (T_{96}) fragmento irradiado mostrando distribuição mais uniforme da melanina; **C** (T_{7d}); fragmento irradiado mostrando maior concentração de melanina na parte apical das células (seta). x 600.

A

B

C

6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a viabilidade de fragmentos de pele humana em cultura num período de 7 dias, bem como dos melanócitos mostrando ser, a metodologia utilizada, válida para estudos *in vitro* de pele e melanócitos.

A pele adulta e fetal tem a capacidade de sobreviver por alguns dias *in vitro* e, sob condições favoráveis, continuam a crescer e diferenciar (REAVEN e COX, 1968). A cultura de órgão é conseguida quando o mesmo sobrevive em meio ambiente estável, mantendo sua identidade histológica e capacidade de realizar suas funções fisiológicas (SARKANY et al. 1965).

No preparo das amostras dos fragmentos de pele para realização deste estudo, parte da derme foi mantida, uma vez que, na ausência desta camada não há a preservação da epiderme (CARON, 1968) e esta acaba degenerando dentro de 24 horas (CHAPMAN et al., 1989). Também procurou-se manter os fragmentos numa interface ar/líquido, condição importante para a sobrevivência da pele em cultura, pois a imersão total leva a necrose do tecido, provavelmente devido à falta de oxigênio (CHAPMAN et al. 1989).

Para SARKANY et al. (1965), o sucesso de uma cultura de pele pôde ser avaliado pela proliferação da epiderme nas bordas livres da derme; formação de uma nova camada córnea a partir da epiderme original, composta principalmente por células paraqueratóticas (presença de núcleos celulares nas células da camada córnea); ocorrência de células em mitose na camada basal e a preservação da morfologia geral da pele. CARON (1968) e FLAXMAN & HARPER (1975) acrescentaram, ainda, a capacidade do núcleo das células da epiderme e derme incorporarem timidina, um indicador da síntese de DNA.

Para TAMMI et al. (1979) a morfologia do tecido cutâneo foi um critério importante e conveniente para caracterizar o comportamento da pele em cultura. Estes autores sugeriram um método quantitativo para analisar as alterações ocorridas em cultura de pele, que consistiu na contagem de células e medida da altura das diferentes camadas da epiderme. Este critério foi um dos utilizados por CHAPMAN et al. (1989), para avaliar a viabilidade de pele de

orelha de porco. Segundo os autores, a epiderme sofreu rápida redução de sua espessura, visto como diminuição da altura das diferentes camadas, nos cinco primeiros dias de cultura, continuando este processo progressivamente nos dias seguintes, porém com menor intensidade. Foram observadas reduções do tamanho e número das células viáveis, contribuindo para o estreitamento da epiderme.

No presente trabalho foram avaliados os parâmetros: células em mitoses, presença de camada córnea paraqueratótica, migração de células sobre a derme livre, preservação da morfologia geral do tecido observando-se a presença de todas as camadas da epiderme, proporção de células picnóticas, alterações na junção derme e epiderme e distribuição da melanina nas células.

O sucesso da cultura de pele humana é dependente da temperatura (REAVEN & COX, 1968), tensão de oxigênio (TAMMI & JANSÉN, 1980), pH e do meio de cultura utilizado, o qual deve ser avaliado por sua capacidade de manter a integridade morfológica e funcional dos tecidos por maiores períodos de tempo (GOLDFEDER, 1996).

A primeira parte deste estudo consistiu em verificar, entre duas técnicas diferentes de cultura de tecidos, qual seria a melhor para pele humana. Em uma das metodologias utilizadas, as amostras foram mantidas em temperatura de 37°C e ambiente com 5% de CO₂ e 40% O₂, considerado por REAVEN & COX (1968) e TAMMI & JANSÉN (1980), como a melhor tensão de oxigênio para manutenção de pele *in vitro* e, como meio nutriente, utilizou-se o DMEM, comumente empregado em cultura de diferentes tipos celulares. O outro método, o meio de cultura utilizado foi o Leibovitz, freqüentemente usado nas culturas de tecidos do trato gastrointestinal e, segundo GOLDFEDER (1996), tem como vantagem a possibilidade de manter as amostras em temperatura ambiente. Este meio contém galactose em substituição a glicose, que o torna menos susceptível a variação de pH em ambiente de gás atmosférico (LEIBOVITZ, 1963), que foi associado a 5% de CO₂.

Nas avaliações das duas metodologias foi possível verificar claramente que os fragmentos de pele mantidos em Leibovitz, nas condições

especificadas, apresentaram menor grau de degeneração no período de estudo. Aqueles que foram mantidos em DMEM mostraram maior proporção de células picnóticas na camada espinhosa já a partir de 24 horas da cultura e no sétimo dia foi observada separação da derme e epiderme (Figura 6). Este resultado foi discordante ao observado por BACKVALL et al. (2002), que observaram presença de núcleo picnóticos em pele mantida em DMEM após 96 horas (4 dias). Por outro lado, estão de acordo com o observado por TAMMI et al. (1979) que realizaram estudos quantitativos e qualitativos de cultura de pele mantida em meio essencial mínimo de Egle (MEM), e verificaram a presença de células picnóticas na camada espinhosa a partir do primeiro dia de cultura. No entanto, estas células encontravam-se isoladas não formando uma camada necrótica.

Nas amostras cultivadas em Leibovitz durante 7 dias, verificou-se a presença de poucas células picnóticas. A morfologia geral da pele mantida nesse meio manteve-se preservada durante todo o período de estudo. Foi possível identificar a presença e integridade de todas as camadas da epiderme (Figura 6E), parâmetros considerados fundamentais para qualificar a boa performance da cultura e, por esse motivo, os experimentos subsequentes foram conduzidos neste meio.

Não foi observada qualquer evidência de migração celular sobre a derme livre dos fragmentos. Resultados semelhantes foram encontrados por FLAXMAN & HARPER (1975) em cultura de pele de abdome em meio MEM, onde a arquitetura geral da pele e a junção derme e epiderme foram bem preservadas e verificou-se pouca ou nenhuma tendência à migração. Entretanto, diferente dos resultados encontrados na primeira parte do presente trabalho, FLAXMAN & HARPER (1975) identificaram células em mitose e a formação de uma nova camada cómea logo abaixo de uma região paraqueratótica que, segundo os autores, pode ser consequência de um período de ajuste inicial às condições de cultura, durante o qual a diferenciação celular foi imperfeita.

A presença de células em mitose foi considerada como um indicador de viabilidade, mas, segundo HSU (1952) a visualização deste fenômeno, em cultura de pele é difícil. FLAXMAN & HARPER (1975), determinaram no início da cultura de pele no meio sem adição de SFB, o índice mitótico (IM), definido como número de células em mitose para cada 1000 células basais, igual a 0,25, e após 5 dias de 2 a 3.

A epiderme é um tecido dinâmico cujas células se multiplicam, diferenciam e renovam constantemente, todavia este processo é lento e uma célula basal, dependendo da região do corpo, leva cerca de 30 dias para se dividir, diferenciar e formar queratina que será descamada (BAKER & KLIGMAN, 1967). Só o ciclo de divisão celular pode levar cerca de 457 horas ou 19 dias numa pele normal (WEINSTEIN & FROST, 1971) e compreende quatro passos sucessivos: G1, no qual a célula se prepara para a fase de síntese de DNA; S, fase de síntese de DNA; G2 período em que a célula checa e repara erros; mitose em que ocorre a divisão celular (GELFANT & CANDELAS, 1972).

No presente estudo, utilizaram-se fragmentos de pele retirados da região mamária de mulheres de 20 a 40 anos que, possivelmente, apresentam tempo de renovação lento comparada a outras regiões do corpo mais expostas a estímulos físicos, como atrito e luz ultravioleta. Isto pode ter sido um dos fatores que tenha dificultado a visualização de células em mitose nos fragmentos analisados.

O tempo de estudo, que foi de apenas 7 dias, também pode ter influenciado. O processo de divisão celular na pele humana, como descrito anteriormente, dura cerca de 19 dias e, dentro deste período, apenas cerca de duas horas são destinadas à mitose o que diminui ainda mais a probabilidade de obter amostras neste momento da divisão celular. Aliado ao tempo de estudo e origem das amostras, teve-se, ainda, a hora em que as coletas foram realizadas, sempre durante o dia e não à noite, período em que ocorre a mitose em pele, mais precisamente com picos em torno de 23:30 horas (BROWN, 1991).

A temperatura na qual as amostras foram mantidas, também pode ter influenciado diretamente a divisão celular, reduzindo a velocidade de ocorrência deste evento. Todavia, baixas temperaturas parecem apenas retardar a resposta celular e até diminuir a intensidade da mesma, mas não abolir por completo, sugerindo não ser esta variável um fator totalmente limitante para os estudos conduzidos neste trabalho. MALO et al. (1983) estudaram a preservação morfológica do duodeno de camundongos, bem como a atividade mitótica e síntese de DNA, em diferentes meios de cultura, temperatura e composição de ar. De acordo com os resultados obtidos, os autores concluíram ser o meio Leibovitz, mantido a temperatura e ar ambiente, o que apresentou melhores resultados.

Nos estudos de COOBS et al. (1973), a migração celular em peles de cobaias mantidas em cultura a temperaturas entre 27°, 30°, 34°, 37°, 40° e 45°C, ocorreu entre os intervalos de 27 e 40°C. Este fenômeno foi mais intenso já nas primeiras 24 horas à 40°C enquanto que a 27°C essa migração ocorreu somente a partir de 48 horas. Para REAVEN & COX (1968) a diferenciação celular da pele humana ocorreu tanto à temperatura de 31-32°C e de 37°C, todavia no primeiro caso a diferenciação foi mais lenta e a partir de 40°C o tecido degenerava dentro de 24 horas. SARKANY et al. (1965), demonstraram alterações histológicas à temperatura de 31°C.

Os testes para avaliar o melhor meio de cultura para pele foram realizados utilizando amostras com dimensões de 2mm². A eficiência com que todas as células do tecido são nutridas pelo meio de cultura, bem como a eficácia do sistema na remoção de metabólitos é limitada pelo tamanho dos fragmentos de pele (ROWDEN et al., 1975).

Para a utilização no desenvolvimento de protocolos de estudos, nos quais se deseja aplicar a substância ativa ou produto formulado sobre a camada cómea e não no meio de cultura necessita-se de fragmentos de tamanho maior, razão pela qual, posteriormente, foram realizadas culturas com amostras de 2mm² e 20mm². Os resultados obtidos indicaram que se pode utilizar amostras de 20mm², pois estes fragmentos mostraram alterações

idênticas às de 2mm^2 (Figura 7). Protocolos de estudos utilizando fragmentos com tamanhos entre 2mm^2 e $2,5\text{mm}^2$ foram, freqüentemente, os mais empregados (SARKANY & GAYLARDE, 1970; FLAXMANN & HARPER, 1975; TAMMI et al., 1980 e 1985; VARANI et al., 1993 e 1994). CARON (1968) trabalhou com amostras de 3mm^2 e TAMMI et al. (1979) com 6mm^2 . Para LEVINE (1972), um tamanho ideal foi de 5mm^2 , e não houve diferenças nas culturas de fragmentos com tamanhos entre 2 e $7,5\text{mm}^2$. Todavia, as amostras de pele pequenas foram difíceis de serem utilizadas, enquanto as maiores tendiam a enrolar-se nas bordas. BOISNIC et al. (1999), estudaram a eficácia de um creme com retinaldeído em fragmentos com 1cm^2 .

Uma vez definida a melhor metodologia de cultura a ser usada neste trabalho e o tamanho das amostras, o próximo passo consistiu em verificar se as amostras respondiam a estímulos químicos externos. Para isso foram realizadas culturas em meio enriquecido com SFB, $\text{TGF}\alpha$ e ácido retinóico.

O SFB, por ser um produto natural, possui composição variável com numerosos promotores e inibidores de crescimento (REAVEN & COX, 1968; FLAXMAN & HARPER, 1975) e, segundo LEIBOVITZ (1963), a adição de 10% SFB, normalmente, estimula o crescimento de qualquer tipo de cultura.

SARKANY et al. (1965) avaliaram 22 diferentes meios de cultura de onde concluíram serem aqueles que continham soro humano os melhores para manutenção da viabilidade do tecido cutâneo.

Para LEVINE (1972), a morfologia da epiderme pôde ser preservada durante uma semana, em cultura com ausência de soro ou componentes de baixo peso molecular do mesmo. Nesta condição nenhuma migração celular foi observada. Por outro lado, este processo passou a ser notado quando houve a suplementação do meio de cultura com soro ou seus componentes de alto peso molecular. LEVINE (1972) verificou, ainda, que na presença de soro a camada córnea se dividia em duas regiões, uma externa e outra interna com células paraqueratóticas. Ao final de 19 dias, as culturas suplementadas com soro apresentaram melhores resultados.

O meio de cultura DMEM, sem adição de qualquer suplemento, foi o melhor meio para manutenção da viabilidade do tecido em cultura (CHAPMAN et al. 1989). Segundo estes autores a adição de SFB teve efeito deletério e parece ocorrer necrose parcial nas camadas superiores da epiderme, diminuindo o número de camadas viáveis. Entretanto, as células viáveis remanescentes formavam uma nova epiderme dentro de 7 a 11 dias.

TAMMI & JANSÉN (1980), ao contrário, demonstraram quantitativamente que a adição de soro bovino ou humano melhora consideravelmente a viabilidade da epiderme de pele em cultura. O processo de queratinização foi consideravelmente influenciado, refletindo na formação de uma nova camada córnea, bem como a migração celular sobre a derme livre, que nas culturas sem soro poderia ser vista somente nos primeiros dias, ao passo que nas suplementadas esse processo pode ser visto durante os 10 dias de estudo.

CARON (1968), também verificou evidência de crescimento em amostras de pele mantidas em meio de cultura com soro humano por um período de 15 dias. Essas evidências foram: formação de uma camada paraqueratótica abaixo da epiderme original, presença de células em mitose e migração celular. Sendo que, este último evento, também foi verificado por SARKANY & GAYLARDE (1970), em menos de 24 horas de cultura de pele humana em meio contendo soro humano.

Com a adição de SFB numa concentração de 10%, no modelo estudado, foi possível observar células em prófase, o estágio inicial da mitose, e a preservação morfológica do tecido foi similar ao controle. Para testes de ativos e/ou produtos tópicos não é interessante o uso de SFB, uma vez que o mesmo pode interferir na interpretação dos resultados encontrados. Por outro lado, os resultados obtidos neste trabalho mostram que o modelo de cultura proposto está respondendo a estímulo externo.

A adição de ácido retinóico (1µg/mL) diretamente no meio Leibovitz mostrou alteração morfológica do tecido. Houve, a partir do segundo dia de cultura, separação da camada córnea do restante da epiderme viável. Este

efeito pode ser considerado normal, já que uma das aplicações médicas do ácido retinóico é provocar esfoliação da camada córnea (CLAVIJO & COMES, 2001). No entanto, esta alteração não seguiu um padrão de tempo, ou seja, foi observada pela primeira vez, em duas amostras, no final de 48 horas e, em outras duas, no final 96 horas. A intensidade de separação também não foi igual para todos os fragmentos, mostrando-se intensa em alguns e mais branda noutros.

VARANI et al. (1993 e 1994) também observaram separação da camada córnea da epiderme viável em peles mantidas em meio de cultura com baixa concentração de cálcio (0,15mM) suplementado com ácido retinóico. O aumento do teor de cálcio para 1,4mM, segundo eles, resultou em significativa expansão da camada viável da epiderme, com aumento da densidade de células basais, intersticiais e manutenção da camada córnea, no entanto a mesma não se mostrou totalmente aderida à camada granulosa. Já para TAMMI et al. (1985) o ácido retinóico aumenta apenas o número de células viáveis sem, contudo, aumentar a espessura da epiderme. Apesar do meio Leibovitz conter 1,27mM de cálcio não foi observado, no modelo em estudo, expansão da camada viável da epiderme.

A separação total da derme e epiderme foi encontrada em uma das amostras tratadas com ácido retinóico. Este efeito foi verificado por VARANI et al. (1993 e 1994) em amostras de peles mantidas em meio com baixo teor de cálcio sem adição de ácido retinóico, condição diferente da utilizada neste experimento. No presente estudo, no final de 48 horas de cultura observou-se divisão celular na camada basal, o que pode ser consequência da ação do ácido retinóico (Figura 9C), já que este ativo dermatológico é responsável por aumentar a atividade mitótica da epiderme (LÜTZOW-HOLM et al., 1992).

Ao mesmo tempo em que a adição de ácido retinóico causou alguma alteração nas amostras de pele em cultura, os resultados mostraram variabilidade entre os dois experimentos independentes realizados. Isto pode estar relacionado com variações das amostras de peles e condições de cultura, já que as mesmas foram mantidas, parte do tempo, sem proteção da luz e, o

ácido retinóico, é sensível a luz, ar e calor, especialmente em solução (CLAVIJO & COMES, 2001). Como o objetivo não foi testar os efeitos do ácido retinóico e sim se a pele respondia a um estímulo químico externo, além do SFB, consideraram válidos os dois experimentos realizados com este ativo dermatológico. Para estudo dos efeitos do mesmo *in vitro* no modelo de cultura proposto deve-se realizar um número maior de experimentos.

Diferente do ácido retinóico e SFB, o TGF- α (Transforming growth factor alpha), um estimulante da mitose (FASSIO et al., 1989), não causou qualquer alteração nas amostras de pele em cultura com esta substância. Os fatores que talvez justifiquem o resultado encontrado sejam o tempo de cultura das amostras com esta substância, que foi de apenas 36 horas, e o horário de coleta das amostras, que foi pela manhã.

Na segunda parte deste estudo, procurou-se verificar a manutenção e viabilidade dos melanócitos em cultura e sua atividade bioquímica frente a um estímulo físico (luz UV).

Os melanócitos são células da epiderme distintas e especializadas, responsáveis pela síntese de melanina por ação da tirosinase sobre o aminoácido tirosina e o precursor DOPA. Sob microscopia de luz, estas células são claras e quando incubadas com DOPA tornam-se escuras (ROBINS, 1991), devido à formação da melanina (PEARSE, 1972), o que facilita a identificação histoquímica das mesmas (CARSON, 1990). A técnica combinada de separação da epiderme da derme e incubação com a DOPA facilita, a visualização e contagem dos melanócitos ativos presentes na epiderme, utilizando microscopia de luz, (ROBINS, 1991), uma vez que, a identificação histológica pela coloração de HE é pouco precisa.

A metodologia utilizada foi proposta por SATARICCO e PINKUS (1956), e o pH final da solução de DOPA empregada foi de 7,4 (GILCHREST et al. 1979), no qual ocorre aumento da taxa de reação (PEARSE, 1972) e, conseqüentemente, diminuição no tempo de incubação das amostras de 8 horas para 5 horas (GILCHREST et al. 1979; IMOKAWA & MOTEGI, 1993).

A reação de DOPA, pela sua propriedade de revelar melanócitos reativos, é uma ferramenta útil para estudos morfológicos desta organela, bem como avaliar o efeito de interferentes químicos ou físicos sobre sua bioquímica.

KIMURA & DOI (1998) utilizaram esta metodologia para avaliar a ação clareadora da hidroquinona em peles pigmentadas de cães. Os resultados encontrados por estes autores mostram redução significativa da população de melanócitos. Este método, também foi o escolhido para estudar, em fragmentos de pele, o efeito despigmentante do Skin Whitening Complex® (complexo vegetal clareador com extrato de *Uva ursi*), fabricado pela empresa francesa Alban Muller (PHARMASPECIAL). IMOKAWA & MOTEGI (1993) utilizaram a reação de DOPA para mostrar maior número de melanócitos por mm² em cultura de pele de cobaia tratada com 8-metoxoralen seguida de radiação UVA (PUVA) e KAWAGUCHI et al. (2001), demonstraram aumento do número destas células em epiderme de ratos irradiados com UVB (280 a 320nm).

Para ROWDEN et al. (1975), os melanócitos na pele foram sensíveis as condições de cultura e desaparecem da epiderme dentro de 72 horas. No modelo de cultura utilizado neste trabalho, ao contrário, foi possível demonstrar, através reação de DOPA, a presença dos mesmos durante todo o tempo de estudo. Todavia, ao final do sétimo dia, estas células estão menos reativas mostrando-se mais claras. Semelhante ao resultado encontrado por STARICCO & PINKUS (1956), a figura 12A mostra melanócitos como células com ramificações quase sempre bipolares, das quais saem prolongamentos secundários.

Estas células podem variar no tamanho e na forma, de acordo com a densidade populacional na pele. Nas regiões onde são mais numerosas apresentam prolongamentos curtos. Nos locais com menor população os prolongamentos são longos (PROTA, 1992) e pode ocorrer dimorfismo celular, ou seja, células com grandes corpos celulares e longos e grossos prolongamentos e, entre as mesmas, pequenos melanócitos com poucos e curtos dendritos (STARICCO & PINKUS, 1956).

Nas amostras analisadas, neste estudo, foi observado dimorfismo celular. Isto pode ser explicado pelo fato das amostras de tecido utilizadas terem sido provenientes de cirurgias plásticas para redução de mama, região do corpo que, segundo STARICCO & PINKUS (1956), possuem baixa densidade de melanócitos. A reação de DOPA mostrou ser eficiente na identificação destas células em cultura de pele.

Também foi avaliada a melanina na pele durante os sete dias de experimento. O método histoquímico empregado para estudo da pigmentação foi baseado na redução do nitrato de prata amoniacal para prata metálica pelos grânulos de eumelanina (PROTA, 1992). Este método de identificação da melanina é conhecido como coloração de Fontana-Masson (BANCROFT, 1996), e foi utilizado para avaliar visualmente este pigmento em diferentes tipos de pele (OLSON et al. 1973), sendo útil nos estudos histopatológicos de distúrbios da pigmentação cutânea, como por exemplo, o melasma (KANG et al., 2002).

LEE et al. (2001) propuseram metodologia computadorizada, onde foi possível, através da coloração da melanina pela prata amoniacal, diagnosticar e comparar diferentes distúrbios da pigmentação cutânea, por quantificação do pigmento, uma forma mais acurada que a análise visual. KIMURA & DOI (1998), utilizaram a coloração de Fontan-Masson para demonstrar o efeito despigmentante da hidroquinona, enquanto GOLDSCHMIDT & RAYMOND (1972) o usaram para identificar a distribuição de melanossomas na epiderme nas raças Negróides, Caucasóides e Mongolóides e IMOKAWA & MOTEGI (1993) a distribuição da melanina nos queratinócitos de cobaias tratadas com PUVA.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram a presença do pigmento melânico dentro dos queratinócitos em todos os dias da cultura (Figura 10), com maior concentração na camada basal da epiderme e células subjacentes, que estão em contato com os dendritos dos melanócitos e que recebem os melanossomas recém formados. Nas regiões mais próximas à camada córnea,

observaram-se grânulos de melanina mais dispersos, o que pode ser justificado pela maior degradação dos melanossomas.

Também foi possível observar, na camada espinhosa, concentração deste pigmento na parte apical das células e não na basal, o que leva a maior proteção à radiação UV. No sétimo dia, em algumas regiões, os grânulos de melanina estão presentes formando aglomerados e dificultando a visualização dos queratinócitos individualizados, porém ainda não caracterizando um processo de degeneração acentuado, como mostra a coloração HE (Figura 6E). Estas observações puderam ser confirmadas ao analisar o preparado total de epiderme corado pela prata amoniacal. Foi possível, empregando essa técnica, observar células coradas em negro, devido a presença dos grânulos de melanina dispersos no citoplasma das mesmas. A degeneração destas células, provavelmente, levaria à distribuição da melanina por toda a epiderme, não permitindo mais a identificação de células preservadas.

Nos preparados totais de pele para identificar a melanina, o tempo de permanência da amostra com a solução de prata amoniacal foi reduzido para apenas 1 minuto, segundo testes realizados, pois no tempo de 15 minutos, utilizado nos cortes transversais, forma regiões altamente pigmentadas, provavelmente devido à camada córnea que também cora pela prata amoniacal e forma um fundo negro dificultando a interpretação dos resultados.

A reação de DOPA e Fontana-Masson mostraram ser eficazes na identificação de melanócitos e o pigmento de melanina produzido por ele no modelo de cultura de pele proposto podendo ser utilizadas, ambas as técnicas, em futuros protocolos de estudos onde se deseja avaliar a atividade de ativos cosméticos ou dermatológicos sobre os melanócitos.

A radiação ultravioleta aumentou a melanogênese em cultura de pele (NAKAZAWA et al., 1998) e celular (FRIEDMANN & GILCHREST, 1987 e NAKAZAWA et al., 1998), com alteração da forma, comprimento e número de dendritos dos melanócitos neste último caso (FRIEDMANN & GILCHREST, 1987 e RAMIREZ-BOSCA et al., 1992), dependendo da intensidade da radiação usada e meio de cultura (RAMIREZ-BOSCA et al., 1992).

GILCHREST et al. (1979) observaram em humanos que em regiões expostas cronicamente ao sol ocorre apenas aumento do número de melanócitos DOPA positivos, sem ocorrer qualquer alteração na forma dos mesmos.

No presente estudo, amostras de peles foram irradiadas durante 3 dias consecutivos com radiação ultravioleta com comprimento de onda entre 250 e 400nm e com pico máximo no UVB em 300 e 320nm e no UVA 380nm (Figura 5). A fonte de radiação UV usada foi uma lâmpada Phillips HPA 400S, empregada por esteticistas para bronzamento facial. Os resultados obtidos mostraram que os melanócitos não sofreram nenhuma alteração na forma (aumento do corpo celular e/ou dendritos) e nem na intensidade de reação (vista como aumento da cor). Também não foi observado nenhum aparente aumento de células DOPA positivas.

O emprego da reação Fontana-Masson mostrou, nos fragmentos irradiados, a partir de 96 horas, maior uniformidade na distribuição da melanina em toda a camada basal, isto talvez se deva ao fato da maior intensidade de radiação emitida pela lâmpada HPA 400S ser na faixa do UVA longo (340-400nm) o que, segundo KOLLIAS (1995), induz a distribuição dos melanossomas nos queratinócitos basais. Também foi observada maior aglomeração da melanina na parte apical das células dos fragmentos irradiados, esta distribuição tem como função proteger o núcleo da radiação solar (GILCHREST et al., 1996).

As amostras de pele irradiadas não sofreram alterações na morfologia da epiderme durante todos os sete dias de estudo. Possivelmente, o tempo de exposição das amostras ao UV e a intensidade da radiação empregada, foi insuficiente para provocar modificações na morfologia desta região.

Os resultados obtidos nos diferentes testes deste estudo sugerem que o modelo de cultura de pele proposto é viável para aplicações futuras na avaliação da eficácia e toxicidade de ativos ou produtos tópicos sobre este substrato. Durante os sete dias de estudo a pele manteve a morfologia e respondeu a estímulos químicos. Também, conseguiu-se a manutenção e viabilidade dos melanócitos podendo, com isso, estender a aplicação da

presente técnica de cultura à avaliação de ativos ou produtos tópicos que interfiram com a bioquímica destas células.

7. CONCLUSÕES

Em resumo os resultados obtidos sugerem que:

1. Os fragmentos de pele mantidos em meio Leibovitz à temperatura ambiente e em meio com 5% de CO₂ e 95% de ar são melhores conservados que os mantidos em DMEM a 37°C em ambiente com 5% de CO₂, 40% de O₂ e 55% de N₂.
2. As alterações morfológicas em fragmentos com 20mm² e 2mm² são semelhantes.
3. Os melanócitos apresentam-se ativos durante o período de 7 dias, nas condições do teste e a melanina é detectada nos queratinócitos no mesmo período.
4. Ao contrário do TGF- α , o SFB e o ácido retinóico são capazes de induzir a divisão celular em queratinócitos basais, mostrando que os fragmentos de pele em cultura mantêm a viabilidade.
5. A luz UV não causa alteração visível na morfologia dos melanócitos nem no aumento da produção de melanina, mas induz a redistribuição do pigmento nos queratinócitos.

E, portanto, conclui-se que:

O modelo de cultura de pele proposto mantém as características durante 7 dias, sugerindo que pode ser utilizado para avaliação de toxicidade e eficácia de produtos cosméticos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGIN, P.P.; SAYRE, R.M.; CHEDEKEL, M.R. Photodegradation of phaeomelanin: an *in vitro* model. *Photochem. Photobiol.*, Augusta, v.31, p.359-362, 1980.
- AUGER, F.A.; ROUABHIA, M.; GOULET, F.; BERTHOD, F.; MOULIN, V.; GERMAIN, L. Tissue-engineered human skin substitutes developed from collagen populated hydrated gels: clinical and fundamental applications. *Med. Biol. Eng. Comput.*, Stevenage, v.36, p.801-812, 1998.
- BACKVALL, H.; WASSBERG, C.; BERNE, B.; PONTEN, F. Similar UV responses are seen in a skin organ culture as in human skin in vivo. *Exp. Dermatol.*, v.11, p. 349-356, 2002.
- BAKER, H.; KLIGMAN, A.M. Technique for estimating turnover time of human stratum corneum. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v.95, p.408-411, 1967.
- BANCROFT, J.D.; STEVENS, A.; TURNER, D. *Theory and practice of histological techniques*. 4.ed. Edinburgh, New York: Churchill Livingstone, 1996. p.252-253.
- BARBOSA, A.J.A.; CASTRO, L.P.F.; MARGARIDA, A. A simple and economical modification of the Masson-Fontana methods for staining melanin granules and heterochromaffin cells. *Stain Technol.*, Baltimore, v.59, n.4, p.193-196, 1984.
- BESSOU, S.; SURLÈVE-BAZEILLE, J.E.; PAIN, C.; DONATIEN, P.; TAIEB A. *Ex vivo* study of skin phototypes. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.107, n.5, p.684-688, 1996.
- BOISNIC, S.; BRANCHET-GUMILA, MC; LE CHARPENTIER, Y.; SEGARD, C. Repair of UVA-induced elastic fiber and collagen damage by 0.05%

retinaldehyde cream in an ex vivo human skin model. *Dermatology*, New York, v.199, suppl.1, p.43-48, 1999.

BORRADORI, L.; SONNENBERG, A. Structure and Function of Hemidesmosomes: More than simple adhesion complex. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.12, n.4, p.411-418, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Registro de produtos. *Resolução 79, de 28 de agosto de 2000*. Estabelece normas e procedimentos para registro de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes (D.O.U 31/08/00). Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/legis/especifica_registro.htm. Acesso em: 31 out. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Deliberações. Resoluções. Resolução 196, de 10 de Outubro de 1996. A presente Resolução fundamenta-se nos principais documentos internacionais que emanaram declarações e diretrizes sobre pesquisas que envolvem seres humanos. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/conselho/resol96/RES19696.htm>. Acesso em: 03 abr. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação específica da área. Notificação de produtos. Resolução 335, de 22 de Julho de 1999. Estabelece normas e procedimentos para Notificação de Produtos Grau de Risco 1. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/335_99.htm. Acesso em 31 de outubro de 2002.

BREATHNACH, A.S.; WYLLIE, L.M.A. Osmium iodide positive granules in spinous and granular layers of guinea pig epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.47, n.1, p.58-60, 1966.

- BRIGGAMAN, R.A.; WHEELER, C.E. The epidermal-dermal junction. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.65, n.1, p.71-84, 1975.
- BROWN, W.R. A review and mathematical analysis of circadian rhythms in cell proliferation in mouse, rat, and human epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v; 97, n.2. p.273-80, 1991.
- CARON, G.A. Organ culture of normal and psoriatic skin. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v.97, p.575-585, 1968.
- CARSON, F.L. *Histotechnology a self-instructional text*. Chicago: American Society of Clinical Pathologists (ASCP), 1990. p. 212-213.
- CHAPMAN, S.J.; WALSH, A.; BECKETT, E.; VICKERS, C.F.H. A fully differentiating epidermal model with extended viability: development and partial characterization. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.93, n.6, p.762-768, 1989.
- CHRISTOPHERS, E.; KLIGMAN, A. Visualization of the cell layers of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v., p.407-409, 1964.
- CHURCH, R.L.; PFEIFFER, S.E.; TANZER, M.L. Collagen biosynthesis and secretion of a high molecular weight collagen precursor (procollagen). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Washington D.C., v.68, n.11, p.2638-2642, 1971.
- CLAVIJO, M.J.; COMES, V.B. *Formulário básico de medicamentos magistrais*. Valência: Martín Impresores, 2001, p.41-42.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Legislação e Ética. *Princípios éticos na experimentação animal*. Disponível em: <http://www.meusite.com.br/COBEA/etica.htm#3>. Acesso em: 04 abr. 2003.
- COOMBS, V.A.; NISSEN, B.K.; MARKS, R.; MORRIS, A. The influence of temperature on epidermal cell migration *in vitro*. *Br. J. Ex. Pathol.*, London, v.54, p.673-677, 1973.

- COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO, F.G.; BITTENCOURT-SAMPAIO, S. Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.66, p.143-148, 1976.
- DAMOUR, O.; AUGUSTIN, C.; BLACK A.F. Applications of reconstructed skin model in pharmaco-toxicological trial. *Med. biol. eng. comput.*, Stevenage, v.36, p.825-832, 1998.
- DOWNING, D.T. Função dos lipídios na estrutura epidérmica. *Cosmet. & Toiletries*, São Paulo, v.4, n.2, p.39-44, 1992.
- ELIAS, P.M.; FRIEND, D.S. The permeability barrier in mammalian epidermis. *J. Cell. Biol.*, New York, v.65, p.180-191, 1975.
- ELLER, M.S.; YAAR, M.; GILCHREST, B.A. DNA damage and melanogenesis. *Nature*, London, v.372, p.413-414, 1994.
- FASSIO, JB; BROCKMAN, EB; JUMBLATT, M; GREATON, C; HENRY, JL; GEOGHEGAN, TE; BARR, C; SCHULTZ, G.S. Transforming growth factor alpha and its receptor in neural retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, Hagerstown, v.30, n.9, p.1916-22, 1989.
- FDA. U.S. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Cosmetics. FDA Authority ; Program and Policy. *IS It a Cosmetic; a Drug; or Both?* may 2002 Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/cos-218.html>. Acesso em: 05 nov. 2002.
- FDA. U.S. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Cosmetics. FDA Authority ; Program and Policy. *Animal testing.* may 1999. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/cos-205.html>. Acesso em: 05 nov. 2002.
- FITZPATRICK, T. B.; JOHNSON R. A.; WOLFF K. *Dermatologia atlas e texto.* 4 ed. Lisboa, Rio de Janeiro, Bangkok, Beijing, Bogotá, Caracas, Cidade

do México, Cingapura, Londres, Madri, Milão, Montreal, Nova Deli, Santiago, Seul, Taie, Toronto: McGraw-Hill, 2001, p. 212.

FLAXMAN, B.A.; HARPER, R.A. Organ culture of human skin in chemically defined medium. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.64, p.96-99, 1975.

FORSLIND, B. The Skin: Upholder of physiological homeostasis. a physiological and (bio)physical study program. *Thromb. Res.*, New York, v.80, n.1, p.1-22, 1995.

FRIEDMANN, P.S.; GILCHREST, B.A. Ultraviolet radiation directly induce pigment production by cultured human melanocytes. *J. Cell. Physiol.*, New York, v.133, p.88-94, 1987.

FRITSCH, C.; BATZ, J.; BOLSEN, K.; SCHULTE, K.W.; ZUMDICK, M.; RUZICKA, T. GOERZ, G. *Ex vivo* aplicacion of δ -aminolevulinic acid induces high and specific porphyrin levels in human skin tumors: possible basis for seletive photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, Augusta, v.66, n.1, p.114-118, 1997.

GARTNER, L.P.; HIATT J.L. *Tratado de histologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1999, p. 253-259.

GELFANT, S.; CANDELAS, G.C. Regulation of epidermal mitosis. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.59, n.1, p.7- 12, 1972.

GILCHREST, B.A. Photoprotection and repair – investigation the photo and bichemical reactions governing tanning. *Cosmet. & Toiletries*, Carol Stream, v.111, n.10, p.93-97, 1996.

GILCHREST, B.A.; BLOG, F.B.; SZABO, G. Effects of aging and chronic sun exposure on melanocytes in human skin. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.73, n.2, p.141-143, 1979.

- GILCHREST, B.A.; PARK, H.Y.; ELLER, M.S.; YAAR, M. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem. Photobiol.*, Augusta, v.63, n.1, p.1-10, 1996.
- GILCHREST, B.A.; ZHAI, S.; ELLER, M.S.; Y.D.B.; YAAR, M. Treatment of human melanocytes and s91 melanoma cells with dna repair enzyme t4 endonuclease v enhances melanogenesis after ultraviolet irradiation. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.101, n.5, p.666-672, 1993.
- GILCHREST, B.A.; BLOOM, F.B.; SZABO, G. Effect of aging and chronic sun exposure on melanocytes in human skin. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.73, p.141-143, 1979.
- GOLDFEDER, E.M. *Cultura de órgão (estômago de feto de rato) como método de estudo de proliferação celular: efeito de hormônios*. São Paulo, 1996. 105p. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo.
- GOLDSCHMIDT, H.; KLIGMAN, A.M. Quantitative estimation of keratin production by the epidermis. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v.88, p.709-712, 1963.
- GOLDSCHMIDT, H.; RAYMOND, J.Z. Quantitative analysis of skin color from melanin content of superficial skin cells. *J. Forensic Sci.*, Philadelphia, v.17, 124-131, 1972.
- GOLDSCHMIDT, H.; KLIGMAN, A.M. Exfoliative cytology of human horny layer. Methods of cell and microscopic techniques. *Arch. Derm.*, Chicago, v.96, p.572-576, 1967.
- GOUVEIA, M.C. de B.L.F. Pele, hidratação, emoliência. *Aerosol & Cosméticos*, São Paulo, n.10, p.6-12, 1980.
- GUIDELINES cosmetic products: the rules governing cosmetic products in the European Union: notes of guidance for testing of cosmetic ingredients for

their safety evaluation. Versão 3.05. for Adobe Acrobat Readers. Local: Kotka: European Commisson, 1999. v.3, 1 CD-ROM. Produzido por Granula.

HEARING, V.J.; KORNER, A.M.; PAWELEK, J.M. New regulators of melanogenesis are associated with purified tyrosinase isozymes. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.79, p.16-18, 1982.

HADADD, M.M.; XU W.; MEDRANO, E.E. Aging in epidermal melanocytes: cell cycle genes and melanins. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.3, n.1, p.37-40, 1998.

HERZBERG, A.J.; DINEHART, S.M. Chronologic aging in black skin. *Am. J. Dermatopathol.*, Hagerstown, v.11, n.4, p.319-328, 1989.

HSU, T.C. Tissue culture studies on human skin. iii. some cytological features of the outgrowth of epithelial cells. *Tex. Reports Biol. Med.*, Galveston, v.10, p.336-353, 1952.

IMOKAWA, G.; MOTEGI, I. Skin organ culture model for examining epidermal melanization. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.100, n.1, p.47-54, 1993.

IWATA, M.; CORN T.; IWATA, S.; EVERETT, M.A.; FULLER, B.B. The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.5, n.1, p9-15, 1990.

KAWAGUCHI, Y.; MORI, N.; NAKAYAMA, A. Kit⁺ melanocytes seem to contribute to melanocyte proliferation after uv exposure as precursor cells. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.116, n.6, p.920-925, 2001.

KEDDIE, F.; SAKAI, D. Morphology of the horny cells of the superficial stratum corneum: cell membranes and melanin granules. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.44, n.2, p.135-138, 1965.

- KIELTY, C.M.; SHERRATT, M.J.; SHUTTLEWORTH, A. Elastic fibres. *J. Cell. Sci.*, Cambridge, v.115, p.2817-2828, 2002.
- KIMURA, T.; DOI, K. Efficacy of hydroquinone in the treatment of cutaneous hyperpigmentation in hairless descendants of mexican hairless dogs (*xoloitzcuintli*). *Lab. Anim. Care*, Baltimore, v.48, n.5, p.469-475, 1998.
- KLAUS, S.N. Pigment transfer in mammalian epidermis. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v.100, p.756-762, 1969.
- KLIGMAN, A.M. Cosmecêuticos: a terceira categoria. *Cosmet. & Toiletries*, São Paulo, v.14, n.4, p.72-76, 2002.
- KOBAYASHI, N.; MURAMATSU, T.; YAMASHINA, Y.; SHIRAI, T.; OHNISHI, T.; MORI, T. Melanin reduces ultraviolet-induced dna damage formation and killing rate in cultured human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.101, n.5, p.685-689, 1993.
- KOLLIAS, N. The physical basis of skin color and its evaluation. *Clin. Dermatol.*, Philadelphia, v.13, p.361-367, 1995.
- KOMPAORE, F.; MARTY, J.P.; DUPONT, C. In vivo evaluation of the stratum corneum barrier function in blacks, caucasians and asians whit two noninvasive methods. *Skin Pharmacol.*, Basel, v.6, p.2000-2007, 1993.
- KONDO, S.; HOZUMI, Y.; MITSUHASHI, Y. Comparative inhibitory effects of vitamin d3 and analogue on normal and psoriatic epidermis in organ culture. *Arch. Dermatol. Res.*, Berlin, v.292, P.550-555, 2000.
- KONRAD, K.; WOLFF, K. Hyperpigmentation melanosome size and distribution patterns of melnosomes. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v.107, p.853-860, 1973.
- LAMBALOT, R.P. As radiações ultravioletas a pele. *Aerosol & Cosméticos*, São Paulo, v.24, p.6-14, 1982.

- LAMBERG, S.I.; STOOLMILLER, A.C. Glycosaminoglycans. A biochemical and clinical review. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.63, p.433-449, p.407-409, 1974.
- LEE, E.S.; KIM, J.H.; IM, S.; LEE, K.B.; SOHN, S.; KANG, W.H. Application of computerized image analysis in pigmentary skin diseases. *Int. J. Dermatol.*, Philadelphia, v. 40, p. 45-49, 2001.
- LEIBOVITZ, A. The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Am. J. Hyg.*, Baltimore, v.78, p.173-180, 1963.
- LEVINE, M. The growth of adult humans skin *in vitro*. *Br. J. Dermatol.*, London, v.86, p.481-490, 1972.
- LÜTZOW-HOLM, C.; DE ANGELIS, P.; CLAUSEN, O.P. Retinoic acid provokes a regeneration-like proliferative response in murine epidermis. A bivariate DNA/bromodeoxyuridine flow cytometric study. *Arch Dermatol Res.*, Berlin, v.284, n.7, p.418-23, 1992.
- MAJMUDAR, G.; SMITH, M. *In vitro* screening techniques in dermatology. *Cosmet. & Toiletries*, Carol Stream, v.113, n.4, p.69-74, 1998.
- MALO, C.; ARSENAULT, P.; MÈNARD, D. Organ culture of the intestine of the suckling mouse in a serum-free medium. *Cell Tissue Res.*, Berlin, v.228, p.75-84, 1983.
- MAO-QIANG, M.; BROWN, B. E.; WU-PONG, S.; FEINGOLD, K.R.; ELIAS, P.M. Exogenous nonphysiologic vs physiologic lipids. Divergent mechanisms for correction of permeability barrier dysfunction. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v.131, p.809-816, 1995.
- MAO-QIANG, M.; KENNETH, R.; FEINGOLD, L.D.; PETER, M.E. Exogenous lipids influence permeability barrier recovery in acetone-treated murine skin. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v.129, p.728-738, 1993.

- MASSON, P. A diretiva cosmética européia e suas atualizações. *Cosmet. & Toiletries*, São Paulo, v.11, n.6, p.60-65, 1999.
- MATHEWS, M.B. The interaction of collagen and acid mucopolysaccharides. a model for connective tissue. *Biochem. J*, London, v.96, p.710-716, 1965.
- MATOLTSY, A.G. Keratinization. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.67, p.20-25, 1976.
- MATOLTSY, A.G.; MATOLTSY, M.N. The chemical nature of keratohyalin granules of the epidermis. *J. Cell. Biol.*, New York, v.47, p.593-603, 1970.
- MATOLTSY, A.G. Desmosomes, filaments, and keratohyaline granules: their role in the stabilization and keratinization of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.65, n.1, p.127-142, 1975.
- MELONI, M.; LAVAZZA, M.; FISCHI, W.; ZAVA, S.; DOLFINI, E. *In vitro* efficacy evaluation of cosmetic products: a pool of tests on cultured cells. *Boll. Chim. Farmaceutico*, Milan, v.134, n.9, p.509-517, 1995.
- MOORE, R.J.; WILKINSON, J.B. *Cosmetología de harry*. Madrid: Ediciones Díaz Santos, S.A. 1990. p.3-28.
- MORETTO, P.; SURLEVE-BAZEILLE, J.E.; LICU, D.; MICHELET, C.; STOEDZEL, P. Microanalysis of the human skin structure: preliminary results. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, Pittsburg, n.158, p.386-392, 1999.
- MORISON, W.L. What is the function of melanin? *Arch. Dermatol.*, Chicago, v.121, p.1160-1163, 1985.
- NAKAZAWA, K.; SAHUC, F.; DAMOUR, O.; COLLOMBEL, C.; NAKAZAWA, H. Regulatory effects of heat on normal human melanocyte growth and melanogenesis: comparative study whit UVB. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.110, n.6, p.972-977, 1998.

- ODLAND, G.F. A submicroscopic granular componet in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v., n., p.11-15, 1959.
- OLSON, R.L.; GAYLOR, J.; EVERETT, M.A. Skin color, melanin and erythema. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v.108, p.541-544, 1973.
- OLSON, R.L.; NORDQUIST, J.; EVERETT, M.A. The role of epidermal lysosomes in melanin physiology. *Br. J. Dermatol.*, London, v.83, p.189-199, 1970.
- PEARSE, A.G.E. *Histochemistry theoretical and applied*. 3ª Ed. Edinburgh and London: Churchill Livingstone, 1972, p. 860-862, v. 2.
- PENNEYS, N.S.; FULTON, J.E.; WEINSTEIN, G.D.; FROST P. Location of proliferating cells in human epidermis. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v.1001, p.323-327, 1970.
- PEREIRA, A.M.S.P.; COSTA, N.M.C.; COELHO, P.M.R.A. A utilização de órgãos isolados como método alternativo à experimentação animal em toxicologia - métodos alternativos à experimentação toxicológica, p.1-13, 1998/99. Disponível em: <http://www.fmv.utl.pt/democ/sft/sem9899/G025.htm>. Acesso: 24 jun. 2003.
- PHARMASPECIAL. *Skin Whitening Complex*: complexo clareador SWC. São Paulo: s.n., s.d. p.1-2. [Catálogo].
- PLEWIG, G. Regional differences of cell sizes in the human stratum comeum. part ii – effects of sex and age. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.54, n.1, p.19-23, 1970.
- PLEWIG, G.; MARPLES, R.R. Regional differences of cell sizes in the human stratum corneum. part i . *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.54, n.1, p.13-18, 1970.

- PONEC, M.; BOELSMA, E.; WEERHEIM, A.; MULDER, A.; BOUWSTRA, J.; MOMMAAS, M. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.203, p.211-225, 2000.
- POTTERF, S.B.; HEARING, V.J. Tyrosine transport into melanosomes is increased following stimulation of melanocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Orlando, v.248, p.795-800, 1998.
- PROTA, G. *Melanins and melanogenesis*. London: Academic Press, 1992, 289p.
- PROTA, G. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.75, p.122-127, 1980.
- PRUNIÉRAS, M.; DELESCLUSE, C.; REGNIER, M. The culture of skin a review of theories and experimental methods. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.67, p.58-65, 1976.
- PUGLIESE, P.T. *Physiology of the skin*. Illinois: Allured Publishing Corporation, 1996. 218p.
- RAMIREZ-BOSCA, A.; BERND, A.; WERNER, R.; DOLD, K.; HOLZMANN, H. Effect of the dose of ultraviolet radiation on the pigment formation by human melanocytes in vitro. *Arch. Dermatol. Res.*, Berlin, v.284, p.358-362, 1992.
- REAVEN, E.P.; COX, A.J. Behavior of adult human skin in organ culture – effects of cellophane tape stripping, temperature, oxygen tension, pH and serum. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.50, n.2, p.118-128, 1968.
- RÉGNIER, M.; PATWARDHAN, A.; SCHEYNIUS, A.; SCHMIDT, R. Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and langerhans cells. *Med. biol. eng. comput.*, Stevenage, v.36, p.821-824, 1998.

- RILEY, P.A. Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Oxford, v.29, n.11, p.1235-1239, 1997.
- RIJNKELS, J.M.; WHITELEY, L.O. Time and dose-related ultraviolet b damage in viable pig skin explants held in a newly developed organ culture system. *Photochem. Photobiol.*, Augusta, v.73, n.5, p.499-504, 2001.
- ROBINS, A.S. *Biological Perspectives on Human Pigmentation*. Great Britain: Cambridge University Press, 1991. 253p.
- ROWDEN, G.; LEWIS, M.G.; SHEIKH K.M.; SUMMERLIN, W.T. Long-term organ culture of human skin: an ultrastructural and immunochemical study. *J. Pathol.*, Edinburgh, v.117, p.139-149, 1974.
- SARKANY, I.; GRICE, K.; CARON, G.A. Organ culture of adult human skin. *Int. J. Dermatol.*, Philadelphia, v.77, p.65-76, 1965.
- SARKANY, I.; GAYLARDE, P.M. Ultrastructural changes in human skin maintained in organ culture. *Int. J. Dermatol.*, Philadelphia, v.83, p.572-581, 1970.
- SCHOKET, B.; HEWER, A.; GROVER, P.L.; PHILLIPS, D.H. Formation of dna adduct in human skin maintained in short-term organ culture and treated with coal-tar, creosote or bitumen. *Int. J. Cancer*, New York, v.42, p.622-626, 1988.
- SCHREINER, V.; GOORIS, G.S.; PFEIFFER, S.; LANZENDORFER, G.; WENCK, H.; DIEMBECK, W.; PROKSCH, E.; BOUWSTRA, J. Barrier characteristic of different human skin types investigated with x-ray diffraction, lipid analysis, and electron microscopy imaging. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.114, n.4, p.654-660, 2000.
- SELBY, C.C. An electron microscope study of thin sections of human skin. ii. superficial cell layers of footpad epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.29, p.131-149, 1957.

- SHROOT, B. Epiderme reconstituída. *Cosmet. & Toiletries*, São Paulo, v.4, p.20-21, 1992.
- SMIT, N.P.M.; DER-MEULEN, H.V.; KOERTEN, H.K.; KOLB, R.M.; MOMMAAS, A.M.; LENTJES, E.G.W.M.; PAVEL, S. Melanogenesis in cultured melanocytes can be substantially influenced by L- tyrosine and L- cysteine. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.109, n.6, p.796-800, 1997.
- SMIT, N.P.M.; KOLB, R.M.; LENTJES, E.G.W.; NOZ, K.C.; VAN der MEULEN, H.; KOERTEN, H.K.; VERMEER, B.J.; PAVEL, S. Variations in melanin formation by cultured melanocytes from different skin types. *Arch. Dermatol. Res.*, Berlin, v.290, p.342-349, 1998.
- STARICCO, R.J.; PINKUS, H. Quantative and qualitative data on the pigment cells of adult human epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.28, p.33-44, 1956.
- STEINBERG, D.C. Global Understanding 2000. Toward global harmonization of cosmetic regulation. *Cosmet. & Toiletries*, Coral Stream, v.115, n.8, p.24-27, 2000.
- STEVENS, A.; LEWE, J. *Histologia humana*. 2ª Ed. São Paulo: Manole Ltda, 2001. 408p.
- STEINBERG, D.C. European update. *Cosmet. & Toiletries*, Caral Stream, v.117, n.10, p.16-21, 2002.
- STURM, R.A. Human pigmentation genes and their response to solar UV radiation. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v.422, p.69-76, 1998.
- SZABÓ, G.; GERALD, A.B.; PATHAK, M.A.; FITZPATRICK T.B. Racial differences in the fate of melanossomes in human epidermis. *Nature*, London, v.222, p.1081-1082, 1969.

- SZABÓ, G. The number of melanocytes in human epidermis. *Br. Med. J.* v.4869, London, p.1016-1017, 1954.
- TAMMI, R.; JANSÉN, C.; TAMMI, M. Effects of retinoic acid on adult human epidermis in whole skin organ culture. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v.277, p.276-283, 1985.
- TAMMI, R.; JANSÉN, C. Effect of serum and oxygen tension on human skin organ culture: a histometric analysis. *Acta Dermatovener.*, Stockholm, v.60, p.223-228, 1980.
- TAMMI, R.; MAIBACH, H. Skin organ culture: why? *Int. J. Dermatol.*, Philadelphia, v.26, n.3, p.150-160, 1987.
- TAMMI, R.; JANSÉN, C.T.; SANTTI, R. Histometric análisis of human skin in organ culture. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.73, p.138-140, 1979.
- TAMMI, R.; SANTTI, R. Ultrastructural study of hydrocortisone action in cultured human epidermis. *Int. J. Dermatol.*, Philadelphia, v.106, p.6575, 1982.
- THODY, A.J.; HIGGINS, E.M.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; BURCHILL, S.A.; MARKS, J.M. Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.97, n.2, p.340-344, 1991.
- TODA, K.; PATHAK, M.A.; PARRISH, J.A.; FITZPATRICK, T.B. Alterations of Racial Differences in Melanosome Distribution in Human Epidermis After Exposure to Ultraviolet Light. *Nature*, London, v.236, p.143-145, 1972.
- TROWELL, O.A. The Culture of Mature Organs in a Synthetic Medium. *Exp. Cell Res.*, Orlando, v.3, p.79, 1952.
- TROWELL, O.A. The Culture of Lymphonodes *in vitro*. *Exp. Cell Res.*, Orlando, v.16, p.118-147, 1959.

- UITTO, J. Biochemistry of the Elastic Fibers in Normal Connective Tissues and its Alterations in Diseases. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.72, p.1-10, 1979.
- VAN de SANDT, J.J.; MAAS, W.J.; DOORNINK, P.C.; RUTTEN, A.A. Release of Arachidonic and Linoleic acid metabolites in Skin Organ Cultures as Characteristics of *in vitro* Skin Irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.*, Orlando, v.25, n.1, p.20-28, 1995.
- VARANI, J.; PERONE, P.; GRIFFITHS, C.E.M.; INMAN, D.R.; FLIGIEL, S.E.G.; VOORHEES, J.J. All-Trans Retinoic Acid (RA) Stimulates Events in Organ-Cultured Human Skin that Underlie Repair. *J. Clin. Invest.*, New York, v.94, p.1747-1756, 1994.
- VARANI, J.; PERONE, P.; GRIFFITHS, C.E.; INMAN, D.R.; FLIGIEL, S.E.; VOORHEES, J.J. All-Trans Retinoic Acid (RA) Stimulates Events in Organ-Cultured Human Skin that Underlie Repair. Adult Skin from Sun-protected and Sun-Exposed Sites Responds in an Identical Manner to RA While Neonatal Foreskin Responds Differently. *J. Clin. Invest.*, New York, v.94, n.5, p.1747-56, 1994.
- VIGLIOGLIA, P.A.; RUBIN J. *Cosmiatria II*. Buenos Aires: AP Americana de Publicaciones S.A. 1989. 406p.
- WEINSTEIN, G.D.; FROST P. Methotrexate for Psoriasis – A New Therapeutic Schedule. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v.103, p.33-38, 1971.
- WEINSTEIN, G.D.; BOUCEK R.J. Collagen and Elastin of Human Dermis. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.35, p.227-229, 1960.
- WENCZL, E.; VAN DER SCHANS, G.; ROZA, L.; KOLB, R.M.; TIMMERMAN, A.J.; SMITN, P.M.; PAVEL, S.; SCHOTHORST, A.A. (Pheo)melanin Photosensitizes UVA-Induced DNA Damage in Cultured Human Melanocytes. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.111, n.4, p.678-682, 1998.

- WEST, M. D. The Cellular and Molecular Biology of Skin Aging. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v.130, p. 87-95, 1994.
- WILLIAMS, R.L.; THAKKER, K.M.; JOHN, V.; LIN, E.T.; LIANG-GEE, W.; BENET, L.Z. Nitroglycerin Absorption from Transdermal Systems: formulation effects and Metabolite Concentrations. *Pharm Res*, New York, v.8, n.6, p.744-749, 1991.
- WILMOTT, J.M.; DUGGAN, M.C.; ZNAIDEN, A.P. Tanning Accelerators. In: LOWE N.J.; SHAATH, N.A.; PATHAK, M.A. *Sunscreens – Development, Evaluation, and Regulatory Aspects*. New York: Marcel Dekker, 1997. cap. 23, p.473-495.
- WOLFF, K.; KONRAD, K. Melanin Pigmentation: An in vivo Model for Studies of Melanosome Kinetics Within Keratinocytes. *Science*, Washington, v.174, p.1034-1035, 1971.
- WOLF, R.; WOLF, D.; MORGANTI, P.; RUOCCO, V. Sunscreens. *Clin. Dermatol.*, Philadelphia, v. 19, p.452-459, 2001.
- YOSHIDA, M.; HIDROTSU, S.; NAKAHARA, M.; UCHIWA, H.; TOMITA, Y. Histamine is Involved in Ultraviolet B-Induced Pigmentation of Guinea Pig Skin. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.118, n.2, p.255-260, 2002.
- YOSIPOVITCH, G.; THENG, C.T.S. Asian Skin: its Architecture, Function and Differences from Caucasian Skin. *Cosmet. & Toiletries*, Carol Stream, v.117, n.9, p.57-62, 2002.

De acordo com a NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.