

ARTIGO

<https://doi.org/10.22239/2317-269x.01088>

Ensaio do linfonodo local murino (LLNA) na diferenciação entre a dermatite de contato alérgica e de contato irritante: um estudo da expressão de marcadores de superfície de linfócitos T

Local Lymph node assay in the differentiation between an allergic contact dermatitis and irritation: study of the expression of T lymphocyte surface markers

Bárbara Andréa Fortes dos Santos^{1*}

Edson Roberto Alves de Oliveira^{II}

Marciano Viana Paes^{III}

Fabio Coelho Amendoeira^{IV}

Isabella Fernandes Delgado^V

Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira^{III}

^I Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Instituto de Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{III} Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{IV} Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^V Vice-Presidência de Educação, Informação e Comunicação, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: barbarafortes@hotmail.com

Recebido: 22 nov 2017

Aprovado: 08 ago 2018

RESUMO

Introdução: O ensaio do linfonodo local murino (LLNA) foi desenvolvido como uma alternativa aos testes de Buhler e Maximização. O teste é utilizado com o objetivo de identificar substâncias capazes de induzir dermatite de contato e tem como desfecho a quantificação celular nos linfonodos auriculares. Embora recomendado por agências internacionais envolvidas no desenvolvimento de metodologias alternativas, o LLNA ainda necessita de aprimoramento. **Objetivo:** O objetivo do trabalho foi estudar possíveis diferenças nos padrões de subpopulações linfocitárias entre camundongos tratados com substâncias irritantes e dermosensibilizantes. **Método:** Os animais foram tratados com os sensibilizantes dinitroclorobenzeno (DNCB) e parafenilenediamina (PPD), os irritantes lauril sulfato de sódio (LSS) e tritonX-100 (TX-100), por três dias consecutivos no dorso de ambas as orelhas. As subpopulações foram analisadas por citometria de fluxo e possíveis alterações histopatológicas nas orelhas dos animais foram também analisadas. **Resultados:** Foram observadas diferenças nas células CD4+CD25+ e CD4+CD69+, assim como na proliferação dessas subpopulações. Nenhuma diferença foi vista nos estudos histopatológicos das orelhas dos animais quando tratados com dermosensibilizantes ou irritantes. **Conclusões:** A fenotipagem de linfócitos T pode ser considerada útil no desenvolvimento de possíveis protocolos de ensaios que visem a diferenciação entre substâncias dermosensibilizantes e irritantes. Além disso, os resultados obtidos podem vir a contribuir com o aumento do conhecimento nesta área e auxiliar na busca por um ensaio *in vitro* correlato.

PALAVRAS-CHAVE: Dermatite de Contato; LLNA; Método Alternativo; Vigilância Sanitária

ABSTRACT

Introduction: The Local Lymph Node Assay (LLNA) was developed as an alternative to Buhler and Maximization assays. It is applied to discriminate substances that are able to induce contact dermatitis and the endpoint is cell quantification in mice auricular lymph nodes. Although recommended by international agencies involved in the development of alternative methodologies, LLNA still needs to be improved. **Objective:** In this context, the goal of this study was to investigate possible differences in lymphocyte subpopulation patterns among mice treated with irritants and dermosensitizers. **Method:** Animals were treated with sensitizers dinitrochlorobenzene (DNCB) and paraphenylenediamine (PPD) and irritants sodium lauryl sulfate (SLS) and tritonX-100 (TX-100) for 3 days, using dorsum area of both ears. The percentage of different lymphocyte subpopulations were analyzed by flow cytometry. Ears of animals were also evaluated for possible pathological alterations. **Results:** Differences were observed in CD4+ CD25+ and CD4+ CD69+ cells,



as well as in the proliferation of these subpopulations. The histopathological analysis of the ears showed no difference between the treatment with either dermosensitizers or irritants. **Conclusions:** T lymphocyte phenotyping might still be a useful tool in the development of an assay to differentiate between dermosensitizers and irritants. Moreover, these results may contribute to improving knowledge on this field and helping in the search of a correlate *in vitro* assay.

KEYWORDS: Contact Dermatitis; LLNA; Alternative Method; Sanitary Surveillance

INTRODUÇÃO

As doenças ocupacionais da pele são uma preocupação de saúde pública. A cada ano cresce o número de produtos que se tornam parte do meio ambiente, aumentando assim, a capacidade destes agentes tóxicos de induzir eventos adversos. Além disso, em 2012, somente nos EUA, os custos anuais diretos e indiretos com doenças ocupacionais da pele superaram US\$ 1 bilhão. O custo com tratamentos dermatológicos deverá atingir US\$ 18,5 bilhões por ano até 2018¹.

O desenvolvimento de metodologias visando à predição e o controle de possíveis efeitos adversos de xenobióticos sobre o sistema imunológico é questão pertinente e um desafio importante para a vigilância sanitária. Dentre os efeitos adversos provocados por xenobióticos, as reações de hipersensibilidade são as mais prevalentes^{2,3,4,5}. A dermatite de contato (DC) é uma dermatose inflamatória induzida por agentes químicos. A DC pode ser dividida principalmente em dermatite de contato alérgica (DCA) e dermatite de contato irritante (DCI)⁶. A DCA é um tipo de DC causada por contatos repetidos na pele por pequenas moléculas reativas com peso molecular inferior a 500 Da, denominadas haptenos, provenientes de diversos tipos de agentes químicos, que são reconhecidas pelo sistema imune como antígenos não próprios⁷.

A DCA requer a ativação da imunidade inata e adaptativa e, segundo diversos autores, é principalmente mediada por células T^{6,8}. Fatores genéticos do indivíduo também estão envolvidos no desenrolar dessa doença⁹. A iniciação da dermatite de contato é gerada pela aplicação tópica de sensibilizantes na epiderme como, por exemplo: níquel, cromo, dinitrofluorbenzeno (DNFB) e oxazolina (OXA)^{10,11}. Sendo assim, o mecanismo imunopatológico da DCA ocorre no primeiro contato da pele com o sensibilizante, que por sua vez forma um complexo hapteno-proteína que pode ser reconhecido e capturado pelas células de Langerhans. Essas células quando capturam esse complexo podem então migrar da epiderme para região paracortical dos linfonodos de drenagem. A apresentação desses peptídeos conjugados a haptenos ativam linfócitos T CD8 e T CD4 específicos^{12,13,14}. A reexposição do mesmo hapteno resulta na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pelas células da epiderme, recrutamento de linfócitos T de memória, ativação de células endoteliais e mastócitos, e a infiltração de neutrófilos, todos necessários para este processo inflamatório^{12,15,16}. A etapa final do mecanismo imunológico da DCA corresponde ao término da reação inflamatória. Nessa fase, também são liberadas citocinas, como por exemplo: IL-10, que, ao contrário das que são liberadas nas fases anteriores, estaria mais relacionada com a inibição da reação imunológica^{14,17}.

A DCI, por sua vez, é caracterizada por uma inflamação da pele que ocorre após contato imediato com substâncias irritantes¹⁸.

A resposta imunológica descrita para esta forma de dermatite envolve a imunidade inata. Mais especificamente, um aumento de citocinas pró-inflamatórias de células que compõem a epiderme e derme, como por exemplo: queratinócitos, células de Langerhans, que secretam diversas citocinas¹⁸, entre elas, TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa), GM-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos) e IL-1^{13,19}. No entanto, há controvérsias quanto à participação ou não do sistema imunológico adaptativo na questão da DCI. De fato, algumas substâncias classificadas como irritantes podem induzir proliferação de células da resposta adaptativa^{20,21,22}.

Por muito tempo, a DCI foi definida como uma reação não específica da pele na presença de uma substância irritante. No entanto, hoje, é aceito que o sistema imune desempenha um papel fundamental na iniciação da DCI. Na presença de irritantes podem acontecer alterações fisiopatológicas, como por exemplo: destruição da barreira epitelial, danos celulares e aumento de mediadores pró-inflamatórios^{18,23,24}. Um tipo celular muito importante na resposta imunológica desencadeada por substâncias irritantes são os queratinócitos. Eles liberam citocinas na destruição da barreira epitelial, expressam moléculas de histocompatibilidade de classe II, moléculas de adesão (CD54) e também moléculas coestimulatórias, como por exemplo: CD80 e CD40²⁵. A liberação de citocinas pelos queratinócitos estimula outros queratinócitos e outras células, como as células de Langerhans, e promove a atração de células inflamatórias, ampliando desse modo o processo inflamatório²⁶. As citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo: IL-1 α , IL-1B e TNF- α ²⁷, IL-6, IL-2²⁶ e a quimiocina CCL21, produzidas por células endoteliais linfáticas foram encontradas aumentadas na DCI^{28,29}.

O estudo de subpopulações de linfócitos envolvidas na DCA e ou DCI tem se mostrado promissor. A fenotipagem de linfócitos como método eficaz para diferenciação da DCA e DCI vem sendo estudada. Dentre os estudos de subpopulações de linfócitos, há várias diretrizes propostas e poucas similaridades, o que dificulta a construção de um protocolo comum. Alguns autores demonstraram um aumento de células B, constatado via receptor B220 e CD19 em camundongos expostos a agentes dermosensibilizantes^{30,31}. Lee et al.³² confirmaram apenas parcialmente os resultados dos estudos anteriores, tendo estes autores observado um aumento seletivo no percentual de células B que apresentavam CD86 apenas na exposição a sensibilizantes, mas não obtendo resultados conclusivos sobre CD40³². Neves et al.³³ demonstraram um aumento do receptor de quimiocina CXCR4 e da molécula CD40 *in vitro* em células dendríticas quando tratadas com substâncias sensibilizantes, porém, quando eram tratadas com



substâncias irritantes, a expressão dessas moléculas era regulada negativamente³³.

Há também inúmeras controvérsias no que concerne o estudo da subpopulação de linfócitos T. Em relação às subpopulações de células T CD4 (célula T auxiliar) e ou T CD8 (célula T citotóxica), não há consenso. Enquanto Goutet et al. analisaram e observaram diferenças na expressão da citocina IL-4 e seu receptor em células T CD4³⁴, Lee et al. analisaram apenas a percentagem de células T CD4 e CD8³². Já De Silva et al. analisaram a população de células T totais, utilizando para este fim CD3 e o receptor da citocina IL-2, o CD25 (que junto com CD4 também é o marcador de células T reguladoras)³⁵. Além disso, estudos *in vitro* com células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDC) mostraram ser promissores para avaliar o potencial alérgico de produtos químicos. Battais et al. mostraram que a expressão de moléculas como, MHC II, CD86, CD54 e CD40 em BMDC podem diferenciar alérgenos de não alérgenos e classificar os produtos químicos de acordo com seu potencial alergênico³⁶. Porém é importante ressaltar que na literatura existem poucos artigos nessa área. Desta forma, é evidente que estudos deste tipo ainda são necessários para que os dados já publicados possam ser, não somente reproduzidos, mas também para adicionar conhecimentos fundamentais visando o alcance de um consenso.

Outro aspecto relevante considerando esse tipo de investigação é o uso de animais de laboratório. Embora Asherson e Barnes³⁷ tenham utilizado o camundongo como modelo para a predição da reação de hipersensibilidade, outros estudos foram realizados em cobaias e conseqüentemente os primeiros testes preditivos para reações de hipersensibilidade induzidas por xenobióticos foram desenvolvidos utilizando este animal. No decorrer dos anos, inúmeros ensaios foram propostos e suas aplicabilidades e limitações vêm sendo discutidas até os dias de hoje^{38,39,40,41,42}.

Os testes de Buehler⁴³ e Maximização⁴⁴ foram criados com o objetivo de identificar o potencial de substâncias causarem DCA^{43,44}. Embora tenham sido amplamente utilizados entre as décadas de 1970 e 1980, esses testes apresentavam em comum sérias limitações, tais como: (i.) subjetividade na interpretação dos resultados (por exemplo: avaliação da amplitude do edema local); (ii.) longa duração dos testes (todos realizados em duas fases, com duração total de 25 a 30 dias); (iii.) alto custo e uma demanda de mão de obra considerável; e (iv.) uso de um grande número de animais, que eram submetidos a um grau de estresse considerável^{38,45}. No final da década de 1980, surge o ensaio do Linfonodo Local Murino (LLNA, do inglês *local lymph node assay*), como uma alternativa promissora aos testes convencionais realizados em cobaias.

O LLNA foi primeiramente descrito por Kimber e Weisenberger⁴⁶, como uma alternativa aos testes de Buehler e de Maximização^{47,48,49,50} e foi aceito para fins regulatórios em 2002⁵¹, pelo *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) e pela *Interagency Coordinating Committee for Validation of Alternative Methods* (ICCVAM). Das vantagens deste teste em relação aos seus precursores, listam-se: (i.) o parâmetro final analisado é quantitativo (ou seja, a proliferação de linfócitos

por incorporação de ³H-timidina); (ii.) o teste se passa na fase de sensibilização, e por isso tem uma curta duração (cinco dias); (iii.) características referentes a natureza da substância, tais como cor, não interferem com desfecho do teste; (iv.) o número de animais utilizados por substância-teste é cerca de 50% menor do que nos testes em cobaias e, por fim, (v.) os animais são poupados da dor e do sofrimento decorrentes das reações de fase 2 (fase inflamatória)^{46,52}.

No entanto, o protocolo do LLNA inicialmente aceito para fins regulatórios⁵¹ também apresentava limitações importantes, como por exemplo: a utilização de material radioativo e a presença de resultados falso positivos^{22,53,54,55,56}. Por isso, como processo de aprimoramento do ensaio, foram publicados em 2010, protocolos modificados do LLNA^{57,58}. Além disso, com o banimento definitivo do uso de animais pela indústria de cosméticos na Europa, em 2013⁵⁹, a busca por metodologias *in vitro* se tornou ainda mais urgente. Neste contexto, estratégias de predição, como IATA (do inglês, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*) têm ganhado destaque mundial e a atenção de agências regulatórias⁶⁰. Muitos dos ensaios *in vitro*, que isoladamente não apresentam boa capacidade de predição, quando combinados em bateria de ensaios, apresentam-se como estratégias promissoras. Assim, muitas das estratégias e baterias de ensaios propostas pela comunidade científica têm sido alvo de estudos e avaliações sistemáticas por centros de validação de métodos alternativos, e algumas já ganharam aceitação regulatória, inclusive no campo da dermosensibilização^{57,58,60,61,62,63}.

Agências regulatórias e comunidade científica vêm buscando avançar na construção de consensos, e um deles diz respeito ao uso de novas abordagens para o enfrentamento dos desafios da Toxicologia do século XXI. Para muitos autores, a Toxicologia Regulatória deve lançar mão de abordagens modernas e inovadoras (tais como o uso de *big data* e modelos *in silico*, “*omics*”, *high-throughput*, entre outros) e aprofundar-se em estudos mecânicos para melhor compreender os desfechos toxicológicos que se quer prever^{64,65,66}. Foi neste contexto que o presente trabalho foi conduzido, com o objetivo de investigar o mecanismo da diferenciação entre a DCA e a DCI, através da fenotipagem de linfócitos, e buscar o aprofundamento no estudo das alterações fisiopatológicas envolvidas na execução do teste LLNA.

MÉTODO

Animais

Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA), sob Licença nº P-0415/07, e realizados conforme determinado pelo protocolo *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* (ARRIVE). Os grupos de tratamento foram constituídos por quatro animais para cada substância testada e mais quatro animais controle tratados somente com o veículo. Foram utilizados camundongos fêmeas da cepa CBA com idade entre 8 e 10 semanas pesando em média 17 g. Os animais foram fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) e mantidos no Setor



de Experimentação Animal do Instituto Nacional de Controle em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), em gaiolas de 20 cm x 35 cm x 15 cm. Os animais tinham livre acesso a água e ração, com ciclo diurno e noturno de 12 h com a temperatura controlada (20°C a 26°C) e umidade (30% a 70%). Para o processo experimental, dois animais de cada caixa eram selecionados aleatoriamente para o tratamento com as substâncias e os veículos. Esse tratamento foi realizado sempre no turno diurno, em um fluxo laminar. Com ajuda de uma ponteira, foi aplicado no dorso de ambas as orelhas do animal 25 µl da substância de interesse ou veículo durante três dias consecutivos. Duas horas antes da eutanásia por inalação de CO₂ foi injetado por via intraperitoneal em cada animal 100 mg/Kg de BrdU em 200 µl de salina, conforme protocolo preconizado do LLNA⁵¹.

Reagentes

As substâncias utilizadas foram os sensibilizantes severos: para-fenilenodiamina (PPD, concentração 1%) e Dinitrocrobzeno (DNCB, concentração 1%). Essas substâncias foram diluídas em acetona/óleo de oliva (A/OO 4:1). Irritantes moderadas: lauril sulfato de sódio (LSS, concentração 25%) e Triton® X-100 (TX-100, concentração 25%), diluídas em etanol 30%. Todas as substâncias foram obtidas da Sigma-Aldrich (USA). O reagente BrdU (Bromo-2'-deoxyuridine) também foi obtido da Sigma-Aldrich (USA). Os anticorpos utilizados foram: anti-CD4 Allophycocyanin (APC), anti-CD69 Phycoerythrin (PE), anti-CD25 (PE) e fluoresceiniso-thiocyanate (FITC), anti-CD11a (PE) e anti-BrdU (FITC). Todos foram obtidos da BD Pharmingen, (USA).

Ensaio do LLNA e citometria de fluxo

Após a eutanásia, os linfonodos auriculares foram isolados e macerados com auxílio de um homogeneizador de tecidos para a obtenção de uma suspensão celular. Essa suspensão celular foi centrifugada por 5 min a 300 x g e ressuspensas em PBS/BSA 1%. Em seguida, as células foram contadas com auxílio de uma câmara de Neubauer e ajustadas para 10⁶ células/ml. Em seguida as células foram incubadas por 30 min com os anticorpos anteriormente descritos. Para a marcação com BrdU, as células foram permeabilizadas em 200 µl de etanol 70% a 20°C por 30 min. A suspensão celular foi centrifugada duas vezes por 5 min a 300 xg e incubadas com 100 µl DNase por 40 min a 25°C. Em seguida, as células foram marcadas com anti-BrdU por 20 min a 4°C. As células foram analisadas por citometria de fluxo (FACS-Calibur, Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA). Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa WinMDI (versão 2.9).

Análise histológica

As orelhas dos animais foram removidas e fixadas em solução millonig por 24 h. Em seguida, as orelhas foram desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e incorporados em parafina⁶⁷. Os blocos de parafina contendo as orelhas foram cortados em tamanho de 5 µm e montadas em lâminas de vidro. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio Nikon ECLIPSE E600.

Análise Estatística

Foi utilizado o teste não paramétrico *Mann-Whitney* com o auxílio do programa Graphprism 5.1. Os dados foram estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0,05.

RESULTADOS

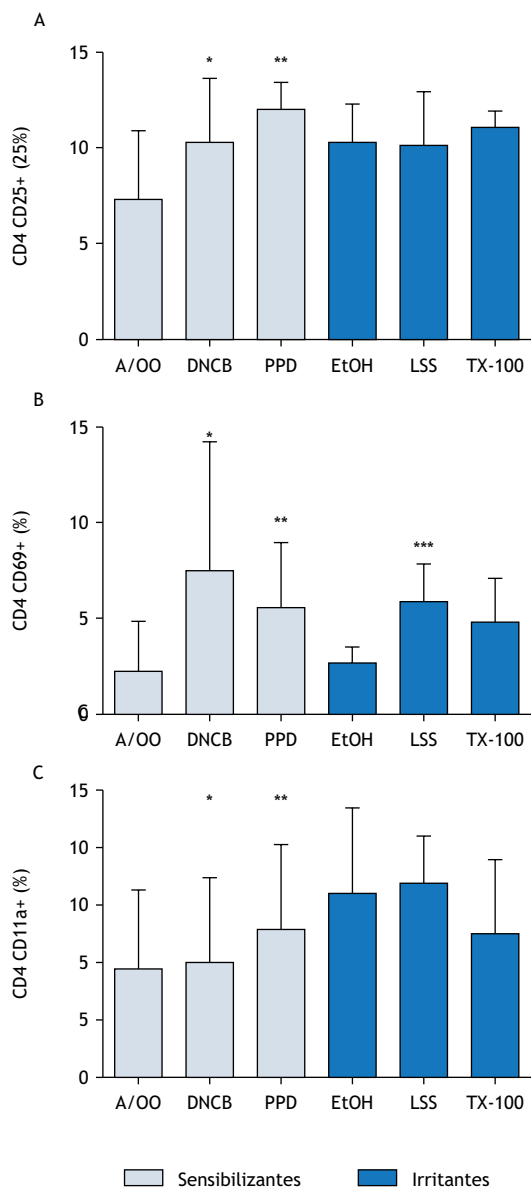
Possíveis marcadores de linfócitos T para diferenciação entre DCA e DCI

As expressões de alguns marcadores de ativação celular, como por exemplo: a cadeia α do receptor IL-2 (CD25) e o CD69, e do marcador de adesão CD11a, que pode aumentar sua intensidade de expressão frente à ativação celular, se mostraram possíveis candidatas à diferenciação entre DCA e DCI (Figura 1). Foi observado um aumento significativo de células CD4+CD25+ em animais que foram tratados com as substâncias dermosensibilizantes DNCB e PPD. Esse aumento também foi observado para as células CD4+CD69+ quando os animais foram tratados com a substância dermosensibilizante PPD. No entanto, quando os animais foram tratados com as substâncias irritantes, o aumento de células CD4+ foi significativo apenas para o marcador de ativação CD69 e esse aumento foi visto apenas na substância LSS em relação ao controle etanol. Não foi observada nenhuma diferença significativa no percentual de células CD4+CD25+. O tratamento com substâncias irritantes, e nem com as substâncias dermosensibilizantes, induziu alterações significativas para o marcador de adesão CD11a.

Embora tenha sido observado um efeito nas subpopulações de células T, ainda era necessário confirmarmos a proliferação dessas células uma vez que o desfecho do LLNA é a proliferação celular (Figura 2). Sendo assim, o próximo passo foi avaliar se o efeito observado em células T se confirmaria quando avaliado o perfil de proliferação por meio da marcação com BrdU. O número absoluto das subpopulações CD4/CD25/BrdU+ e CD4/CD69/BrdU+ foi analisado nos diferentes grupos de tratamento. Observamos algumas diferenças significativas, como por exemplo: o grupo de animais tratado com o DNCB apresentou um aumento na subpopulação CD4+CD69+BrdU+, esse aumento também foi observado para a subpopulação CD4+CD25+BrdU+ em animais tratados com DNCB e PPD, quando comparados aos dados relacionados aos camundongos tratados com o veículo A/OO. Quando os animais foram tratados com as substâncias irritantes, não observamos diferenças significativas entre os grupos LSS e TX-100 e o veículo etanol.

Alterações histológicas das orelhas de camundongos

Diversos trabalhos demonstraram que, após tratamento por três dias consecutivos, a espessura das orelhas dos camundongos é aumentada significativamente, quando comparadas com as dos animais que foram tratados com substâncias dermosensibilizantes e irritantes em relação aos seus controles^{12,13,68,69,70}. Este desfecho vem sendo sugerido na literatura como aprimoramento do LLNA. No entanto, dados sobre a histopatologia comparativa das orelhas dos animais são escassos. No presente trabalho, um exame histopatológico preliminar das orelhas de animais tratados com as substâncias dermosensibilizantes e irritantes foi realizado.

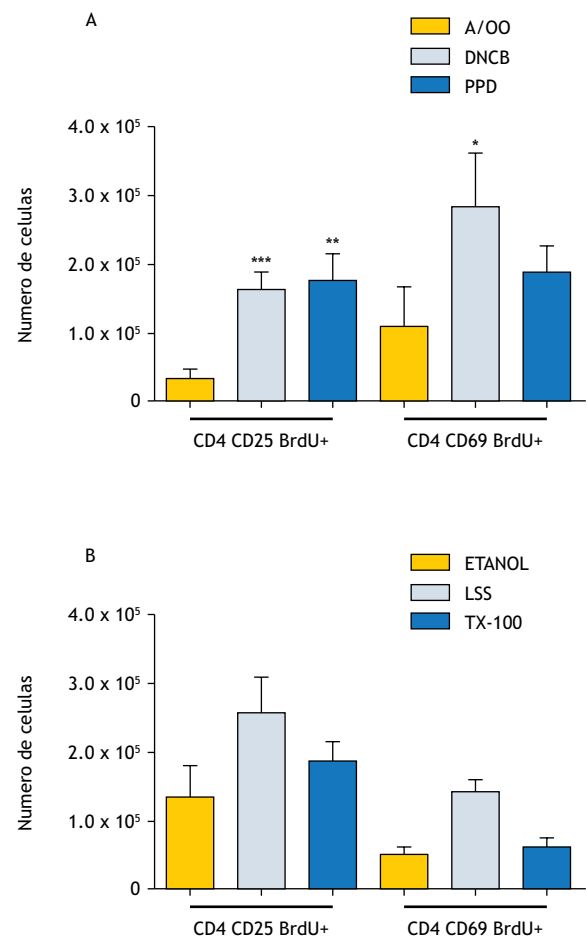


(A) Percentual de células CD4+CD25+ em animais tratados com os dermosensibilizantes DNCB e PPD e o controle A/OO e os irritantes LSS e TX-100 e o controle etanol. (B) Percentual de células CD4+CD69+ em animais tratados com os dermosensibilizantes DNCB e PPD e o controle A/OO e os irritantes LSS e TX-100 e o controle etanol. (C) Percentual de células CD4+CD11a+ em animais tratados com os dermosensibilizantes DNCB e PPD e o controle A/OO e os irritantes LSS e TX-100 e o controle etanol. As barras representam a média + desvio-padrão de três experimentos independentes com quatro animais por grupo.

* $p < 0,050$; ** $p < 0,010$; *** $p < 0,001$ demonstra que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle segundo teste não paramétrico *Mann-Whitney* com índice de confiança de 95%.

Figura 1. Expressão de marcadores de ativação e adesão.

Nos grupos tratados com os veículos etanol e A/OO não foram encontradas alterações patológicas teciduais, a partir do exame histológico (Figura 3A e 3D). Tanto as substâncias dermosensibilizantes (DNCB e PPD) (Figura 3B e 3C) quanto as substâncias irritantes (LSS e Triton X-100) induziram uma hiperplasia da epiderme e infiltrado celular nas orelhas dos animais, conforme demonstrado nas Figuras 3E e 3F.



(A) Aumento significativo das subpopulações CD4+CD25+BrdU+ e CD4+CD69+BrdU+ em animais tratados com DNCB e PPD em relação ao controle A/OO. (B) Aumento não significativo das subpopulações CD4+CD25+BrdU+ e CD4+CD69+BrdU+ em animais tratados com LSS e TX-100 em relação ao controle etanol. As barras representam a média + desvio-padrão de três experimentos independentes com 4 animais por grupo. * $p < 0,050$; ** $p < 0,010$; *** $p < 0,001$ demonstram que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle segundo teste não paramétrico *Mann-Whitney* com índice de confiança de 95%.

Figura 2. Aumento proliferativo de subpopulações.

DISCUSSÃO

Um dos primeiros antígenos de superfície celular expresso pelas células T após a ativação é o CD69. Uma vez expresso nas células, o CD69 atua como uma molécula de coestimulação para a proliferação de células T⁷¹. O CD25 é a cadeia α do receptor IL-2 e expresso em células T e B ativadas. Neste estudo, quando analisamos os linfócitos T em relação aos marcadores de ativação CD25 e CD69, observamos um aumento no número absoluto das células CD4 expressando esses dois marcadores de ativação. Este aumento das células CD4+CD25+ ocorreu nos linfonodos de animais tratados com as substâncias dermosensibilizantes DNCB e PPD e não nas substâncias irritantes testadas. Para a subpopulação de células CD4+CD69+ esse aumento foi visto em animais tratados com a substância PPD e com a substância irritante o LSS. Os dados descritos aqui para as substâncias sensibilizantes estão de acordo com Homey et al.⁷². Estes autores observaram que o tratamento tópico com o dermosensibilizante oxazolina

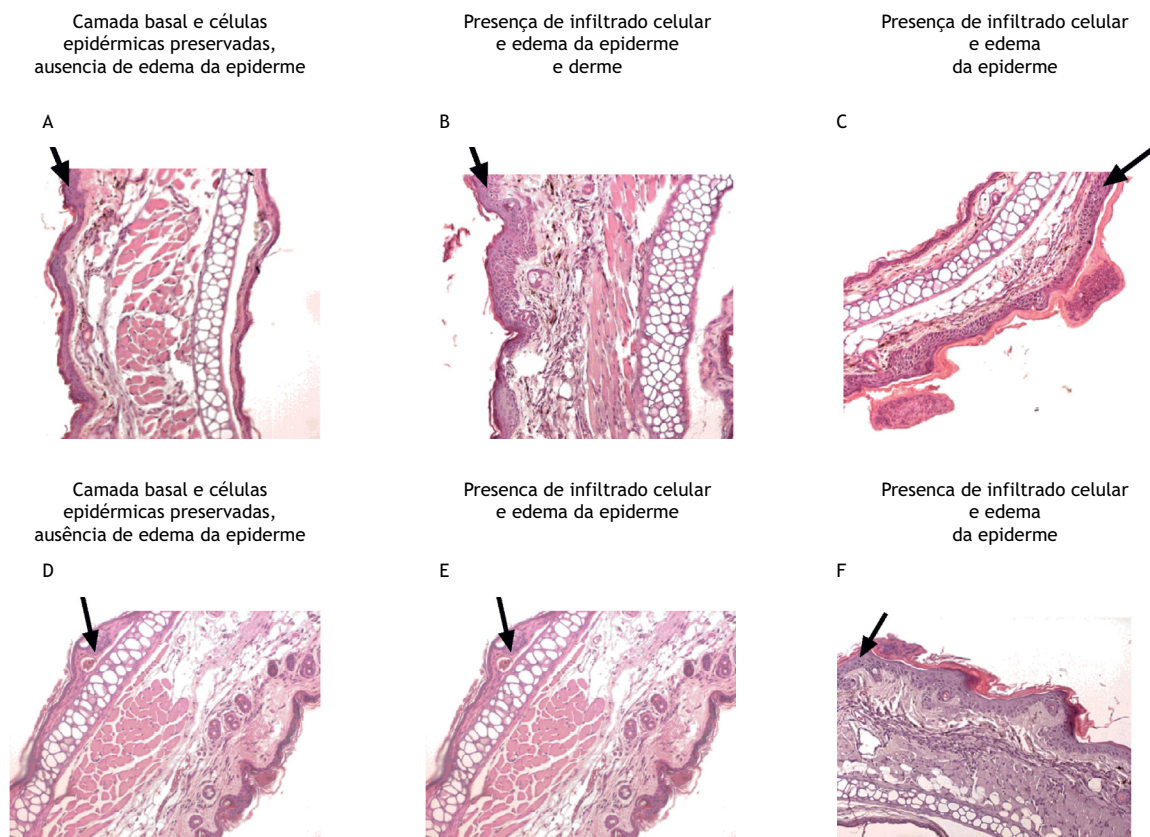


Figura 3. Alteração nas orelhas dos animais. H&E das orelhas dos animais tratados com: (A) veículo A/OO e (D) veículo etanol, ausência de infiltrado inflamatório e edema da epiderme. H&E das orelhas dos animais tratados com (B) DNCB e (E) LSS, presença de infiltrado inflamatório e edema da epiderme. H&E das orelhas dos animais tratados com PPD (C) e (F) TX-100, presença de infiltrado inflamatório e edema da epiderme. Aumento 20X.

provocou um aumento de células expressando os marcadores de ativação CD25 e CD69, quando comparado com o seu controle. Esse aumento foi maior em células CD4+ em relação às células CD8+. Os mesmos autores, ao analisarem substância irritante (óleo de cróton), não observaram um aumento significativo quando comparado com o controle⁷². Em um estudo mais recente, Strauss et al.⁷³ testaram a imunofenotipagem de linfócitos no LLNA comparando diversas substâncias sensibilizantes e irritantes. Nesse estudo, os autores avaliaram marcadores de superfície pan para células B e para células TCD4 e TCD8. Além disso, avaliaram a expressão de CD69 e MHC-II (I-A^b) dentro das subpopulações de linfócitos. Os autores não encontram diferenças no número de células apresentando esses perfis, quando compararam as células de animais tratados com substâncias sensibilizantes ou irritantes. Esses resultados corroboram os achados aqui relatados. Todavia, tendo visto diferença significativa na subpopulação CD4+CD25+ - que não foram referidas no artigo de Strauss et al. - percebemos que ainda há forte possibilidade de encontrarmos na imunofenotipagem um desfecho seguro⁷³. Além disso, outro artigo⁷⁴ que utilizou o Ensaio do Linfonodo Popliteal (também utilizado na avaliação de imunossensibilizantes) indicou dentre outras, a molécula CD25 como um possível marcador para determinação da ativação de células T por substâncias imunossensibilizantes.

Em relação ao marcador BrdU nessas subpopulações, não encontramos diferenças significativas nos linfonodos de animais tratados com LSS e TX-100. Porém, os resultados indicam um aumento

de células CD4+CD69+BrdU+ e CD4+CD25+BrdU+ em animais tratados com a substância LSS em relação ao controle etanol. Embora a grande maioria dos irritantes seja negativa para esse tipo de teste, na literatura científica encontramos artigos que mostram que alguns irritantes induzem acúmulo e proliferação celular, assim como os sensibilizantes^{2,55,75,76}. Jung et al. indicaram um aumento da incorporação de BrdU após tratamento com LSS⁷⁵. No entanto, no que diz respeito aos animais tratados com as substâncias sensibilizantes, observamos um aumento BrdU+ nas células CD4+CD69+ para animais tratados com DNCB, CD4+CD25+ para animais tratados com DNCB e PPD.

Além disso, analisamos possíveis alterações histológicas nas orelhas dos animais para diferenciação da dermatite alérgica e irritante. Nossos dados não mostraram diferenças entre o tratamento com substâncias irritantes e dermosensibilizantes. Lee et al.⁷⁷ observaram um aumento proliferativo com o marcador BrdU nas células da epiderme, em animais tratados com DNCB, TDI, HCA e LSS quando comparados com seus controles. Dubois et al.⁷⁸ analisaram a contribuição das células TCD4 e TCD8 na dermatite de contato alérgica primária, ou seja, indivíduos que podem desenvolver uma dermatite de contato com uma única aplicação de um sensibilizante forte. Usando anticorpos monoclonais, os animais tiveram as células TCD4 e TCD8 depletadas e foram tratados com o dermosensibilizante severo DNFB. Os animais que tiveram as células TCD4 depletadas apresentaram um maior edema da derme e uma significativa infiltração celular, quando comparados com



animais normais tratados com DNFB. Em contraste, os animais sem as células TCD8 não exibiram nenhuma alteração patológica.

Bonneville et al.¹³ mostraram que a resposta a DCA é mais severa em camundongos da cepa C57Bl/6 do que em camundongos da cepa BALB/c. Os camundongos das duas cepas foram tratados com DNFB, e a espessura das orelhas foi avaliada, camundongos da cepa C57Bl/6 após 3 h do tratamento demonstravam um edema maior que os camundongos BALB/c. Da mesma forma, a análise histológica demonstrou que após 6 h do tratamento os camundongos C57Bl/6, revelaram um infiltrado celular na derme e um edema maior dos que os animais BALB/c¹³. Jung et al. mostraram um aumento de peso das orelhas que foram tratadas com LSS e PPD 1%, em relação aos controles e analisando o aspecto histológico encontraram hiperplasia da epiderme e infiltrado inflamatório⁷⁵. Da mesma forma, Ku et al.⁷⁰ mostraram com outros agentes dermosensibilizantes (DNFB e OXA) e o irritante óleo de cróton, que essas substâncias induzem hiperplasia da epiderme e infiltrado

inflamatório. Nossos resultados estão de acordo com os achados de Jung et al.⁷⁵ e Bonneville et al.¹³, tendo sido encontradas as mesmas alterações patológicas, hiperplasia e infiltrado, tanto para as substâncias dermosensibilizantes quanto para irritantes.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram diferenças tanto na fenotipagem quanto na proliferação de linfócitos T em animais tratados com as substâncias dermosensibilizantes DNFB e PPD, quando comparados ao grupo controle A/OO e aos animais tratados com as substâncias irritantes LSS e TX-100. Esses dados são relevantes e podem ser úteis na construção de possíveis estratégias preditivas e protocolos de ensaios para diferenciação entre a DCA e a DCI. Por outro lado, a análise histopatológica de animais tratados topicamente com substâncias dermosensibilizantes e irritantes não parece contribuir de forma significativa para a diferenciação entre agentes dermosensibilizantes e irritantes.

REFERÊNCIAS

1. Wong CC, Gamboni SE, Palmer AM, Nixon RL. Occupational allergic contact dermatitis to chromium from cement: estimating the size of the problem in Australia. *Australas J Dermatol*. 2015;56(4):290-3. <https://doi.org/10.1111/ajd.12238>
2. Basketter DA, Kimber I. Skin irritation, false positives and the local lymph node assay: a guideline issue? *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011;61(1):137-40. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.07.004>
3. Lidén C, Yazar K, Johansen JD, Karlberg AT, Uter W, White IR. Comparative sensitizing potencies of fragrances, preservatives, and hair dyes. *Contact Dermat*. 2016;75(5):265-75. <https://doi.org/10.1111/cod.12683>
4. Chen W, Xing C, Hou F. Intra-laboratory study to determine the reproducibility of LLNA:BrDU-ELISA for the prediction of the skin sensitizing potential of chemicals. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016;82(82):26-30. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.07.003>
5. Lee YS, Yi JS, Seo SJ, Kim JH, Jung MS, Seo IK et al. Comparison of BALB/c and CBA/J mice for the local lymph node assay using bromodeoxyuridine with flow cytometry (LLNA: BrdU-FCM). *Regul Toxicol Pharmacol*. 2017;83:13-22. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.10.021>
6. Shin EJ, Gwak MJ, Jeong KH, Shin MK. Lack of differentiation of allergic and irritation reactions by skin autofluorescence. *Contact Dermat*. 2017;76(5):318-21. <https://doi.org/10.1111/cod.12708>
7. Balmert SC, Donahue C, Vu JR, Erdos G, Falo LD Jr, Little SR. In vivo induction of regulatory T cells promotes allergen tolerance and suppresses allergic contact dermatitis. *J Control Release*. 2017;261:223-33. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.006>
8. Martins LE, Reis VM. Immunopathology of allergic contact dermatitis. *An Bras Dermatol*. 2011;86(3):419-33. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000300001>
9. Schnuch A, Westphal G, Mössner R, Uter W, Reich K. Genetic factors in contact allergy: review and future goals. *Contact Dermat*. 2011;64(1):2-23. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2010.01800.x>
10. Peiser M, Tralau T, Heidler J, Api AM, Arts JH, Basketter DA et al. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(5):763-81. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0846-8>
11. Pongpairoj K, Puangpet P, Thaiwat S, McFadden JP. Diagnosing allergic contact dermatitis through elimination, perception, detection and deduction. *Am J Clin Dermatol*. 2017;18(5):651-61. <https://doi.org/10.1007/s40257-017-0287-8>
12. Hennino A, Saint-Mezard P, Nicolas J, Vocanson M, Dubois B, Chavagnac C et al. Update on the pathophysiology with special emphasis on CD8 effector T cells and CD4 regulatory T cells. *An Bras Dermatol*. 2005;80(4):335-47. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962005000400003>
13. Bonneville M, Chavagnac C, Vocanson M, Rozieres A, Benetiere J, Pernet I et al. Skin contact irritation conditions the development and severity of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2007;127(6):1430-5. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700726>
14. Bonefeld CM, Geisler C, Giménez-Arnau E, Lepoittevin JP, Uter W, Johansen JD. Immunological, chemical and clinical aspects of exposure to mixtures of contact allergens. *Contact Dermat*. 2017;77(3):133-42. <https://doi.org/10.1111/cod.12847>



15. Nosbaum A, Vocanson M, Rozieres A, Hennino A, Nicolas JF. Allergic and irritant contact dermatitis. *Eur J Dermatol.* 2009;19(4):325-32. <https://doi.org/10.1684/ejd.2009.0686>
16. Toebak MJ, Gibbs S, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Rustemeyer T. Dendritic cells: biology of the skin. *Contact Dermat.* 2009;60(1):2-20. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2008.01443.x>
17. Honda T, Otsuka A, Tanizaki H, Minegaki Y, Nagao K, Waldmann H et al. Enhanced murine contact hypersensitivity by depletion of endogenous regulatory T cells in the sensitization phase. *J Dermatol Sci.* 2011;61(2):144-7. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.11.001>
18. Engebretsen KA, Thyssen JP. Skin barrier function and allergens. *Curr Probl Dermatol.* 2016;49:90-102. <https://doi.org/10.1159/000441548>
19. Hogan D, Ledet JJ. Impact of regulation on contact dermatitis. *Dermatol Clin.* 2009;27(3):385-94. <https://doi.org/10.1016/j.det.2009.05.006>
20. Gerberick GF, House RV, Fletcher ER, Ryan CA. Examination of the local lymph node assay for use in contact sensitization risk assessment. *Fundam Appl Toxicol.* 1992;19(3):438-45. [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(92\)90183-1](https://doi.org/10.1016/0272-0590(92)90183-1)
21. Montelius J, Wahlkvist H, Boman A, Fernström P, Gråbergs L, Wahlberg JE. Experience with the murine local lymph node assay: inability to discriminate between allergens and irritants. *Acta Derm Venereol.* 1994;74(1):22-7.
22. Basketter DA. REVIEW Skin sensitization: risk assessment. *Int J Cosmet Sci.* 1998;20(3):141-50. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2494.1998.171746.x>
23. Levin CY, Maibach HI. Irritant contact dermatitis: is there an immunologic component? *Int Immunopharmacol.* 2002;2(2-3):183-9. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00171-0](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00171-0)
24. Slodownik D, Lee A, Nixon R. Irritant contact dermatitis: a review. *Australas J Dermatol.* 2008;49(1):1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1440-0960.2007.00409.x>
25. Tüzün Y, Antonov M, Dolar N, Wolf R. Keratinocyte cytokine and chemokine receptors. *Dermatol Clin.* 2007;25(4):467-76. <https://doi.org/10.1016/j.det.2007.06.003>
26. Watanabe H, Unger M, Tuvel B, Wang B, Sauder DN. Contact hypersensitivity: the mechanism of immune responses and T cell balance. *J Interferon Cytokine Res.* 2002;22(4):407-12. <https://doi.org/10.1089/10799900252952181>
27. Effendy I, Löffler H, Maibach HI. Epidermal cytokines in murine cutaneous irritant responses. *J Appl Toxicol.* 2000;20(4):335-41. [https://doi.org/10.1002/1099-1263\(200007/08\)20:4<335::AID-JAT698>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1099-1263(200007/08)20:4<335::AID-JAT698>3.0.CO;2-L)
28. Eberhard Y, Ortiz S, Ruiz Lascano A, Kuznitsky R, Serra HM. Up-regulation of the chemokine CCL21 in the skin of subjects exposed to irritants. *BMC Immunol.* 2004;5:7. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-5-7>
29. Lee HY, Stieger M, Yawalkar N, Kakeda M. Cytokines and chemokines in irritant contact dermatitis. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:ID916497. <https://doi.org/10.1155/2013/916497>
30. Gerberick GF, Cruse LW, Ryan CA, Hulette BC, Chaney JG, Skinner RA et al. Use of a B cell marker (B220) to discriminate between allergens and irritants in the local lymph node assay. *Toxicol Sci.* 2002;68(2):420-8. <https://doi.org/10.1093/toxsci/68.2.420>
31. Jung KM, Jang WH, Lee YK, Yum YN, Sohn S, Kim BH et al. B cell increases and ex vivo IL-2 production as secondary endpoints for the detection of sensitizers in non-radioisotopic local lymph node assay using flow cytometry. *Toxicol Lett.* 2012;209(3):255-63. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.12.012>
32. Lee JK, Hee Park S, Byun JA, Kim HS, Oh HY. Evaluation of lymphocyte subpopulations in draining lymph node cells following allergen and irritant. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2004;17(2):95-102. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.03.006>
33. Neves BM, Cruz MT, Francisco V, Gonçalves M, Figueiredo A, Duarte CB et al. Differential modulation of CXCR4 and CD40 protein levels by skin sensitizers and irritants in the FSDC cell line. *Toxicol Lett.* 2008;177(1):74-82. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.12.006>
34. Goutet M, Pépin E, Langonné I, Huguet N, Ban M. Identification of contact and respiratory sensitizers using flow cytometry. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;205(3):259-70. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.011>
35. Silva O, Perez MJ, Pineau N, Rougier A, Dossou KG. Local lymph node assay: study of the in vitro proliferation and control of the specificity of the response by FACScan analysis. *Toxicol In Vitro.* 1993;7(4):299-303. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(93\)90018-Z](https://doi.org/10.1016/0887-2333(93)90018-Z)
36. Battais F, Huppert C, Langonné I, Muller S, Sponne I. In vitro detection of chemical allergens: an optimized assay using mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Contact Dermat.* 2017;77(5):311-22. <https://doi.org/10.1111/cod.12829>
37. Asherson GL, Barnes RM. Classification of immunological unresponsiveness and tolerance. *Proc R Soc Med.* 1973;66(5):468-71.
38. Maurer T. Guinea pigs in hypersensitivity testing. *Methods.* 2007;41(1):48-53. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.06.017>
39. Chung H, Quan H, Jung D, Ravi G, Cho A, Kang M et al. Intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the HaCaSens assay: a skin sensitization test using human keratinocytes, HaCaT. *Toxicol Vitro.* 2018;46:304-12. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.10.018>
40. Vliet E, Kühnl J, Goebel C, Martinozzi-Teissier S, Alépée N, Ashikaga T et al. State-of-the-art and new options to assess T cell activation by skin sensitizers: Cosmetics Europe Workshop. *ALTEx.* 2017;35(2):179-92. <https://doi.org/10.14573/altex.1709011>
41. Wareing B, Urbisch D, Kolle SN, Honarvar N, Sauer UG, Mehling A et al. Prediction of skin sensitization potency sub-categories using peptide reactivity



- data. *Toxicol In Vitro*. 2017;45(Pt 1):134-45.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.08.015>
42. Wang J, Suárez-Fariñas M, Estrada Y, Parker ML, Greenlees L, Stephens G et al. Identification of unique proteomic signatures in allergic and non-allergic skin disease. *Clin Exp Allergy*. 2017;47(11):1456-67.
<https://doi.org/10.1111/cea.12979>
43. Buehler EV. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch Dermatol*. 1965;91:171-7.
<https://doi.org/10.1001/archderm.1965.01600080079017>
44. Magnusson B, Kligman AM. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Dermatol*. 1969;52(3):268-76.
<https://doi.org/10.1038/jid.1969.42>
45. Och FM, Vandebriel RJ, Prinsen MK, De Jong WH, Slob W, Loveren H. Comparison of dose-responses of contact allergens using the guinea pig maximization test and the local lymph node assay. *Toxicology*. 2001;167(3):207-15.
[https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00425-5](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00425-5)
46. Kimber I, Hilton J, Weisenberger C. The murine local lymph node assay for identification of contact allergens: a preliminary evaluation of in situ measurement of lymphocyte proliferation. *Contact Dermatitis*. 1989;21(4):215-20.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1989.tb03198.x>
47. Kreiling R, Hollnagel HM, Hareng L, Eigler D, Lee MS, Griem P et al. Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem Toxicol*. 2008;46(6):1896-904.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.019>
48. Omori T, Idehara K, Kojima H, Sozu T, Arima K, Goto H et al. Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2008;58(1):11-26.
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2008.05.001>
49. Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N et al. Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol*. 2016;36(9):1150-62.
<https://doi.org/10.1002/jat.3281>
50. Organization for Economic Cooperation and Development - OECD. OECD Guidelines for testing of chemicals, section 4: test no. 406: skin sensitisation. 1992[acesso 20 nov 2017]. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en
51. Organization for Economic Cooperation and Development - OECD. Skin sensitisation: local lymph node assay. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development; 2002. (OECD Guideline for the testing of chemicals, 429).
52. Kimber I, Weisenberger C. A murine local lymph node assay for the identification of contact allergens. Assay development and results of an initial validation study. *Arch Toxicol*. 1989;63(4):274-82.
<https://doi.org/10.1007/BF00278640>
53. Hans-Werner V, Jürgen AH. The local lymph node assay being too sensitive? *Arch Toxicol*. 2005;79(12):721-8.
<https://doi.org/10.1007/s00204-005-0005-9>
54. Yamashita K, Shinoda S, Hagiwara S, Miyazaki H, Itagaki H. Unsaturated fatty acids show clear elicitation responses in a modified local lymph node assay with an elicitation phase, and test positive in the direct peptide reactivity assay. *J Toxicol Sci*. 2015;40(6):843-53.
<https://doi.org/10.2131/jts.40.843>
55. Arancioglu S, Ulker OC, Karakaya A. Utilization of the ex vivo LLNA: BrdU-ELISA to distinguish the sensitizers from irritants in respect of 3 end points-lymphocyte proliferation, ear swelling, and cytokine profiles. *Int J Toxicol*. 2015;34(1):24-30.
<https://doi.org/10.1177/1091581814560613>
56. Roberts DW, Api AM, Aptula AO. Chemical applicability domain of the Local Lymph Node Assay (LLNA) for skin sensitisation potency. Part 2. The biological variability of the murine Local Lymph Node Assay (LLNA) for skin sensitisation. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016;80:255-9.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.07.013>
57. Organization for Economic Cooperation and Development - OECD. Skin sensitization: local lymph node assay. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development; 2010. (OECD Guideline for testing of chemicals, 4442a).
58. Organization for Economic Cooperation and Development - OECD. Sensitization: local lymph node assay: BrdU-ELISA. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development; 2010. (OECD Guideline for testing of chemicals, 442b)
59. EU: final ban on animal experiments for cosmetic ingredients implemented. *ALTEX*. 2013;30(2):268-9.
60. Organization for Economic Cooperation and Development - OECD. Guidance document on the reporting of defined approaches and individual information sources to be used within integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitisation. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development; 2016.
61. Organization for Economic Cooperation and Development - OECD. Chemico skin sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Paris: Organization for Economic Cooperation and Development; 2010. (OECD Guideline for testing of chemicals, 442c)
62. Organization for Economic Cooperation and Development - OECD. In vitro skin sensitisation : ARE-Nrf2 Luciferase test method. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development; 2010. (OECD Guideline for testing of chemicals, 442d)
63. Pamies D, Hartung T, Barroso J, Casey W, Delgado I, Kim TS et al. Standardisation of defined approaches for skin sensitisation testing to support regulatory use and international adoption: position of the International Cooperation on Alternative Test Methods. *Arch Toxicol*. 2018;92(2):611-7.
<https://doi.org/10.1007/s00204-017-2097-4>
64. Pamies D, Hartung T. 21st Century cell culture for 21st Century Toxicology. *Chem Res Toxicol*. 2017;30(1):43-52.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00269>
65. Hartung T. Utility of the adverse outcome pathway concept in drug development. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017;13(1):1-3.
<https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1246535>



66. Hartung T, Hoffmann S, Stephens M. Mechanistic validation. *ALTEX*. 2013;30(2):119-30. <https://doi.org/10.14573/altex.2013.2.119>
67. Póvoa TF, Oliveira ERA, Basílio-de-Oliveira CA, Nuovo GJ, Chagas VLA, Salomão NG et al. Peripheral organs of dengue fatal cases present strong pro-inflammatory response with participation of IFN-Gamma-, TNF-Alpha and RANTES-producing cells. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168973.
68. O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, Andrian UH. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol*. 2006;7(5):507-16. <https://doi.org/10.1038/ni1332>
69. Larsen JM, Geisler C, Nielsen MW, Boding L, Von Essen M, Hansen AK et al. Cellular dynamics in the draining lymph nodes during sensitization and elicitation phases of contact hypersensitivity. *Contact Dermat*. 2007;57(5):300-8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01230.x>
70. Ku HO, Jeong SH, Kang HG, Pyo HM, Cho JH, Son SW, et al. Gene expression profiles and pathways in skin inflammation induced by three different sensitizers and an irritant. *Toxicol Lett*. 2009;190(2):231-7. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.022>
71. Cortés JR, Sánchez-Díaz R, Bovolenta ER, Barreiro O, Lasarte S, Matesanz-Marín A et al. Maintenance of immune tolerance by Foxp3 regulatory T cells requires CD69 expression. *J Autoimmun*. 2014;55:51-62. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.05.007>
72. Homey B, Schilling C, Blümel J, Schuppe HC, Ruzicka T, Ahr HJ et al. An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998;153(1):83-94. <https://doi.org/10.1006/taap.1998.8535>
73. Strauss V, Kolle SN, Honarvar N, Dammann M, Groeters S, Faulhammer F et al. Immunophenotyping does not improve predictivity of the local lymph node assay in mice. *J Appl Toxicol*. 2015;35(4):434-45. <https://doi.org/10.1002/jat.3042>
74. Tuschl H, Landsteiner HT, Kovac R. Application of the popliteal lymph node assay in immunotoxicity testing: complementation of the direct popliteal lymph node assay with flow cytometric analyses. *Toxicology*. 2002;172(1):35-48. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00583-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00583-2)
75. Jung KM, Bae IH, Kim BH, Kim WK, Chung JH, Park YH et al. Comparison of flow cytometry and immunohistochemistry in non-radioisotopic murine lymph node assay using bromodeoxyuridine. *Toxicol Lett*. 2010;192(2):229-37. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.10.024>
76. Basketter D, Darlenski R, Fluhr JW. Skin irritation and sensitization: mechanisms and new approaches for risk assessment. *Skin Pharmacol Physiol*. 2008;21(4):191-202. <https://doi.org/10.1159/000135635>
77. Lee JK, Park JH, Kim HS, Chung ST, Eom JH, Nam KT et al. Evaluation of cell proliferation in ear and lymph node using BrdU immunohistochemistry for mouse ear swelling test. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2003;14(1-2):61-8. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(03\)00025-5](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(03)00025-5)
78. Dubois B, Chapat L, Goubier A, Papiernik M, Nicolas JF, Kaiserlian D. Innate CD4+CD25+ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8+ T cells mediating skin inflammation. *Blood*. 2003;102(9):3295-301. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0727>

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada. Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.