

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIVINO MARTINS DE OLIVEIRA JUNIOR

RESPOSTAS CELULARES À CORANTES REATIVOS POR MÉTODOS *IN VITRO*

CURITIBA  
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIVINO MARTINS DE OLIVEIRA JUNIOR

RESPOSTAS CELULARES À CORANTES REATIVOS POR MÉTODOS *IN VITRO*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, no Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Dorly de Freitas Buchi

CURITIBA  
2015

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Oliveira Junior, Divino Martins de  
Respostas celulares à corantes reativos por métodos *in vitro*. / Divino  
Martins de Oliveira Junior. – Curitiba, 2015.  
72f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Dorly de Freitas Bucchi  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Molecular.

1. Corantes. 2. Pele-Inflamação. 3. Microscopia eletrônica . I. Título  
II. Bucchi, Dorly de Freitas. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Molecular.

CDD (20. ed.) 574.87

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná  
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

---

## DECLARAÇÃO

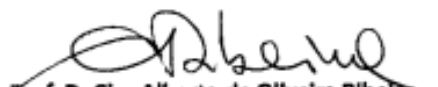
Declaramos para os devidos fins que **Divino Martins de Oliveira Junior**, no dia 20 de Março de 2015, no Setor de Ciências Biológicas (UFPR) defendeu sua Dissertação de Mestrado em Biologia Celular, intitulada: "Verificação de respostas inflamatórias à corantes reativos por métodos *in vitro*", com a banca examinadora composta pelos professores: Drs. Daniela de Almeida Cabrini (Depto. Farmacologia da UFPR), Michel Fleith Otuki (Depto. De Farmacologia da UFPR), e Dorly de Freitas Buchi (Depto. de Biologia Celular da UFPR, como orientadora e presidente da Banca Examinadora), e foi Aprovado.

A solicitação de emissão do Diploma de Mestre em Biologia Celular e Molecular ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Esta declaração tem validade de 60 (sessenta) dias.



Curitiba, 20 de Março de 2015

  
Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro  
Coord. do Programa de Pós-Graduação  
Em Biologia Celular e Molecular  
Matr./UFPR 104132

Dedico este trabalho à minha família,  
fonte de tudo que sou e tudo que poderei ser algum dia.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ser essência e essencial em minha vida, proporcionando os mais maravilhosos acontecimentos com a sua luz.

Ao anjo da minha vida, Nathália Scarlati, por toda dedicação, companheirismo, amor e paciência dedicados a mim.

À minha mãe Tiana, por todo amor, educação, incentivo em todos os momentos da minha vida, por se fazer sempre presente e dividir comigo toda benevolência que brota de sua alma.

Ao meu pai Divino, o seu exemplo de vida e a sua força sempre foram os alicerces para que eu conseguisse chegar até aqui. O meu eterno amor e gratidão.

Aos meus irmãos Franklin e Wesley, cunhadas Margareth e Edileine, por todo amor, carinho, apoio, amizade, compreensão, paciência e por todas as risadas.

À Profa. Dra. Dorly de Freitas Buchi, orientadora deste trabalho, pela confiança desde o surgimento de todas as ideias envolvidas, por todo apoio e estímulo ao meu desenvolvimento científico e intelectual.

À Profa. Dra. Daniela Leme, por ceder os corantes têxteis utilizados neste trabalho.

À Profa. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco, por todo apoio durante o desenvolvimento das técnicas de microscopia eletrônica de varredura e toda equipe de funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Ao Prof. Juarez Gabardo, pelo apoio às análises estatísticas.

Aos Professores Edvaldo da Silva Trindade e Carolina Camargo, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos do LIPS e LCIN, Katia Fialho, Flávia Santi, Cleber Costa, Gustavo Rossi, Jenifer Pendiuk Gonçalves, Stellee Biscaia, Daniel Belan, Ana Gracher, Maria Luiza Ferreira, Thais Tirado e Bruno Gomes pela amizade, companheirismo e pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular e Molecular, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

À Universidade Federal do Paraná e ao Setor de Ciências Biológicas desta Universidade.

À CAPES e CNPQ, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte.”

**Albert Einstein (1879 – 1955)**

## RESUMO

A pele, o maior órgão do corpo humano, principal interface entre o organismo e o meio ambiente, está constantemente exposta a fatores físicos, químicos e biológicos. Essas interações podem ocorrer de forma exacerbada e prejudicial, resultando em reações adversas, como processos inflamatórios cutâneos. Dentre o grupo de substâncias que podem apresentar riscos à saúde humana via exposição dérmica, têm-se os corantes têxteis. Inúmeros corantes têm sido empregados no tingimento de tecidos, entretanto, estudos têm mostrado que diversos grupos de corantes comumente utilizados são capazes de induzir efeitos deletérios aos organismos expostos, por exemplo, danos no DNA e reações alérgicas. O fato dos vestuários poderem conter substâncias químicas nocivas e o conhecimento de que, mesmo após sucessivas lavagens, os corantes são capazes de migrarem e penetrarem na pele em casos de transpiração intensa, a necessidade de uma melhor avaliação da segurança destes produtos tem se mostrado relevante e de caráter imediato. Métodos alternativos à experimentação animal (métodos *in vitro*) são atualmente utilizados para avaliar o potencial nocivo de diferentes produtos, tanto pelo setor acadêmico como industrial. O objetivo desse trabalho foi avaliar as respostas celulares relacionados a um possível processo inflamatório de dois corantes têxteis [*Reactive Red 120* (RR120) – grupo azo e *Reactive Blue 19* (RB19) – grupo antraquinona] comumente empregados no tingimento de fibras de algodão. A fim de mimetizar a via de exposição dérmica foram utilizadas duas linhagens celulares murinas, fibroblastos (BALB 3T3) e macrófagos (RAW 264.7). Para tanto, após a definição da faixa de concentração tóxica de cada corante teste por ensaios de citotoxicidade (MTT e NRU), foram avaliadas a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em conjunto com a detecção e quantificação de citocinas inflamatórias. A condição geral das células da pele foi determinada pela avaliação da morfologia celular através de técnicas de microscopia de luz e eletrônica de varredura. Para a análise estatística foi utilizada a análise de variância ANOVA seguido do teste de Tukey. As culturas celulares expostas a estes corantes por 24 horas mostraram, tanto através da microscopia de luz quanto na eletrônica de varredura, que os corantes em estudo possuem ação citotóxica nas concentrações acima de 500 µg/ml. As duas linhagens celulares aumentaram a liberação de ROS, com maior destaque para o corante RB19. A ação inflamatória dos corantes RR120 e RB19 foi então detectada nos fibroblastos pelo aumento na liberação das proteínas *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) e IL-6, caracterizando uma resposta imunológica do tipo celular. Já nos macrófagos, foram detectados aumento na liberação de IL-10, inibidora da resposta imunológica do tipo celular e ativadora de linfócitos B, e diminuição na liberação de MCP-1 e TNF, caracterizando uma resposta imunológica do tipo humoral. Estes resultados indicam que os corantes RR120 e RB19 podem ser nocivos quando em contato com o tecido cutâneo em concentrações acima de 500 µg/ml. Nos permite concluir também que o potencial de uma substância química em causar respostas inflamatórias cutâneas possa ser previsto com testes *in vitro*, através da utilização de técnicas como microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura, testes bioquímicos básicos e citometria de fluxo, métodos alternativos a serem considerados na substituição à experimentação animal.

Palavras-chave: corantes têxteis reativos; células de pele murina *in vitro*; respostas inflamatórias; exposição dérmica.

## ABSTRACT

The skin, the largest organ of the human body, the main interface between the organism and the environment, constantly exposed to physical, chemical and biological factors. These interactions may occur exacerbated and harmful, resulting in adverse reactions, such as skin inflammation. Among the group of substances that may pose risks to human health through dermal exposure, have been the textile dyes. Numerous dyes have been used in fabric dyeing, however, studies have shown that various dyes groups commonly used are capable of inducing deleterious effects to the exposed organisms, for example, DNA damage and allergic reactions. The fact of garments may contain harmful chemicals and the knowledge that, even after repeated washings, the dyes are able to migrate and penetrate the skin in cases of heavy sweating, the need for better safety assessment of these products has proven relevant and immediacy. Alternative methods to animal experiments (*in vitro* methods), currently used to evaluate the harmful potential of different products, both by academia and industry. The objective of this study was to evaluate the cellular responses related to a possible inflammatory process of two textile dyes [Reactive Red 120 (RR120) – azo group and Reactive Blue 19 (RB19) – anthraquinone group] commonly used in the dyeing of cotton fibres. To mimic via of dermal exposure were used two murine cell lines, fibroblasts (BALB 3T3) and macrophages (RAW 264.7). To this end, after defining the range of toxic concentration of each dye test for cytotoxicity assays (MTT and NRU) were evaluated the production of reactive oxygen species (ROS) in conjunction with the detection and quantification of inflammatory cytokines. Determined the general condition of the skin cells by evaluation of cell morphology by techniques of light and scanning electron microscopy. For statistical analysis, we used the ANOVA followed by Tukey test. Cell cultures exposed to these dyes for 24 hours showed both through light microscopy and scanning electron, the dyes studied have cytotoxic action at concentrations above 500 µg/ml. Both cell lines increased the release of ROS, most notably the RB19 dye. Detected the inflammatory action of RB19 and RR120 dyes in fibroblasts by increasing the release of Monocyte Chemoattractant Protein-1 proteins (MCP-1) and IL-6, featuring an immune response of cellular type. However in macrophages were detected increase in the release of IL-10, an inhibitor of immune response on the cell type and activating B-lymphocytes, and reduction in release of MCP-1 and TNF, featuring an immune response of humoral type. These results indicate that the RR120 and RB19 dyes can be harmful when in contact with the skin tissue at concentrations above 500 µg/ml. Also allows us to conclude that the potential of a chemical to cause cutaneous inflammatory responses can be predicted with *in vitro* tests, using techniques such as light microscopy, scanning electron microscopy, basic biochemical tests and flow cytometer, alternative methods to consider in the replacement of animal experiments.

Key words: reactive textile dyes; murine skin cells *in vitro*; inflammatory responses; dermal exposure.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica da pele e seus apêndices. Adaptado de Costin & Hearing, 2007.....	15
Figura 2. Estrutura química do corante têxtil <i>Reactive Red</i> 120 (RR120).....	27
Figura 3. Estrutura química do corante têxtil <i>Reactive Blue</i> 19 (RB19).....	28
Figura 4. Equilíbrio da mistura de transpiração e corante residual. Adaptado de Brookstein, 2009.....	29
Figura 5. Efeitos dos corantes reativos têxteis na viabilidade celular de fibroblastos murinos BALB 3T3.....	38
Figura 6. Efeitos dos corantes reativos têxteis na viabilidade celular de macrófagos murinos RAW 264.7.....	40
Figura 7. Análise morfológica de fibroblastos murinos (BALB 3T3) após 24h de exposição aos corantes RR120 e RB19.....	43
Figura 8. Análise morfológica de macrófagos murinos (RAW 264.7) após 24h de exposição aos corantes R120 e RB19.....	44
Figura 9. Análise morfológica de fibroblastos murinos (BALB 3T3) após 24h de exposição aos corantes RR120 e RB19.....	46
Figura 10. Análise morfológica de macrófagos murinos (RAW 264.7) após 24h de exposição aos corantes R120 e RB19.....	47
Figura 11. Análise morfológica de fibroblastos murinos (BALB 3T3) em situação controle (PBS 1% v/v).....	48
Figura 12. Análise morfológica de fibroblastos murinos (BALB 3T3) após 24h de exposição ao corante RR120.....	49

Figura 13. Análise morfológica de fibroblastos murinos (BALB 3T3) após 24h de exposição ao corante RB19.....	50
Figura 14. Análise morfológica de macrófagos murinos (RAW 264.7) em situação controle (PBS 1% v/v).....	52
Figura 15. Análise morfológica de macrófagos murinos (RAW 264.7) após 24h de exposição ao corante RR120.....	53
Figura 16. Análise morfológica de macrófagos murinos (RAW 264.7) após 24h de exposição ao corante RB19.....	54
Figura 17. Efeitos dos corantes reativos têxteis na produção de espécies reativas de oxigênio em fibroblastos murinos BALB 3T3.....	55
Figura 18. Efeitos dos corantes reativos têxteis na produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos murinos RAW 264.7.....	56
Figura 19. Efeitos dos corantes reativos têxteis na secreção de citocinas inflamatórias em fibroblastos murinos BALB 3T3.....	57
Figura 20. Efeitos dos corantes reativos têxteis na secreção de citocinas inflamatórias em macrófagos murinos RAW 264.7.....	58

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIT	- Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção
ANOVA	- Análise de variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BraCVAM	- Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos
CI	- <i>Colour Index</i>
CO <sub>2</sub>	- Dióxido de carbono
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMS	- Diferença mínima significativa
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
ETAD	- Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers
GM-CSF	- <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
IFN- $\gamma$	- Interferão-gama
IL-1	- Interleucina 1
IL-3	- Interleucina 3
IL-4	- Interleucina 4
IL-5	- Interleucina 5
IL-6	- Interleucina 6
IL-8	- Interleucina 8
IL-10	- Interleucina 10
IL-12p70	- Interleucina 12 subunidade p70
IL-13	- Interleucina 13
JDE	- Junção Dermo-Epidérmica
LPS	- Lipopolissacarídeo
MCP-1	- <i>Monocyte Chemotactic Protein 1</i>
M-CSF	- <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MEC	- Matriz extracelular
mRNA	- RNA mensageiro
MTT	- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NO	- Óxido Nítrico

NRU	- <i>Neutral Red Uptake</i>
OECD	- <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
PAMP	- <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline</i>
RB19	- <i>Reactive Blue 19</i>
REACH	- <i>Registration, Evaluation, Authorisation &amp; restriction CHemicals</i>
RENAMA	- Rede Nacional de Métodos Alternativos
ROS	- <i>Reactive Oxygen Species</i>
RR120	- <i>Reactive Red 120</i>
RUV	- Radiação Ultravioleta
TGF- $\beta$	- Fator transformador de crescimento beta
TLR	- <i>Toll-Like Receptors</i>
TNF	- Factor de necrose tumoral
VN	- Vermelho Neutro

## SUMÁRIO

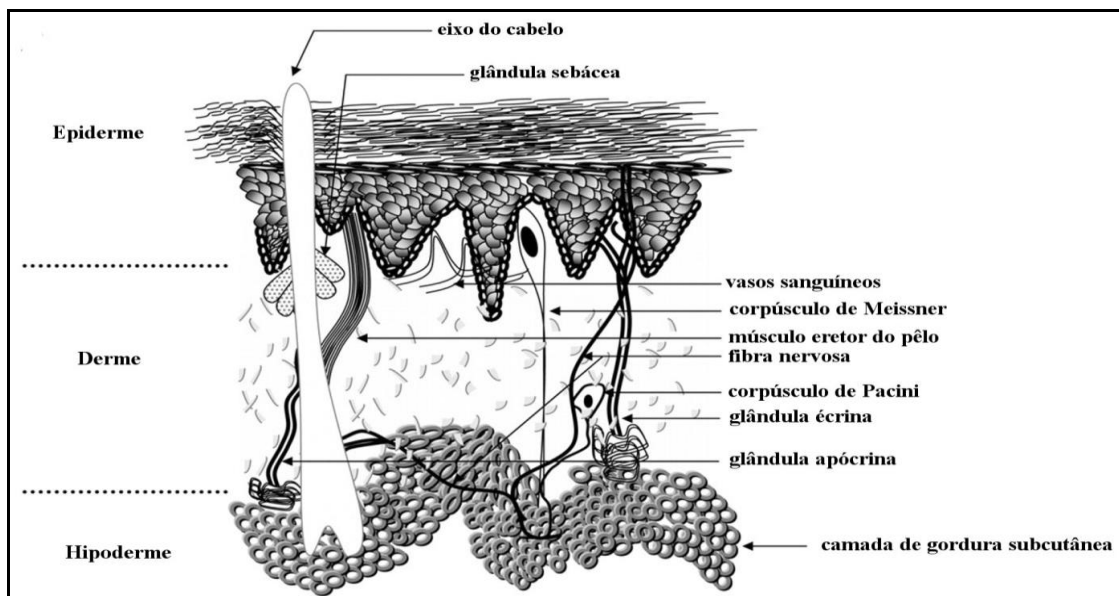
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1. A PELE	15
1.1.1. <i>Epiderme</i>	16
1.1.2. <i>Derme</i>	17
1.1.3. <i>Junção Dermo-Epidérmica</i>	18
1.2. RESPOSTA INFLAMATÓRIA CUTÂNEA	18
1.3. A PELE COMO PARTE DO SISTEMA IMUNOLÓGICO	20
1.4. CORANTES TÊXTEIS	23
1.4.1. <i>A indústria têxtil no Brasil e no mundo</i>	23
1.4.2. <i>Corantes têxteis reativos e fibras têxteis</i>	25
1.4.2.1. <i>Azo Corantes</i>	26
1.4.2.2. <i>Corantes Antraquinona</i>	27
1.4.3. <i>Interação Corante e Pele</i>	28
1.5. MÉTODOS ALTERNATIVOS À EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	29
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>30</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
3.1. OBJETIVO GERAL	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
4.1. MATERIAIS UTILIZADOS NO PRESENTE TRABALHO	32
4.2. MÉTODOS EMPREGADOS NO PRESENTE TRABALHO	33
4.2.1. <i>Cultura celular e exposição aos corantes têxteis</i>	33
4.2.2. <i>Avaliação da citotoxicidade</i>	33
4.2.2.1. <i>Teste do MTT</i>	33
4.2.2.2. <i>Ensaio de Captação do Corante Vermelho Neutro (NRU)</i>	34
4.2.3. <i>Análise da morfologia celular</i>	35
4.2.3.1. <i>Microscopia de luz</i>	35
4.2.3.2. <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	35
4.2.4. <i>Deteção de espécies reativas de oxigênio (ROS)</i>	36
4.2.5. <i>Avaliação do perfil de liberação de citocinas</i>	36
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>37</b>
5.1. PADRONIZAÇÃO DOS CORANTES E ESCOLHA DA CONCENTRAÇÃO DE TRABALHO	38
5.1.1. <i>Efeito da exposição dos corantes na citotoxicidade à BALB 3T3</i>	38
5.1.2. <i>Efeito da exposição dos corantes na citotoxicidade à RAW 264.7</i>	39
5.2. INVESTIGAÇÃO MORFOLÓGICA A EFEITOS NOCIVOS DOS CORANTES REATIVOS	41
5.2.1. <i>Investigação por microscopia de luz</i>	41
5.2.2. <i>Investigação por microscopia eletrônica de varredura</i>	45
5.2.3. <i>Corantes reativos têxteis provocam alteração morfológica em células de linhagem murino BALB 3T3</i>	48
5.2.4. <i>Corantes reativos têxteis provocam alteração morfológica em células de linhagem murino RAW 264.7</i>	51
5.3. CORANTES REATIVOS TÊXTEIS ESTIMULAM A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) EM CÉLULAS DE PELE MURINO	55
5.3.1. <i>Produção de ROS em BALB 3T3 por exposição à corantes reativos</i>	55
5.3.2. <i>Produção de ROS em RAW 264.7 por exposição à corantes reativos</i>	56

5.4. CORANTES REATIVOS TÊXTEIS ESTIMULAM A LIBERAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM CÉLULAS DE PELE MURINO.....	56
5.4.1. <i>Secreção de citocinas por BALB 3T3 após exposição à corantes reativos</i> .....	57
5.4.2. <i>Secreção de citocinas por RAW 264.7 após exposição à corantes reativos</i> .....	58
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A pele

A pele pode ser definida como um conjunto de tecidos com organização estratificada que reveste o corpo e possui componentes estruturais e metabólicos que devem trabalhar em harmonia com o meio ambiente para manter a saúde do ser que envolve (HOLBROOK, 1983). Representando de 10 a 12% do peso corpóreo, a pele é o maior órgão do organismo e atua como interface biológica entre o ambiente interno e externo, possuindo como principais funções: proteção contra danos mecânicos, substâncias nocivas, invasão por microrganismos e radiação solar (SLOMINSKI; WORTSMAN, 2000; BOELSMA *et al.*, 2001). Atua também na termorregulação, na sensibilidade à dor e calor (WYSOCKI, 1999), além de possuir várias atividades neuroimunoendócrinas (STREILEIN, 1983; O'SULLIVAN *et al.*, 1998; SLOMINSKI; WORTSMAN, 2000; TOBIN, 2006). Os tecidos são formados por um conjunto heterogêneo de tipos celulares e componentes extracelulares (Figura 1), os quais produzem estruturas especializadas denominadas apêndices (folículo piloso, glândulas sudoríparas e sebáceas), e encontram-se organizados em 3 camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme (KANITAKIS, 2002; TOBIN, 2006).



**Figura 1.** Estrutura básica da pele e seus apêndices.

**Fonte:** Adaptado de Costin; Hearing, 2007.

### 1.1.1. Epiderme

A epiderme é um epitélio estratificado em constante renovação, que exhibe um processo de diferenciação progressiva de queratinização (cornificação), a qual ocorre no sentido basal para superfície. Esta camada é formada por múltiplos tipos celulares com diferentes origens embrionárias: queratinócitos, melanócitos, células de Langherans e células de Merkel, sendo que os queratinócitos correspondem a mais de 90% da população celular da epiderme (SLOMINSKI; WORTSMAN, 2000; KANITAKIS, 2002).

A estrutura e função da epiderme dependem de vários processos que se iniciam durante o desenvolvimento embrionário e continuam durante toda a vida do organismo. A manutenção do número de células depende de um frágil equilíbrio entre a proliferação e a perda (apoptose ou diferenciação) de queratinócitos. Outros fatores importantes para a manutenção da homeostase epidérmica são a adesão dos queratinócitos entre si e com a lâmina basal, a interação com as outras células da epiderme e com a camada subjacente, a derme.

A epiderme está organizada em estratos (basal, espinhoso, granular e córneo) onde os queratinócitos são originados por mitose no estrato mais interno, e ascendem para estratos mais superficiais sofrendo alteração na sua forma e composição. Esse processo de diferenciação da epiderme é denominado de queratinização ou cornificação (TOBIN, 2006).

O estrato basal, também conhecido como *stratum germinativum*, é o mais profundo e consiste de queratinócitos mitoticamente ativos e células do sistema imunológico. Os queratinócitos basais são colunares e possuem um citoesqueleto suficientemente flexível para divisão e migração celular. Já o estrato espinhoso recebeu esse nome em razão da aparência histológica de seus queratinócitos que devido à abundância de junções focais (desmossomos) entre as células adjacentes, os quais lembram “espinhos”. Os queratinócitos desse estrato possuem grandes quantidades de queratina organizadas concentricamente ao redor de seu núcleo e inseridas perifericamente dentro dos desmossomos. As células da camada granulosa têm como característica a presença de grânulos no citoplasma. Esses grânulos são compostos por proteínas, principalmente, filamentos intermediários de queratina, pró-filagrina e loricina. O estrato córneo forma a principal barreira do organismo contra a desidratação e a penetração de agentes ambientais, além de

contribuir para a proteção mecânica, é formada por múltiplas camadas de queratinócitos não-viáveis totalmente diferenciados, chamados de corneócitos. O corneócito é o maior dos queratinócitos, são achatados e formados por queratinas de alto peso molecular embebidas em uma matriz rica em filagrina. Essas características possibilitam a manutenção do estrato córneo e ao mesmo tempo permitem a descamação (KANITAKIS, 2002; TOBIN, 2006).

### 1.1.2. Derme

A derme é um tecido conectivo que garante à pele sua flexibilidade, elasticidade e resistência à tração. Tem como função proteger o corpo contra agressões mecânicas, reter água, auxiliar na regulação térmica, além disso, estão nessa camada os folículos pilosos, as glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, glândulas apócrinas, receptores de estímulo sensorial, vasos linfáticos e vasos sanguíneos. A derme é menos celular que a epiderme sendo composta principalmente de matriz extracelular fibrosa (formada por colágeno e elastina) e não-fibrosa (formada por filamentos de glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos). Contém vários tipos celulares como fibroblastos, mastócitos, células dendríticas (SLOMINSKI; WORTSMAN, 2000; KANITAKIS, 2002), macrófagos e linfócitos T (SLOMINSKI; WORTSMAN, 2000).

Os fibroblastos são o principal tipo celular da derme, são células migratórias responsáveis pela síntese e degradação do tecido conectivo (fibroso e não fibroso) e por numerosos mediadores. Existe um grande interesse na regulação dos fibroblastos devido a sua alta taxa proliferativa e sintética, no processo de cicatrização. Fibroblastos proliferativos e em repouso são capazes de responder a diversos mediadores imunológicos.

Dois regiões distintas podem ser observadas na derme a camada papilar que está em contato com a epiderme e a camada reticular mais interna. Essa distinção é feita com base no tipo de tecido conjuntivo, na densidade celular e nos padrões de organização de nervos e vasos. A camada papilar é formada por tecido conjuntivo frouxo caracterizado por pequenos feixes de colágeno de baixo diâmetro, as características da matriz permitem que a pele suporte estresse mecânico. Além disso, possui uma alta densidade celular principalmente de fibroblastos com altas taxas metabólicas e de proliferação. A camada reticular é formada por tecido

conjuntivo denso não modelado composto de fibras de colágeno de grande diâmetro organizadas em feixes entrelaçados, circundados por uma superestrutura formada por ramificações de fibras de elastina (TOBIN, 2006).

### **1.1.3. Junção Dermo-Epidérmica**

A epiderme e a derme são conectadas por uma junção dermo-epidérmica (JDE) ancorando o epitélio ao tecido conjuntivo frouxo da derme. A JDE é composta por uma complexa membrana basal sintetizada por queratinócitos basais e por fibroblastos da derme. Além de possuir um papel fundamental na adesão mecânica desses dois compartimentos, também atua como um facilitador na migração de vários tipos celulares durante processos como a cicatrização, reações imunológicas e/ou inflamatórias, entre outros (KANITAKIS, 2002).

## **1.2. Resposta Inflamatória Cutânea**

A pele e as outras barreiras epiteliais de superfície em geral encontram-se densamente colonizadas pela microbiota normal. Algumas bactérias e fungos patogênicos também colonizam essas superfícies na tentativa de substituir a flora normal, mas a maioria dos patógenos (assim como todos os vírus) evita essa competição atravessando as barreiras para ganhar acesso a nichos desocupados no interior do hospedeiro. As lesões na barreira epitelial, inclusive na pele, permitem o acesso dos patógenos diretamente aos nichos. Esta via de entrada não requer muita especialização por parte do patógeno para ser utilizada. Mais do que isso, muitos membros da microbiota normal podem causar sérias doenças se penetrarem os ferimentos (KLUYTMANS *et al.*, 1997; HINNEBUSCH *et al.*, 1998).

A resposta inflamatória é um evento no qual o sistema imunológico combate um agressor com o objetivo de neutralizá-lo. Não ocorre somente em resposta a um processo infeccioso, mas também diante de outros estímulos exógenos (radiação ultravioleta, substâncias tóxicas, substâncias alérgicas e danos mecânicos) e a estímulos endógenos (alterações imunológicas, hormonais e estresse) (O'SULLIVAN *et al.*, 1998; KANITAKIS, 2002). Considerando que a pele está exposta constantemente a esses fatores, a inflamação tem papel fundamental na manutenção da homeostase da pele. Processos inflamatórios podem resultar em

alterações na aparência e na atividade metabólica da pele como o fotoenvelhecimento, edema, atividade imunológica reduzida, entre outras desordens cutâneas (O'SULLIVAN *et al.*, 1998; BOELSMA *et al.*, 2001). Estas alterações não só significam uma perda da integridade biológica do órgão, mas também possuem efeitos substancialmente negativos na autoestima e no bem-estar social do indivíduo (COSGROVE *et al.*, 2007), visto que a pele também possui um papel central no bem-estar e atração física (SLOMINSKI; WORTSMAN, 2000; BOELSMA *et al.*, 2001).

Diversas células constituintes ou que foram atraídas para epiderme participam da manutenção do equilíbrio fisiológico da pele, principalmente queratinócitos, fibroblastos, neutrófilos, monócitos, macrófagos, mastócitos, células de Langherans, linfócitos B e T e células natural killer (O'SULLIVAN *et al.*, 1998; SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 2002).

Na inflamação há uma resposta do tecido agredido que envolve vários eventos da resposta imunológica. Esses eventos são iniciados, amplificados e/ou coordenados pela ação de vários mediadores, também denominados de autacóides. Os autacóides constituem um grupo heterogêneo de substâncias formadas pelo organismo que possuem intensa atividade fisiológica e fisiopatológica, podem atuar de forma autócrina promovendo efeitos na própria célula, ter efeitos parácrinos em células epidérmicas vizinhas ou ainda ter um efeito endócrino em células distantes. Entre eles encontram-se o óxido nítrico, o fator ativador de plaquetas, as cininas, os eicosanóides, a histamina e as citocinas.

A resposta imunitária entra em ação imediatamente após a implantação de uma infecção e não depende da exposição anterior do hospedeiro, enquanto as respostas imunológicas adaptativas, mais poderosas, operam por último em uma infecção e são altamente específicas para o patógeno que as induz (DIEAMANT *et al.*, 2008).

Os linfócitos respondem a antígenos estranhos somente quando o sistema inato é ativado anteriormente. A rapidez das respostas inatas a uma infecção depende dos receptores de reconhecimento de padrões feitos pelas células desse sistema. Estes receptores reconhecem moléculas associadas à microorganismos que não estão presentes no organismo do hospedeiro, denominadas imunoestimuladores associados aos patógenos. Devido ao fato de ocorrerem em padrões repetidos, são também conhecidas como padrões moleculares associados aos

patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*). Os PAMPs incluem padrões repetidos de estruturas moleculares dos ácidos nucleicos, dos lipídeos, dos polissacarídeos e das proteínas microbianas. Algumas células do sistema inato que respondem aos PAMPs e ativam a resposta adaptativa mais eficientemente são as células dendríticas. Presentes na maioria dos tecidos, as células dendríticas expressam altos níveis de receptores do tipo Toll (TLR, *toll-like receptors*) e outros receptores de reconhecimento de padrões e atuam apresentando antígenos microbianos às células T nos órgãos linfoides periféricos. Na maioria dos casos, elas reconhecem e fagocitam microorganismos invasores ou seus produtos ou fragmentos de células infectadas no local de infecção e migram para o órgão linfóide periférico mais próximo. Em outros casos, elas capturam diretamente os microorganismos ou seus produtos nos órgãos linfoides periféricos como o baço. Nas duas situações, os PAMPs microbianos ativam as células dendríticas que, por sua vez, podem ativar diretamente as células T dos órgãos linfoides periféricos a responder contra os antígenos microbianos apresentados na superfície das células dendríticas. Uma vez ativadas, algumas células T migram para o local de infecção, onde irão auxiliar as células fagocíticas a destruir os microorganismos. Outras células T ativadas permanecem no órgão linfóide, onde auxiliam a manter as células dendríticas ativas, auxiliam na ativação de outras células T e na ativação de células B para a produção de anticorpos contra os antígenos microbianos (LITMAN *et al.*, 2005; AUSUBEL, 2005).

### **1.3. A pele como parte do sistema imunológico**

A complexa e elaborada estrutura que a pele apresenta agregando tecidos de várias origens (epitelial, conectivo, vascular, muscular e nervoso) (KANITAKIS, 2002), lhe confere a capacidade de reconhecer e responder a diferentes fatores. A ação desses fatores ambientais ou endógenos no tecido cutâneo promove os estímulos iniciais para o desencadeamento de uma resposta imunológica e inflamatória que é geralmente acompanhada de alterações fisiológicas, envolvendo outros tipos celulares e até mesmo outros sistemas orgânicos. O dinâmico processo de transmissão de sinais e processamento da informação ocorre de uma maneira complexa e, essa resposta multifacetada denominada inflamação pode ocorrer de forma benéfica ou prejudicial para o hospedeiro. A ocorrência de um aumento da

perfusão vascular local, o extravasamento de líquidos e a formação de coágulo podem agir de forma a facilitar o fluxo de leucócitos, diluir ou inativar o patógeno e favorecer a cicatrização (ASP *et al.*, 2011). Por outro lado, a inflamação é prejudicial quando causa lesão temporária ou permanente dos tecidos, estimulando a liberação de substâncias como citocinas, por exemplo a interleucina 6 (IL-6), produzida por diversos tipos celulares, a qual participa da regulação do sistema imunitário e na resposta de fase aguda da inflamação, o fator de necrose tumoral (TNF), Interferons (IFN) e outras substâncias, as quais aumentam a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, dando início ao extravasamento de leucócitos para a área inflamada, interferindo nas funções teciduais normais (HIRANO; KISHIMOTO, 1992; FATTORI *et al.*, 1994; SELVATICI *et al.*, 2006; ASP *et al.*, 2011).

A principal função do sistema imunológico é proteger o organismo, eliminando ou neutralizando moléculas estranhas e ao mesmo tempo reconhecendo e tolerando partículas que pertencem ao organismo. A epiderme é parte integral desse sistema uma vez que não só representa o principal local de entrada e de destruição de antígenos, mas também possui células que participam ativamente na iniciação e regulação de respostas imunológicas. Entre elas podemos citar as células de Langherans, linfócitos T e os queratinócitos (TOBIN, 2006).

Monócitos e macrófagos são células pertencentes ao sistema mononuclear fagocítico. São considerados como a primeira linha de defesa imunológica em estágios iniciais de invasão microbiana ou de injúrias teciduais. Macrófagos defendem a homeostase local e sistêmica iniciando uma complexa série de eventos celulares e bioquímicos. Apesar de serem considerados componentes do sistema inato, possuem importante papel tanto na imunidade inata quanto na adquirida (celular e humoral) e estão claramente envolvidos nas respostas pró e anti-inflamatórias (GORDON; TAYLOR, 2005; BOWDISH, *et al.*, 2007). A diferenciação de macrófagos depende inicialmente da formação de monócitos que ocorre na medula óssea. Monócitos são diferenciados a partir de células tronco hematopoiéticas. A proliferação e a diferenciação dos monócitos dependem da presença de citocinas determinadoras de linhagem, como o fator estimulador de colônia de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), o fator estimulador de colônia de monócitos/macrófagos (M-CSF) e de interações com o estroma medular (GORDON, 2003). Essas células, uma vez diferenciadas em monócitos, são liberadas no sangue periférico, onde circulam por vários dias antes de entrar em tecidos e reabastecer a

população de macrófagos teciduais. Estímulos pró-inflamatórios, metabólicos e imunológicos, destacando a principal função da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), causam recrutamento de monócitos aos tecidos periféricos, onde ocorre uma diferenciação destas células em macrófagos e células dendríticas, que são células que fazem a ligação entre o sistema imunitário inato e adaptativo devido à capacidade de reconhecer o antígeno, processá-lo e apresentá-lo aos linfócitos T. De acordo com a função e o local em que se encontram, essas células recebem nomes específicos (VAN FURTH, 1973; CORSINI; GALLI, 2000; GORDON; TAYLOR, 2005; MELLMAN, 2005; HUME, 2006; VARIN; GORDON, 2009).

Para GORDON (2003) estímulos podem ativar macrófagos e modular a expressão de seus receptores de superfície, fazendo com que essas células modifiquem algumas de suas propriedades, como crescimento, diferenciação, migração, secreção, habilidade para aderir e espalhar-se em substratos, taxa de endocitose e fusão de lisossomos com vacúolos endocíticos e adquiram uma grande capacidade de matar microrganismos através, por exemplo, de espécies reativas de oxigênio e/ou óxido nítrico dependentes (ROS e NO, respectivamente). Macrófagos ativados alternativamente são aqueles ativados por citocinas IL-4 ou IL-13, citocinas que normalmente são produzidas durante uma resposta Th2, particularmente durante alergias ou humoral a infecções de parasitas. Segundo WI (2012), alguns estímulos, como por exemplo a atividade da interleucina 10 (IL-10), citocina responsável por mediar IL-4, IL5 e IL-13, pode ainda inibir a produção de linfócitos Th1, inibir a função de macrófagos e ativar linfócitos B, acentuando a resposta imunológica humoral.

A exposição da pele a uma variedade de xenobióticos pode resultar no aparecimento de reações alérgicas ou irritativas, gerando lesão tecidual que pode variar de alterações estéticas até o desenvolvimento de neoplasias (GOLDSMITH, 1996; KOHEN, 1999; TOBIN, 2006).

Estas reações constituem um complexo fenômeno que envolve a participação de células epidérmicas, dérmicas, endoteliais e leucócitos infiltrados, que interagem entre si estimulados por uma série de mediadores. Além de destruir o tecido cutâneo diretamente, esses agentes alteram o metabolismo celular e induzem a liberação, formação ou ativação de autacóides, como histamina, metabólitos do ácido araquidônico, quininas, proteínas do complemento, espécies reativas de oxigênio e citocinas (CORSINI; GALLI, 2000).

## 1.4. Corantes têxteis

O primeiro corante sintético comercialmente bem-sucedido do mundo, denominado de mauveine, foi descoberto por acaso em 1856 por William Henry Perkin, um dos pioneiros da indústria química mundial (HUBNER, 2006). Estes compostos orgânicos podem ser complexos, pois, quando aplicados às fibras têxteis, têm a habilidade de criar uma certa cor, devido à presença de grupos químicos insaturados, denominados cromóforos. Desta forma, substâncias que possuem cromóforos em diferentes arranjos, produzem a sensação de diferentes tonalidades de cores. Uma vez fixado à fibra de forma permanente, eles não irão perder esta cor quando expostos ao suor, a luz, água entre outras substâncias químicas, incluindo agentes oxidantes e também agentes microbianos.

A expansão da indústria têxtil a nível mundial levou a um aumento equivalente na utilização de tais substâncias, de forma que este aumento reflete em uma maior exposição humana e ambiental a determinados corantes, causando prejuízos pra saúde e danos ao meio-ambiente (SARATELE *et al.*, 2011; CHEQUER, *et al.*, 2011).

Existem diferentes classes de corantes, as quais podem ser determinadas pelo grupamento cromóforo, responsável pela cor, ou pelo seu método de aplicação, sendo este último o principal sistema adotado pelo *Colour Index* (CI) (FERRAZ, 2011). Desta forma, os corantes podem ser classificados com base em sua estrutura química (grupamento cromóforo), como por exemplo antraquinona, azo, e no seu modo de fixação à fibra têxtil, como corantes reativos, diretos, ácidos, dispersivos, branqueadores, pré-metalizados, corantes à cuba e corantes de enxofre (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Dos cerca de  $10^9$  kg de corantes estimados a serem fabricados anualmente em todo o mundo, os dois mais amplamente utilizados na indústria têxtil são os grupos azo e antraquinona (FORSS; WELANDER, 2011; CHEQUER, *et al.*, 2011).

### 1.4.1. A indústria têxtil no Brasil e no mundo

A cadeia produtiva têxtil e de confecções inicia-se na agropecuária (fibras naturais) ou na indústria química (fibras manufaturadas), passando pelo fio, tecidos, beneficiamento, confecção e termina no consumidor final. A cadeia é extremamente

heterogênea no que diz respeito às matérias-primas utilizadas, processos produtivos existentes, padrões de concorrências e estratégias empresariais.

O mercado têxtil e de confecção mundial é dos mais dinâmicos, realizando lançamentos no mínimo a cada quatro vezes no ano. Em 2010, o consumo per capita mundial de fibras era de 11,6 kg/habitante. Em 2010, foram consumidas 80 milhões de toneladas de fibras, sendo 62% de fibras químicas e 38% de fibras naturais, como o algodão. Já a produção mundial de fios, tecidos, malhas e confeccionados foi de 76 milhões de toneladas em 2010. O mapa da produção mundial começou a mudar na década de 80, saindo dos EUA, Europa e Japão para países emergentes da Ásia e, mais recentemente, Leste Europeu, Norte da África e Caribe. Atualmente, a Ásia é responsável por 73% do volume total produzido no mundo. O Brasil ocupa a quarta posição entre os maiores produtores mundiais de artigos de vestuário e a quinta posição entre os maiores produtores de manufaturas têxteis.

O Setor Têxtil e de Confecções é relevante para a economia brasileira, uma vez que se trata do 2º maior gerador do primeiro emprego e do 2º maior empregador da indústria de transformação. Além disso, representa 3,5% do PIB total brasileiro e possui grande volume de produção, com confecção de 9,8 bilhões de peças.

Apesar de ser um dos grandes produtores mundiais, em especial de tecidos denim e tecidos de malha de algodão, o Brasil apresenta ainda baixa participação na corrente de comércio internacional. Encontra-se na 24ª posição dentre os maiores exportadores de têxteis e na 70ª posição dentre os maiores exportadores de vestuário.

Dados de 2012 apontam que o mercado nacional é responsável por 97,5% do consumo da produção e 2,5% é destinado às exportações. São 9,4 bilhões de peças, incluindo cama, mesa e banho, produzidas ao ano e mais de 1,9 milhão de toneladas de algodão em pluma produzido (ABIT, 2013).

A ETAD (*The Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers*), uma associação internacional criada em 1974 com o intuito de minimizar os possíveis danos ao homem e ao meio-ambiente, tem realizado grande esforço para fiscalizar a fabricação mundial de corantes sintéticos. A proposta de trabalho desta entidade é baseada na divulgação de artigos periódicos identificando os riscos potenciais causados por corantes específicos e seus intermediários. Os riscos toxicológicos e ecológicos destas substâncias são baseados principalmente na avaliação destes corantes envolvendo grau de

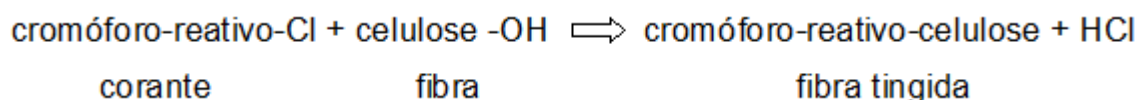
estrutura, solubilidade, possíveis interações, rota metabólica e avaliação da relação risco e custo-benefício (GUARATINI; ZANONI, 2000).

#### 1.4.2. Corantes têxteis reativos e fibras têxteis

Como mencionado anteriormente, os corantes podem ser classificados com base em sua estrutura química e no seu modo de fixação à fibra têxtil (GUARATINI; ZANONI, 2000). As fibras têxteis, por sua vez, são divididas em dois grandes grupos denominados de fibras naturais e sintéticas. As fibras naturais podem ser de origem animal, vegetal ou mineral (lã, seda, algodão e linho), baseadas em celulose e proteína. As fibras sintéticas são comercializadas como viscose, acetato de celulose, poliamida, poliéster e acrílico (ALCÂNTARA & DALVIN, 1996). Cada fibra possui características e propriedades diferentes que irão conferir aos tecidos aplicações diversas.

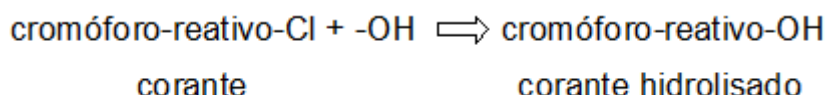
Corantes reativos, largamente empregados no tingimento de fibras naturais, como algodão, são caracterizados por apresentarem um grupo eletrofílico (reativo) capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras proteicas e também com grupos amino das poliamidas (HUNGER, 2003). Existem numerosos tipos de corantes reativos, entretanto os principais contêm a função azo e antraquinona, como grupos cromóforos, e os grupos clorotriazina e sulfatoetilsulfona, como grupos reativos que se ligam covalentemente à fibra natural ou sintética oferecendo alto padrão de qualidade e uma vasta gama de coloração (VENKATARAMAN, 1978; HUNGER, 2003; GUARATINI; ZANONI, 2000).

Nos corantes reativos, o grupo reativo ostenta um grupo eletrofílico capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxilas, amino ou tióis presentes nas fibras celulósicas, proteicas e poliamidas, como exemplificado no esquema abaixo:



O grande problema destes corantes é que sua reatividade é usualmente favorecida em meio alcalino (carbonato, pH 10,0) e altas temperaturas (80-100°C). Estas condições experimentais, entretanto, podem promover reações

paralelas indesejáveis de hidrólise do corante, onde o grupo quimicamente ativo do corante reage com a hidroxila do meio, tornando-o inativo para reação com a hidroxila ou amina da fibra, como mostra o esquema abaixo. Embora, estes corantes na forma hidrolisada apresentem baixa eficiência de fixação, algumas vezes pode ocorrer como contaminantes durante o processo de tintura e ficar impregnado na fibra.

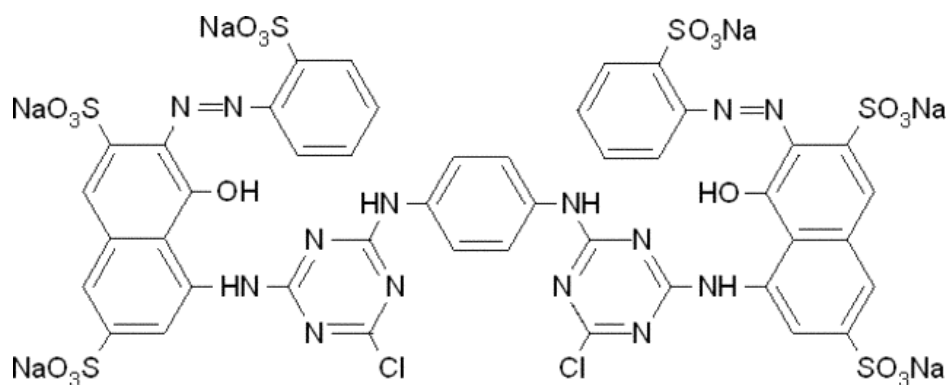


No Brasil, devido às condições climáticas e a autossuficiência em algodão, 70% da produção têxtil do país está relacionada a esta fibra natural (ABIT, 2013), a qual é basicamente constituída de celulose, ceras naturais e proteínas. O grande número de grupos hidroxilas da celulose propicia ao algodão uma grande capacidade de absorver água (cerca de 50% de seu peso) (ALCÂNTARA & DALTIM, 1996), o que estimula seu uso em países de clima quente devido à sua capacidade de absorver o suor.

Considerando o contexto atual brasileiro, o qual apresenta uma produção têxtil voltada principalmente para vestimentas de algodão, e o fato dos corantes reativos serem uma das principais classes empregadas nos processos de tingimento destas fibras, o presente trabalho está avaliando as respostas celulares relacionadas a uma possível inflamação cutânea de dois corantes reativos pertencentes a dois grupos químicos distintos - antraquinona e azo, como descritos a seguir.

#### 1.4.2.1. Azo Corantes

Azo corantes são caracterizados por um grupo cromóforo azo  $-\text{N}=\text{N}-$ , cujos átomos de nitrogênio estão ligados, respectivamente, aos átomos de carbono. Ao menos um desses átomos de carbono pertencente a um carbociclo aromático (usualmente um derivado de benzeno ou de naftaleno) ou o terocíclico (por exemplo, pirazolona ou tiazole), ao passo que o segundo átomo de carbono adjacente ao grupo azo pode também ser parte de um derivado de alifático enolizável (por exemplo, ácido aceto acético). O azo corante escolhido para este estudo foi o *Reactive Red 120* (RR120) (Figura 2).



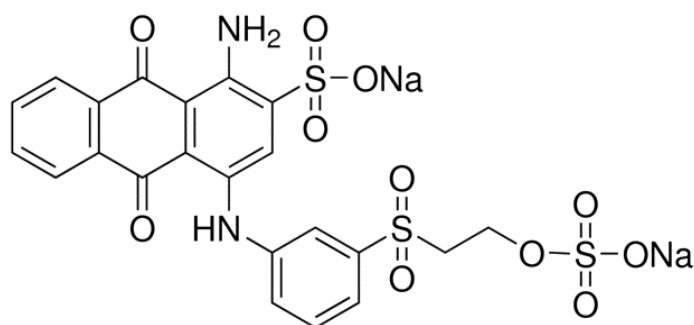
**Figura 2.** Estrutura química do corante têxtil *Reactive Red 120* (RR120).

A maior parte dos corantes azo contém apenas um grupo azo, mas alguns contêm dois (diazó), três (trisazóicos) ou mais. Em teoria, os corantes azo podem fornecer um arco-íris de cores completas e, são responsáveis por mais de 50% de todos os corantes produzidos anualmente. No entanto, comercialmente, eles tendem a ser usado para produzir mais amarelos, laranjas e vermelhos do que todas as outras cores. O corante azo é metabolizado e reduzido a duas aminas na ligação azo, as aminas resultantes dependem da estrutura do composto inicial. As aminas de divisão, em seguida, sofrem oxidação e, em seguida, são convertidos em quinonodiiiminas. Este mecanismo de redução de aminas aromáticas também é por vezes referido como clivagem e azo clivagem o que pode gerar um excesso de espécies reativas durante este processo, desencadeando diversos eventos no tecido cutâneo (GUARATINI; ZANONI, 2000; CHEQUER, *et al.*, 2011). Bae; Freeman (2007), demonstraram a toxicidade biológica dos corantes azo diretos usados na indústria têxtil.

#### 1.4.2.2. Corantes Antraquinona

Corantes antraquinona se caracterizam por apresentarem uma estrutura molecular com fórmula  $C_{14}H_8O_2$ . Comparado a outras classes de corantes, pouca informação sobre a toxicidade deste grupo de corantes pode ser encontrada na literatura, principalmente quando comparado aos corantes azóicos.

No presente trabalho, o corante antraquinona *Reactive Blue 19* (RB19) foi escolhido para avaliação de seu potencial de induzir respostas inflamatórias cutâneas (Figura 3).



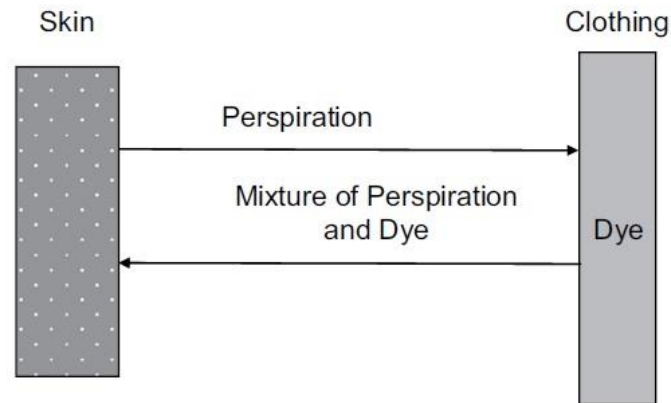
**Figura 3.** Estrutura química do corante têxtil *Reactive Blue 19* (RB19).

Apesar de poucos estudos, Novotny *et al.* (2006) em um estudo comparativo de toxicidade aquática utilizando bactérias, algas e protozoários apontou que os corantes antraquinonas mostraram uma toxicidade superior aos corantes azóicos utilizados neste estudo. No estudo de Leme *et al.* (2014), no qual a genotoxicidade de dois corantes reativos, um antraquinona e outro azo, foram avaliados tanto em sua forma original como extraída de fibras de algodão tingidas com estes corantes, mostrou que, apesar de ambos os corantes serem mutagênicos fracos em sua forma original, o corante antraquinona apresentou uma mutagenicidade levemente superior (potência mutagênica) ao azo corante utilizando o teste de *Salmonella*/microsoma.

#### 1.4.3. Interação Corante e Pele

Os riscos toxicológicos de corantes sintéticos à saúde humana estão intrinsecamente relacionados ao modo de exposição, por exemplo, ingestão de águas contaminadas com estes poluentes (UMBUZEIRO *et al.*, 2005) e contato direto com peças de vestuário (HATCH; MAIBACH 1995; LADEMANN *et al.*, 2009). A relação entre danos à pele humana e exposição a corantes por vestimentas tem sido reportada em diversos trabalhos da literatura (HATCH; MAIBACH 1995; STAHLMANN *et al.*, 2006; RYBERG *et al.*, 2009; LADEMANN *et al.*, 2009). Reações alérgicas, como dermatite de contato alérgica, decorrentes da exposição a roupas coloridas estão entre os possíveis danos causados à pele humana por esta classe de agentes químicos (SEIDENARI *et al.*, 2002; BETTS *et al.*, 2005; BROOKSTEIN, 2009). O desencadeamento destas reações alérgicas é promovido pela penetração do corante na pele com subsequente contato das células de Langherans, que são células dendríticas presentes na epiderme e constituintes do sistema imunitário

(STAHLMANN *et al.*, 2006; LADEMANN *et al.*, 2009). Adicionalmente, o desprendimento dos corantes das fibras têxteis pode ser facilitado pelo contato com o suor (Figura 4), favorecendo assim a exposição das células da pele aos corantes (LEME *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Equilíbrio da mistura de transpiração e corante residual.

**Fonte:** Adaptado de Brookstein, 2009.

A penetração dos corantes na pele humana é algo preocupante, uma vez que os efeitos adversos podem não se restringir apenas a pele propriamente dita, mas também pode estender-se a outros tecidos e órgãos do corpo humano (HATCH; MAIBACH 1995; LADEMANN *et al.*, 2009).

Embora a alta solubilidade em água de corantes reativos tenha sido discutida por GUARATINI e ZANONI (2000), como um meio de minimizar sua absorção no organismo, é importante lembrar que estes corantes são configurados para reagirem eficientemente com substâncias portadoras de grupos amina e hidroxila, presentes nas fibras naturais, porém presentes em todos os organismos. Adicionalmente, a exposição destes corantes à pele também pode ser uma rota perigosa pela qual se pode absorver estas substâncias e promover a sensibilização da pele. Corantes com estruturas azo e antraquinona são os sensibilizadores mais comuns de corantes apontados por estudos anteriores (GUARATINI; ZANONI, 2000; BROOKSTEIN, 2009).

### **1.5. Métodos alternativos à experimentação animal**

O potencial de uma substância química em causar respostas inflamatórias cutâneas é uma preocupação significativa do setor industrial, que está

constantemente desenvolvendo novos compostos a serem utilizados em fibras têxteis, cosméticos, entre outros.

Até recentemente, a avaliação de respostas inflamatórias cutâneas restringia-se basicamente a testes com animais (métodos *in vivo*). No entanto, na Europa, duas iniciativas legislativas têm estimulado o desenvolvimento de métodos *in vitro*, ou seja, que não são baseados no uso de animais, para este propósito. A primeira iniciativa está relacionada ao teste necessário para o registro, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas (REACH), e a segunda é a 7ª alteração a diretiva relativa a cosméticos do parlamento europeu (Regulamento (CE) nº 1223/2009), a qual proíbe testes com animais para a avaliação da segurança de cosméticos e seus ingredientes a partir de 2013 (HU *et al.*, 2009; AEBY *et al.*, 2009; MCKIM *et al.*, 2010). Esta medida, inicialmente, teve grande repercussão no ramo de cosméticos de países da Comunidade Europeia. No entanto, seu impacto se estendeu rapidamente a países, como Estados Unidos, e também a outros setores industriais (agroquímicos e farmacêuticas no descobrimento de novas drogas). A iniciativa de utilização de métodos alternativos a animais já atingiu o Brasil, onde se criou a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) e o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), que atuaram conjuntamente ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea).

Estes eventos estão impulsionando o desenvolvimento de novos métodos *in vitro* que podem caracterizar a segurança de novos produtos. Modelos baseados em células *in vitro* podem proporcionar um meio rápido, barato e robusto de identificação de agentes químicos nocivos. O sucesso dessa abordagem para prever os efeitos *in vivo* depende de quão perto o modelo de célula e os parâmetros medidos mimetizam a rota de exposição *in vivo*, órgão-alvo e os mecanismos moleculares envolvidos com a resposta. Eventos chave neste processo incluem a estimulação da proliferação de células do sistema imunológico através da atividade inflamatória e, ou oxidativa (IAN *et al.*, 1995; SCHEMAN *et al.*, 2008).

## 2. JUSTIFICATIVA

A capacidade de corantes têxteis em causar efeitos adversos ao meio ambiente e a seres humanos tem sido relatada na literatura. De acordo com JAGER *et al.* (2004), a maioria dos corantes têxteis foram colocados no mercado antes de

1983 e muitos deles, portanto, não foram adequadamente testados até agora. A exposição humana aos corantes têxteis pode ocorrer por diferentes vias, sendo o contato da pele com as vestimentas uma das principais e mais preocupante hoje em dia.

Considerando que os corantes têxteis podem ser liberados dos tecidos em casos de perspiração e, conseqüentemente, migrarem e penetrarem na pele humana (MEINK *et al.*, 2009; LADEMANN *et al.*, 2009), a avaliação de danos à pele e células alvos torna-se relevante e necessária.

Como a indústria têxtil brasileira está voltada principalmente à confecção de tecidos de algodão, devido às condições climáticas do país e a nossa autossuficiência nesta matéria-prima, a avaliação toxicológica de corantes empregados no tingimento de fibras de algodão poderá contribuir neste setor industrial proporcionando uma escolha de corantes seguros, ou seja, não nocivos à saúde humana. Adicionalmente, tal fato poderá também contribuir positivamente no mercado de exportação de tecidos brasileiros, uma vez que nos últimos anos países da Comunidade Europeia tem realizados grandes esforços para a identificação e proibição do uso de corantes têxteis nocivos ao homem (SCHNEIDER *et al.*, 2004; BFR, 2012).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar possíveis respostas inflamatórias induzidas por dois corantes reativos têxteis (RR120 e RB19) por meio de métodos *in vitro* com duas linhagens celulares de pele murina: fibroblastos BALB 3T3 (ATCC CCL-163) e macrófagos RAW 264.7 (ATCC TIB-71).

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Verificar as alterações na viabilidade celular utilizando técnicas de citotoxicidade por MTT e NRU;

- Verificar alterações na morfologia celular em linhagens de células murina, fibroblastos BALB 3T3 (ATCC CCL-163) e macrófagos RAW 264.7 (ATCC TIB-71), expostas aos corantes em estudo;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células expostas aos corantes em estudo;
- Avaliar o perfil de liberação de citocinas inflamatórias nas culturas celulares expostas aos corantes em estudo.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais utilizados no presente trabalho

Como material de estudo foram utilizados os corantes têxteis *Reactive Red 120* (RR120, CAS No. 61951-82-4) e *Reactive Blue 19* (RB19, CAS No. 2580-78-1) (ambos obtidos de Sigma-Aldrich). Tampão fosfato salino (PBS - *Phosphate buffered saline*) foi utilizado como veículo para o preparo das soluções estoque dos corantes em estudo, desta forma, também foi utilizado como solução controle basal. Em todas as soluções foram utilizadas a concentração de 1% em volume por volume (v/v) para exposição celular, definido internamente.

Como materiais biológicos foram utilizadas linhagens celulares de pele murina: fibroblastos BALB 3T3 (ATCC CCL-163) e macrófagos RAW 264.7 (ATCC TIB-71). Os fibroblastos da linhagem BALB 3T3 são fibroblastos murinos desenvolvidos por S.A. Aaronson e G.T. Todaro em 1968 a partir de um embrião de camundongo da espécie BALB/c (AARONSON; TODARO, 1968). Esta linhagem celular é amplamente utilizada para testes e avaliações *in vitro* à respostas de substâncias químicas, para uma ampla gama de produtos químicos. Para isto temos as diretrizes da Organização para a Cooperação Econômica e o Desenvolvimento Europeu (OECD) através de seus *guidelines* (*OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS*), os quais são acompanhados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) responsável por estas diretrizes no nosso país (OECD, 2004; OECD, 2012; BRASIL, 2012). Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 são macrófagos murinos desenvolvidos por H.T. Abelson e L.S. Rabstein em 1970 a partir de um embrião de camundongo da espécie BALB/c (RASCHKE, 1978; ABELSON, 1970). Estas células possuem receptores para imunoglobulinas e

produzem lisozimas. São capazes também de responder de forma similar aos macrófagos obtidos diretamente de camundongos, além de serem alvos de ativação por polissacarídeos (RAMAMOORTHY; TIZARD, 1998).

## **4.2. Métodos empregados no presente trabalho**

### **4.2.1. Cultura celular e exposição aos corantes têxteis**

Para a realização dos estudos *in vitro*, células de linhagem murino, fibroblastos BALB 3T3 e macrófagos RAW 264.7, foram mantidas em meio DMEM (*Dulbeco's Modified Eagle's Medium*), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e com adição de antibiótico (penicilina 1U/mL e estreptomicina 1µ/mL) (todos da Gibco) em garrafas de 75 cm<sup>2</sup>, em atmosfera húmida a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Ao atingirem confluência, as células foram semeadas em placas de 96 e 24 poços para posterior exposição aos corantes têxteis por 24 horas, de acordo com a avaliação dos parâmetros propostos.

Foram preparadas em PBS soluções estoque dos corantes nas concentrações de 5 µg/mL; 50 µg/mL; 150 µg/mL; 250 µg/mL e 500 µg/mL, previamente escolhidas de acordo com as concentrações utilizadas na literatura (LEME *et al.*, 2014), sendo posteriormente armazenadas a 4°C na ausência de luz.

### **4.2.2. Avaliação da citotoxicidade**

Com o intuito de verificar como os corantes reativos têxteis podem atuar nas células da pele, avaliamos a citotoxicidade destes agentes por diferentes métodos *in vitro*, MTT (brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) e NRU (Neutral Red Uptake), medindo atividade mitocondrial e lisossomal, respectivamente.

#### **4.2.2.1. Teste do MTT**

O método de avaliação de citotoxicidade pelo MTT (Sigma-Aldrich) é um ensaio colorimétrico que se baseia na capacidade de redução do sal de MTT (de cor amarelada), em cristais de formazam de coloração violeta, pela atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. A eluição desses cristais em dimetilsulfóxido

(DMSO) permite a leitura colorimétrica pela absorvância a 550nm. Este método foi descrito primeiramente por MOSMANN (1983) para a avaliação da viabilidade e proliferação de células, e posteriormente sua aplicação foi estendida para a mensuração da atividade celular (GERLIER; THOMASSET, 1986).

Para a realização deste ensaio foram utilizadas as cinco concentrações teste (5; 50; 150; 250 e 500 µg/mL) para cada um dos corantes têxteis em estudo (RB19 e RR120). Como controle e controle positivo utilizou-se, respectivamente, PBS (veículo) e Triton X-100 nas concentrações finais 1% (v/v). As células ( $1 \times 10^4$  células/poço) foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas por 24 horas (período de estabilização celular). Após este período, as células foram tratadas com os corantes têxteis e controles veículo e positivo. Decorrido às 24 horas de exposição, as células foram lavadas com PBS para a completa remoção dos tratamentos e novamente incubadas com 200 µL de meio de cultivo novo com 20 µL da solução de MTT (5mg/ml, onde a concentração final de MTT será 0,45mg/ml, volume final de 220ul) por 3 horas. As absorvâncias foram mensuradas em leitora de microplaca Epoch<sup>TM</sup> Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc.) a 540 nm. A análise estatística realizada a partir da análise de variância ANOVA seguido do teste de Tukey.

#### **4.2.2.2. Ensaio de Captação do Corante Vermelho Neutro (NRU)**

Assim como no teste do MTT, o ensaio NRU (Sigma-Aldrich) faz uso de um corante vital, denominado de vermelho neutro. Este método mede a atividade de retenção do corante vital pelos lisossomos das células viáveis (TRIGLIA *et al.*, 1991).

A execução deste ensaio foi semelhante ao descrito anteriormente para o teste do MTT (item 2.2.1), sendo que, decorrido às 24 horas de exposição, as células foram lavadas com PBS para a completa remoção dos tratamentos e novamente incubadas com 200 µL de meio de cultivo novo com 20 µL da solução de vermelho neutro (VN) (1100ug/ml, onde a concentração final de VN será 100ug/ml, volume final de 220ul) por 2 horas. A eluição neste ensaio é feita por uma solução de extração composta por etanol, água ultrapura e ácido acético. A captação do vermelho neutro pelas células viáveis foi quantificada em leitora de microplaca Epoch<sup>TM</sup> Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc.) a 630 nm. A

análise estatística e a maneira de expressar os dados foram também as mesmas adotadas para o teste do MTT (item 2.2.1).

### **4.2.3. Análise da morfologia celular**

#### **4.2.3.1. Microscopia de luz**

Para os ensaios de microscopia de luz,  $4 \times 10^4$  células/poço foram plaqueadas em meio DMEM completo em placas de 24 poços (TPP) contendo lamínulas circulares de vidro e mantidas em incubadora úmida por 24 horas com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para adesão e aclimação (estabilização). Em seguida, cada poço foi tratado com os agentes teste por 24 horas. Após o período de exposição, as células foram fixadas-coradas com Bouin-Giemsa, desidratadas em xilol, montadas com *Entellan* e as observações foram realizadas em Microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, Germany), e analisadas com o programa “VSlider scanning module” (Metasystems, Altlußheim, Germany) para os grupos definidos e confirmados através dos métodos de citotoxicidade celular (teste do MTT e NRU), como descrito anteriormente.

#### **4.2.3.2. Microscopia eletrônica de varredura**

Para os ensaios de microscopia eletrônica de varredura,  $4 \times 10^4$  células/poço foram plaqueadas em meio DMEM completo em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de vidro e mantidas em incubadora úmida por 24 horas com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para adesão e aclimação (estabilização). Em seguida, cada poço foi tratado com os agentes teste por 24 horas. Para a observação da ultraestrutura em microscopia eletrônica de varredura, as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por 1 hora, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão. Após a pós-fixação, as células foram novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2 a 7,4). Posteriormente foram desidratadas por concentrações crescentes de etanol (30%, 40%, 50%, 70%, 90%, e duas vezes 100%), por um período de 10 minutos em cada concentração. Submetidas ao ponto crítico de CO<sub>2</sub> no aparelho Critical Point Dryer Model CPD030 (Balzers Pfeiffer, Balzers, Liechtenstein), metalizadas com ouro no

aparelho SCD 030 (Balzers Union, Balzers, Liechtenstein), sendo analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura VEGA3 LMU (Tescan, Kohoutovice, Czech Republic) para a linhagem BALB 3T3, e Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM 6360LV (Peabody, Massachusetts, USA) para a linhagem RAW 264.7, para os grupos definidos e confirmados através dos métodos de citotoxicidade celular (teste do MTT e NRU), como descrito anteriormente.

#### **4.2.4. Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS)**

Para a detecção de ROS foi utilizada uma sonda sensível, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA) (Life, D-399), a qual difunde-se livremente através da membrana celular. Uma vez dentro da célula, a sonda é desacetilada por esterases formando diclorofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>) e, subsequentemente, a DCFH<sub>2</sub> reage com ROS intracelulares para produzir um produto altamente fluorescente DCF (2',7'-diclorofluoresceína) (KOJIMA *et al.*, 1998).

Para a realização desse ensaio, as células (5x10<sup>4</sup> células/poço para BALB 3T3 e 1x10<sup>5</sup> células/poço para RAW 264.7) foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços e expostas aos agentes testes, como descrito anteriormente. Ao término do tempo de tratamento, as células foram incubadas com 1 µM de H<sub>2</sub>DCFDA, por 30 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com PBS por mais 30 minutos para completa de-esterificação. A emissão de fluorescência foi detectada usando o leitor de microplacas Microplate Reader Infinite F200 PRO (Tecan, Männedorf, Switzerland) com comprimento de onda de excitação e emissão de 488 e 530nm, respectivamente.

#### **4.2.5. Avaliação do perfil de liberação de citocinas**

As células foram plaqueadas e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o período de estabilização de 24 horas, as células (5x10<sup>4</sup> células/poço para BALB 3T3 e 1x10<sup>5</sup> células/poço para RAW 264.7) foram tratadas com os agentes teste por 24 horas. Ao final do tempo de exposição, o sobrenadante celular foi coletado e avaliado com o uso do *Kit Mouse Inflammation/Th1/Th2 Cytokine Cytometric Bead Array* (BD Biosciences), conforme o protocolo do fabricante. O Kit CBA foi usado nesse estudo para a quantificação das citocinas IL-6,

IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12p70 em uma mesma amostra. Seis populações de *beads* com distintas intensidades de fluorescência são conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturadas para formar o CBA e lidas no canal FL3 e FL4 do citômetro de fluxo. As populações de *beads* foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência: da menos brilhante para a mais brilhante. No CBA, as *beads* de captura das citocinas são misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio "em sanduíche". Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra por citometria de fluxo [FACSCalibur™ e software CellQuest (ambos da BD Biosciences)].

#### 4.3. Análise estatística

A análise estatística foi realizada a partir da análise de variância (ANOVA: fator duplo) dos valores obtidos. O ANOVA foi realizado para garantir se existe ou não homogeneidade entre os dados. Foi também utilizado o teste de Tukey. O teste de Tukey é utilizado para testar toda e qualquer diferença entre duas médias de tratamento, tendo como base a DMS (diferença mínima significativa), aplicado ao nível de 5% de probabilidade, ou seja, quando  $P < 0,05$ , para todos os testes citados anteriormente.

## 5. RESULTADOS

Com relação aos corantes têxteis, há uma escassez de dados sobre seus potenciais riscos à saúde humana (BRUSCHWEILER *et al.*, 2009). Dentro deste contexto e considerando o destaque do setor têxtil no Brasil, a avaliação da toxicidade de corantes têxteis com a identificação de corantes têxteis seguros a serem empregados nos processos de tingimento é relevante para evitar possíveis problemas de saúde aos seres humanos expostos a estes agentes.

Estudos de corantes têxteis tem mostrado que eles podem causar diversos efeitos deletérios nos organismos expostos (NOVOTNY *et al.*, 2006; BAE; FREEMAN, 2007; BROOKSTEIN, 2009; LORD; ASHWORTH, 2012; LEME *et al.*, 2014), o que torna ainda mais relevante o estudo da toxicidade destes grupos de substâncias químicas.

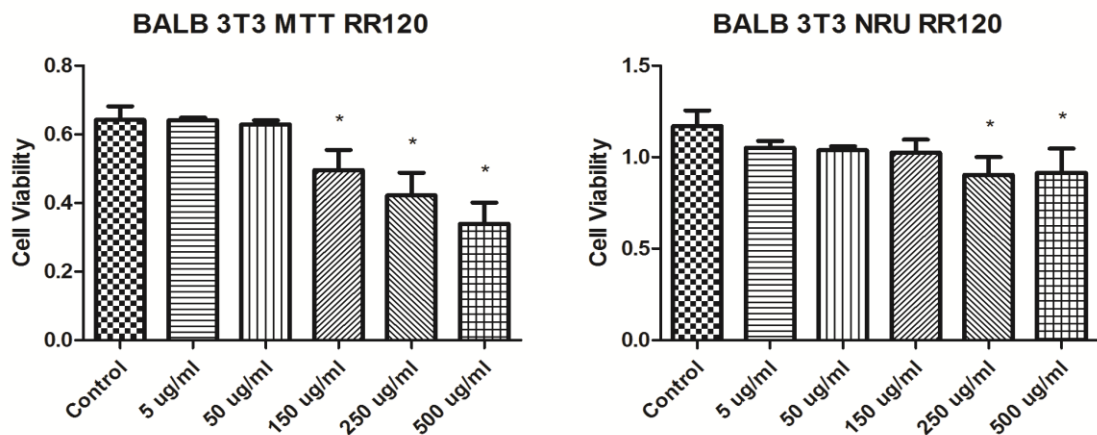
## 5.1. Padronização dos corantes e escolha da concentração de trabalho

Com o intuito de verificar como os corantes reativos têxteis podem atuar nas células da pele, avaliamos a citotoxicidade destes agentes por diferentes métodos *in vitro*, afim de encontrarmos uma concentração homogeneia para geração de resposta à ambos corantes, células e técnicas utilizadas.

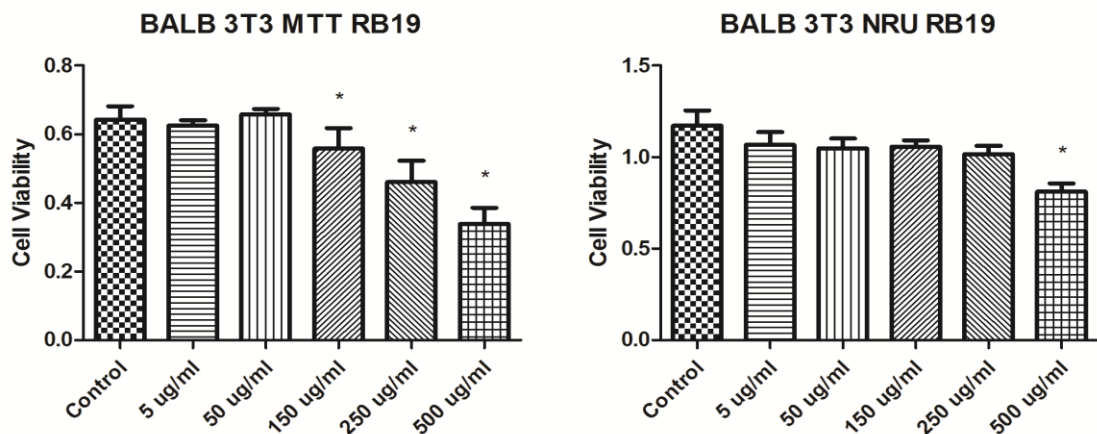
### 5.1.1. Efeito da exposição dos corantes na citotoxicidade à BALB 3T3

A figura 5 mostra os resultados da avaliação da citotoxicidade dos corantes RR120 e RB19 utilizando a linhagem BALB 3T3 pelo teste do MTT e ensaio NRU.

**A**



**B**



**Figura 5.** Efeitos dos corantes reativos têxteis na viabilidade celular de fibroblastos murinos BALB 3T3. **(A)** *Reactive Red 120* (RR120); **(B)** *Reactive Blue 19* (RB19). Fibroblastos foram expostos aos corantes em diferentes concentrações (5 ug/ml – 500 ug/ml) por 24h e a viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT e ensaio NRU. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA, Tukey).

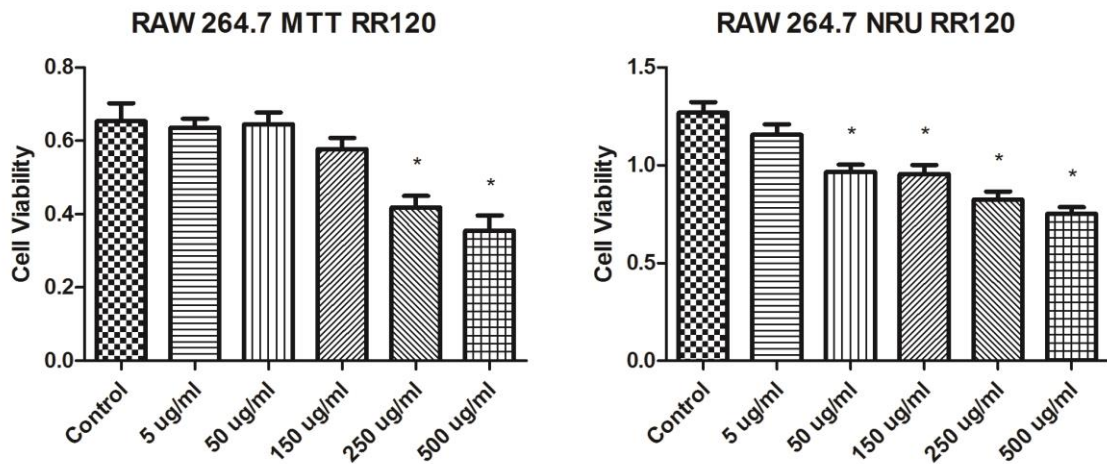
De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 5, observou-se, para o teste do MTT, que ambos os corantes foram citotóxicos de maneira concentração-dependente. Observa-se que ambos corantes demonstraram diferença significativa nas três maiores concentrações na linhagem BALB 3T3, entretanto a concentração mais elevada (500  $\mu\text{g/ml}$ ) obteve maior diferença significativa.

Com relação ao ensaio NRU, a indução de citotoxicidade mostrou-se diferente em relação aos corantes. O corante RR120 demonstrou-se citotóxico para a linhagem BALB 3T3 com médias aproximadas, igualmente significativas nas duas maiores concentrações (250  $\mu\text{g/ml}$  e 500  $\mu\text{g/ml}$ ), já o corante RB19 se mostrou citotóxico de maneira concentração-dependente na linhagem BALB 3T3 com diferença significativa apenas na concentração mais elevada (500  $\mu\text{g/ml}$ ).

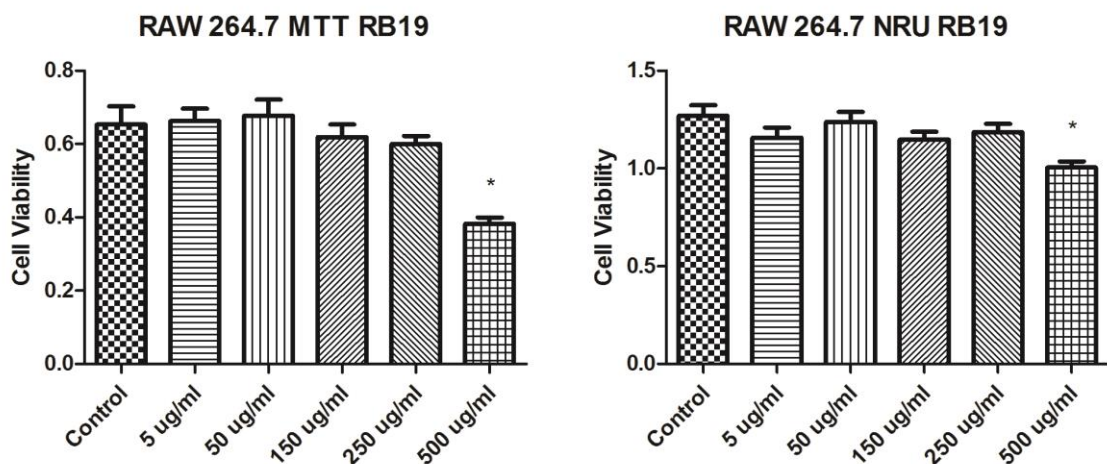
#### **5.1.2. Efeito da exposição dos corantes na citotoxicidade à RAW 264.7**

A figura 6 mostra os resultados da avaliação da citotoxicidade dos corantes RR120 e RB19 utilizando a linhagem RAW 264.7 pelo teste do MTT e ensaio NRU.

A



B



**Figura 6.** Efeitos dos corantes reativos têxteis na viabilidade celular de macrófagos murinos RAW 264.7. **(A)** *Reactive Red 120* (RR120); **(B)** *Reactive Blue 19* (RB19). Macrófagos foram expostos aos corantes em diferentes concentrações (5 ug/ml – 500 ug/ml) por 24 h e a viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT e ensaio NRU. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA, Tukey).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 6, observou-se, para o teste do MTT, que ambos os corantes foram citotóxicos de maneira concentração-dependente para a linhagem RAW 264.7. O corante RR120 demonstrou diferença igualmente significativa nas duas maiores concentrações (250  $\mu$ g/ml e 500  $\mu$ g/ml),

porém, o corante RB19, demonstrou diferença significativa apenas na concentração mais elevada (500 µg/ml).

Com relação ao ensaio NRU, a indução de citotoxicidade mostrou-se diferente em relação aos corantes. O corante RR120 demonstrou citotoxicidade concentração-dependente com valores significativos nas quatro maiores concentrações, para a linhagem RAW 264.7. Ao contrário, o corante RB19 se mostrou citotóxico com médias aproximadas na linhagem RAW 264.7, significativo apenas na concentração mais elevada (500 µg/ml).

A discrepância acima relatada pode ser explicada pelo fato de que o teste do MTT avalia a atividade mitocondrial enquanto o ensaio NRU avalia a atividade lisossomal. Adicionalmente, as diferenças de citotoxicidade podem estar relacionadas também à estrutura química do corante, mais especificamente aos seus diferentes grupos cromóforos, sendo RR120 um azo corante e RB19 um corante antraquinona (GERLIER; THOMASSET, 1986; NOVOTNY *et al.*, 2006; BAE; FREEMAN, 2007).

## **5.2. Investigação morfológica a efeitos nocivos dos corantes reativos**

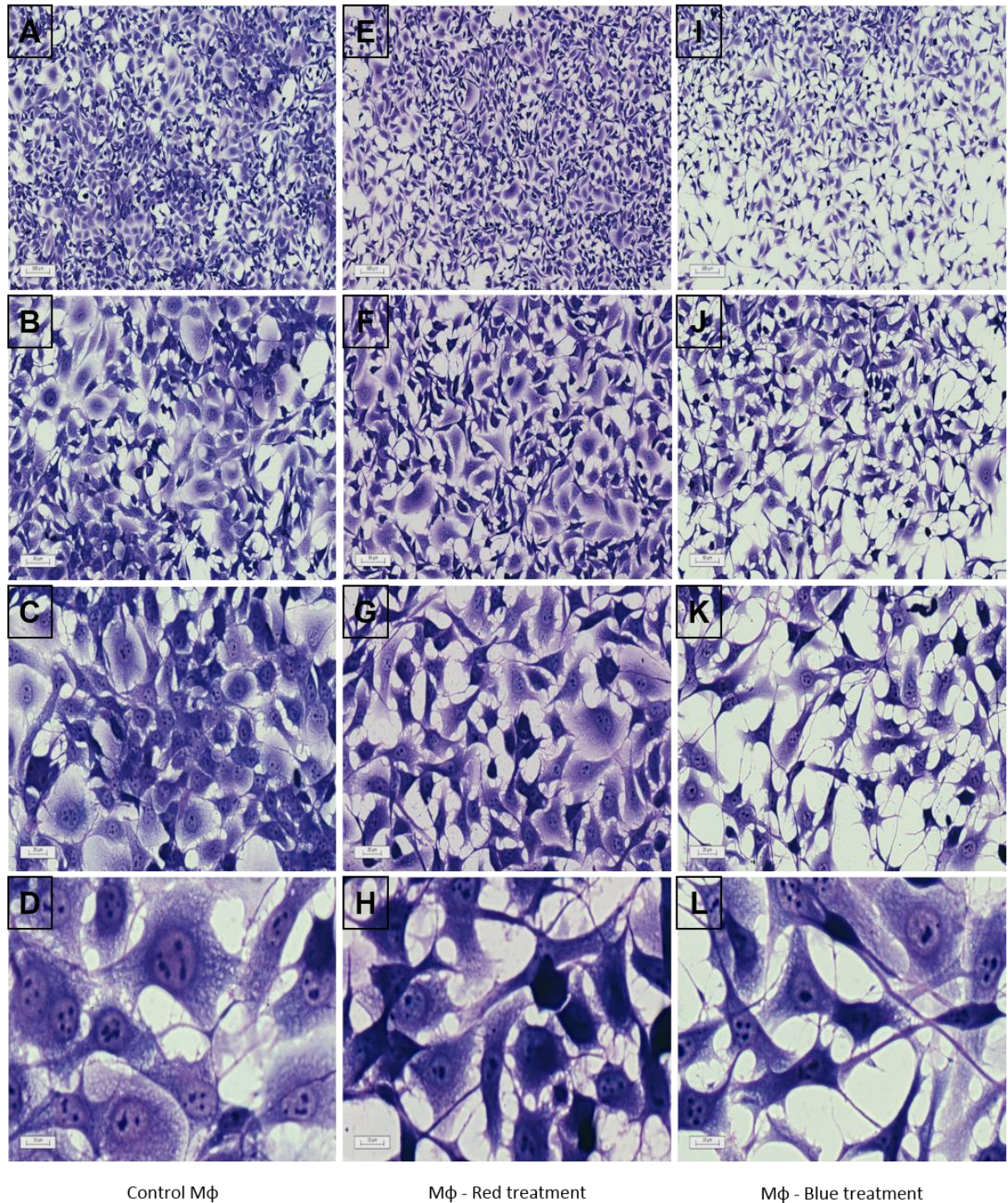
Após identificarmos que os corantes eram capazes de induzir citotoxicidade nas células expostas, resolvemos investigar se conseguiríamos observar alterações morfológicas no cultivo celular após exposição à concentração que mostrou valores mais significativos de citotoxicidade (500 µg/mL).

### **5.2.1. Investigação por microscopia de luz**

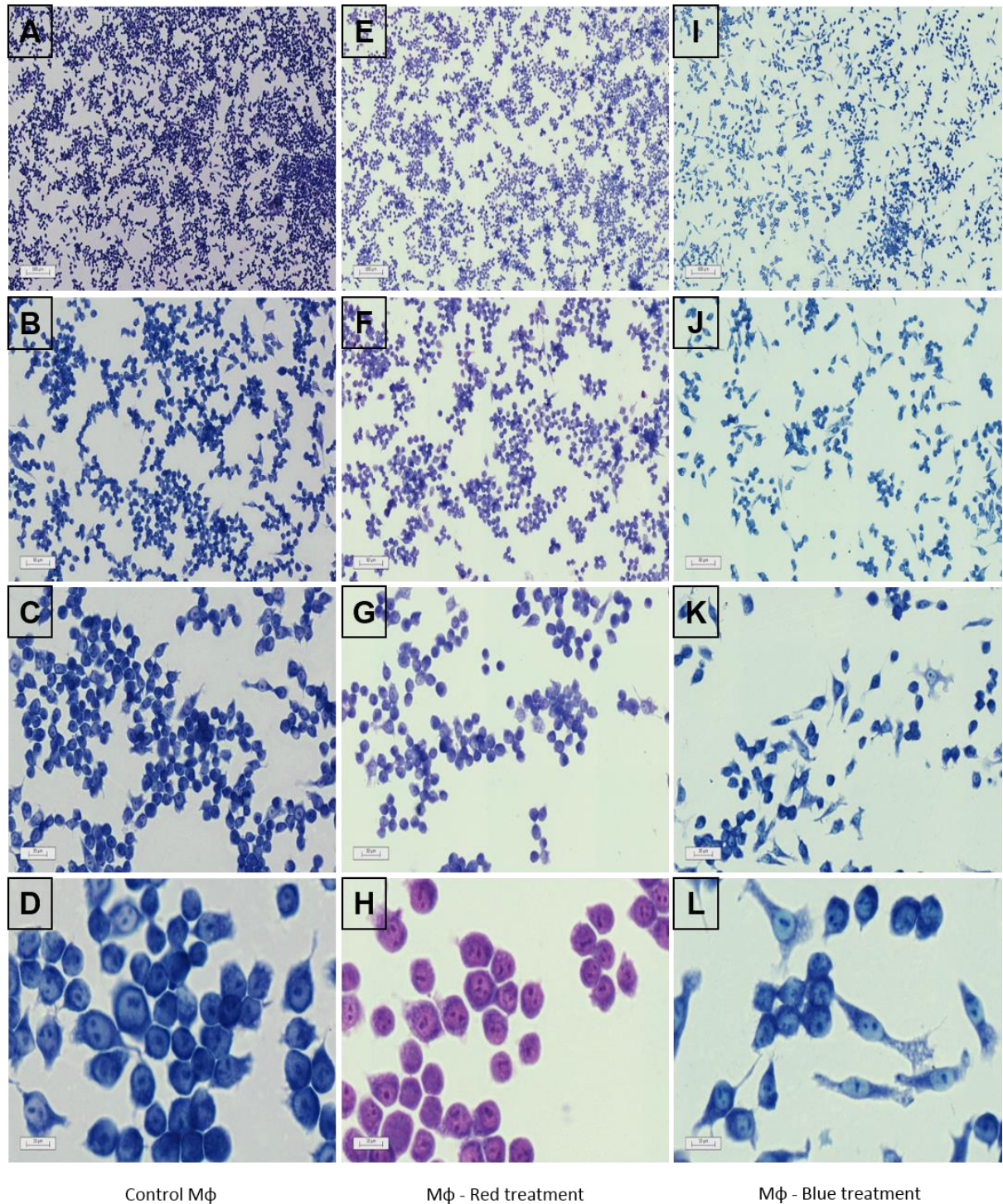
As Figuras 7 e 8 mostram culturas de fibroblastos (BALB 3T3) e macrófagos (RAW 264.7), respectivamente, após exposição aos corantes estudados. Alterações morfológicas e diminuição da viabilidade celular podem ser observadas quando os tratamentos são comparados ao controle, observados na microscopia de luz.

Principais alterações observadas na Figura 6 (fibroblastos BALB 3T3) e 7 (macrófagos RAW 264.7):

- (A-D) culturas controles e (E-L) culturas tratadas. A exposição aos corantes durante 24 horas diminuiu a densidade celular, com espaços vazios entre as células;
- (A-D) imagens representativas do controle (PBS 1% v/v);
- (E-H) imagens representativas de células tratadas com o corante RR120 na concentração de 500 µg/mL por 24 horas. Nota-se que além de promover uma diminuição na quantidade total de células, mesmo ainda maior que o corante RB19, é possível verificar alterações morfológicas significativas, uma vez que as células além de apresentarem um citoplasma denso, estão com aspecto mais fibroso, morfológicamente demonstrando sofrimento celular;
- (I-L) imagens representativas de células tratadas com o corante RB19 na concentração de 500 µg/mL por 24 horas. Como descrito para o RR120, as culturas expostas ao corante RB19, mostram alterações ainda mais acentuadas tanto no número de células quanto na densidade citoplasmática e no aspecto fibroso.



**Figura 7.** Análise morfológica de fibroblastos murinos (BALB 3T3) após 24h de exposição aos corantes RR120 e RB19. Coloração Bouin-Giemsa. As imagens foram observadas em Microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), e analisadas com o programa “VSlider scanning module” (Metasystems, Altusheim, Alemanha) posteriormente. Em **(A)** controle (PBS 1% v/v) em 50x; **(B)** 100x; **(C)** 200x e **(D)** 500x. Em **(E)** efeitos do tratamento a 500 µg/ml do corante RR120 em 50x; **(F)** 100x; **(G)** 200x e **(H)** 500x. Em **(I)** efeitos do tratamento a 500 µg/ml do corante RB19 em 50x; **(J)** 100x; **(K)** 200x e **(L)** 500x.



**Figura 8.** Análise morfológica de macrófagos murinos (RAW 264.7) após 24h de exposição aos corantes R120 e RB19. Coloração Bouin-Giemsa. As imagens foram observadas em Microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), e analisadas com o programa “VSlider scanning module” (Metasystems, Altlußheim, Alemanha) posteriormente. Em **(A)** controle (PBS 1% v/v) em 50x; **(B)** 100x; **(C)** 200x e **(D)** 500x. Em **(E)** efeitos do tratamento a 500 µg/ml do corante RR120 em 50x; **(F)** 100x; **(G)** 200x e **(H)** 500x. Em **(I)** efeitos do tratamento a 500 µg/ml do corante RB19 em 50x; **(J)** 100x; **(K)** 200x e **(L)** 500x.

Os resultados obtidos pela avaliação morfológica estão de acordo com os dados das avaliações de citotoxicidade pelo teste do MTT e ensaio NRU.

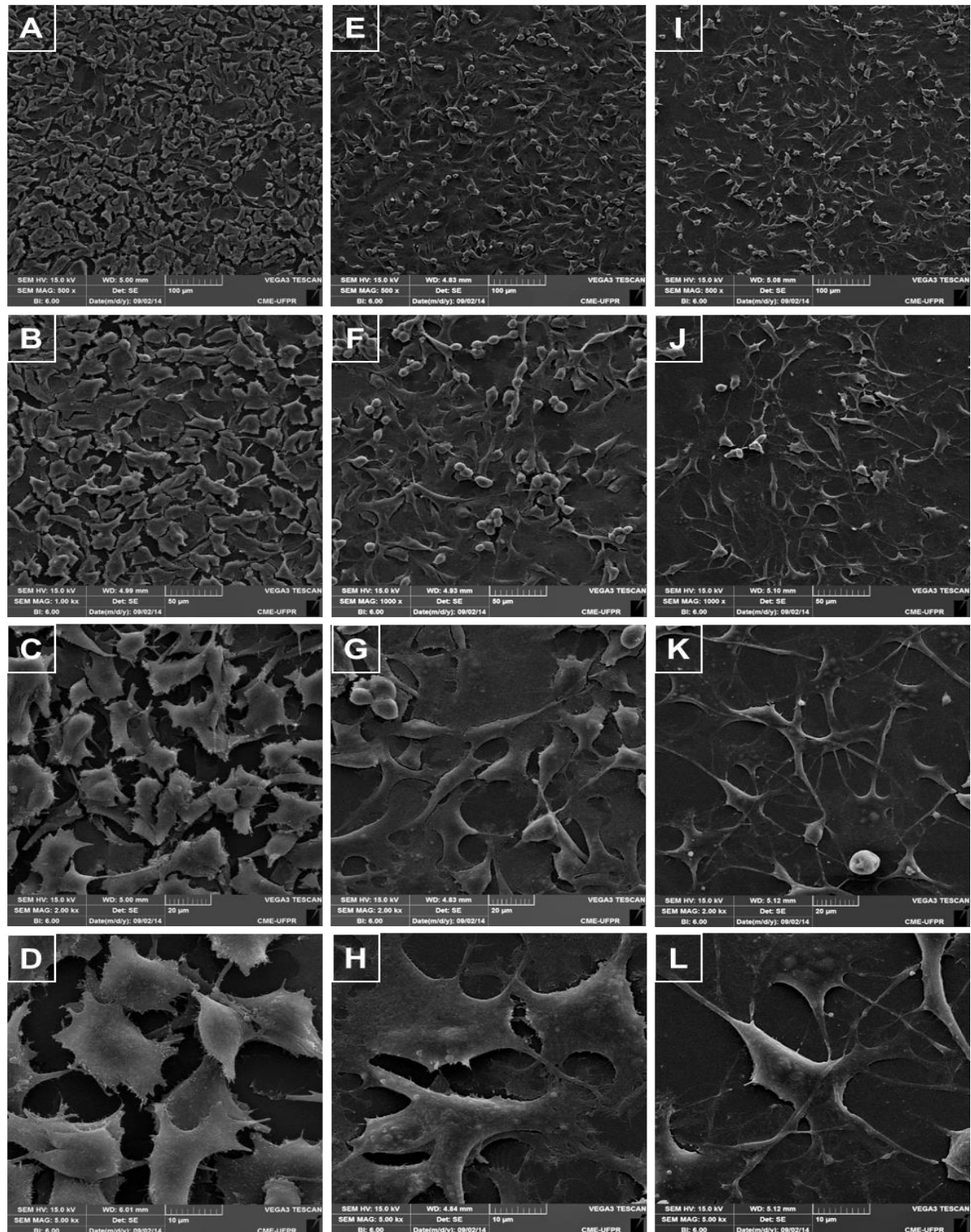
As culturas das células utilizadas neste trabalho foram adquiridas e estabelecidas no Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas, do Departamento de Biologia, da UFPR, local de desenvolvimento deste trabalho de mestrado. Após estes primeiros resultados, as faixas de concentração dos corantes em estudo foram determinadas de modo que as próximas etapas referentes à investigação dos possíveis efeitos inflamatórios cutâneos destes agentes pudessem ser desenvolvidas. Para tanto, como visto a cima, para o restante das avaliações utilizou-se apenas a concentração que mostrou valores mais significativos de citotoxicidade (500 µg/mL) em relação ao controle.

Durante as repetições das técnicas de coloração para microscopia de luz, observamos que a técnica de Bouin-Giemsa, e observação no Microscópio Axio Imager Z2, possuem qualidade superior a técnica anterior utilizada, May-Grünwald-Giemsa observadas com o Microscópio Nikon Eclipse E200.

### **5.2.2. Investigação por microscopia eletrônica de varredura**

As Figuras 9 e 10 mostram culturas de fibroblastos (BALB 3T3) e macrófagos (RAW 264.7), respectivamente, após exposição aos corantes estudados. Alterações morfológicas e diminuição da viabilidade celular podem ser observadas quando os tratamentos são comparados ao controle.

- (A-D) imagens representativas do controle (PBS 1% v/v);
- (E-H) imagens representativas de células tratadas com o corante RR120 na concentração de 500 µg/mL por 24 horas. Nota-se que além de promover uma diminuição na quantidade total de células, é possível verificar alterações morfológicas significativas, semelhantes às observadas na microscopia de luz;
- (I-L) imagens representativas de células tratadas com o corante RB19 na concentração de 500 µg/mL por 24 horas. Como descrito para o RR120, as culturas expostas ao corante RB19, mostram uma diminuição ainda maior no número de células, células alongadas e com aspecto fibroso.

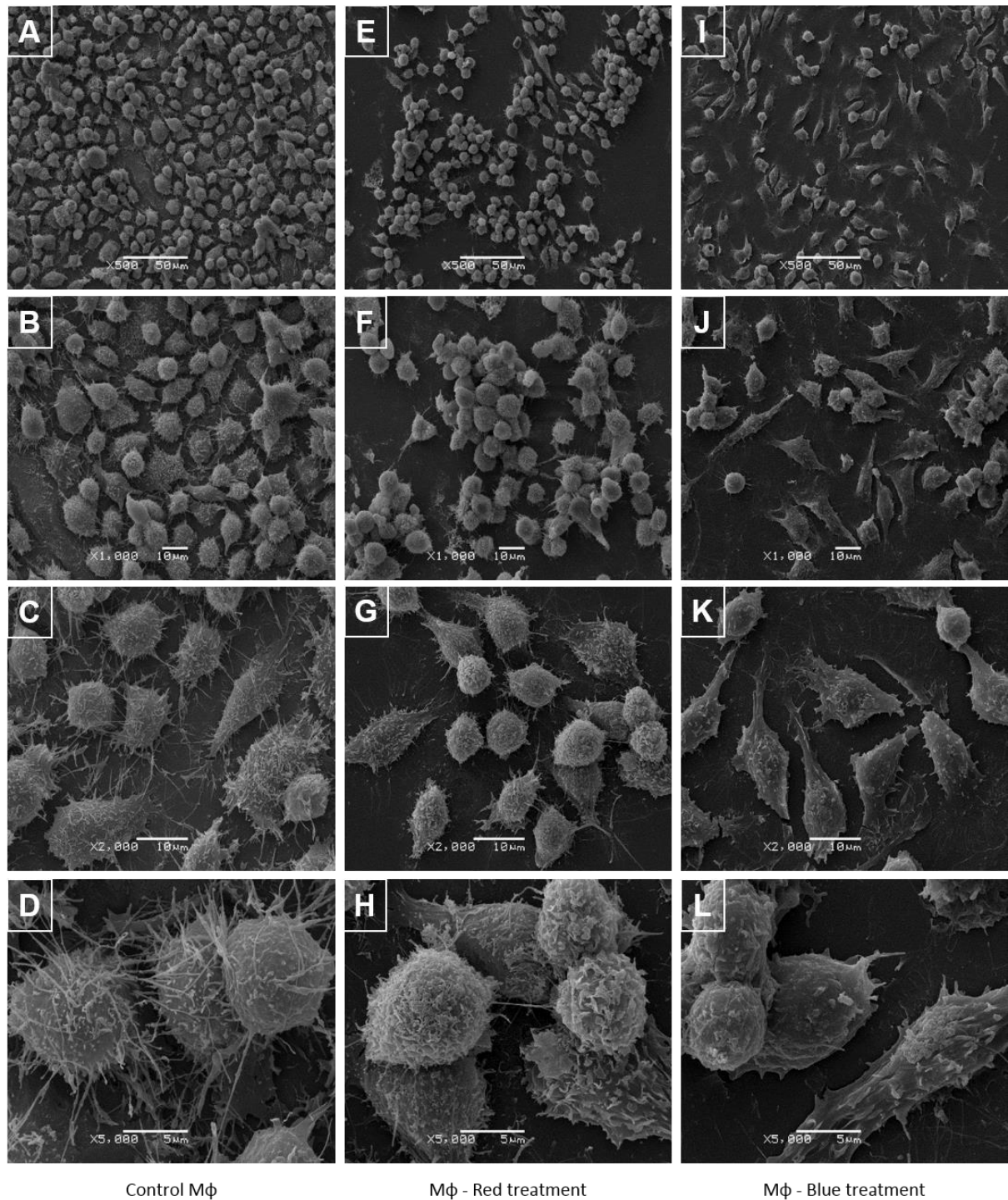


Control Mφ

Mφ - Red treatment

Mφ - Blue treatment

**Figura 9.** Análise morfológica de fibroblastos murinos (BALB 3T3) após 24h de exposição aos corantes RR120 e RB19. Microscopia Eletrônica de Varredura. As imagens foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM 6360LV (Peabody, Massachusetts, USA). Em (A) controle (PBS 1% v/v) em 500x; (B) 1000x; (C) 2000x e (D) 5000x. Em (E) efeitos do tratamento a 500 µg/ml do corante RR120 em 500x; (F) 1000x; (G) 2000x e (H) 5000x. Em (I) efeitos do tratamento a 500 µg/ml do corante RB19 em 500x; (J) 1000x; (K) 2000x e (L) 5000x.

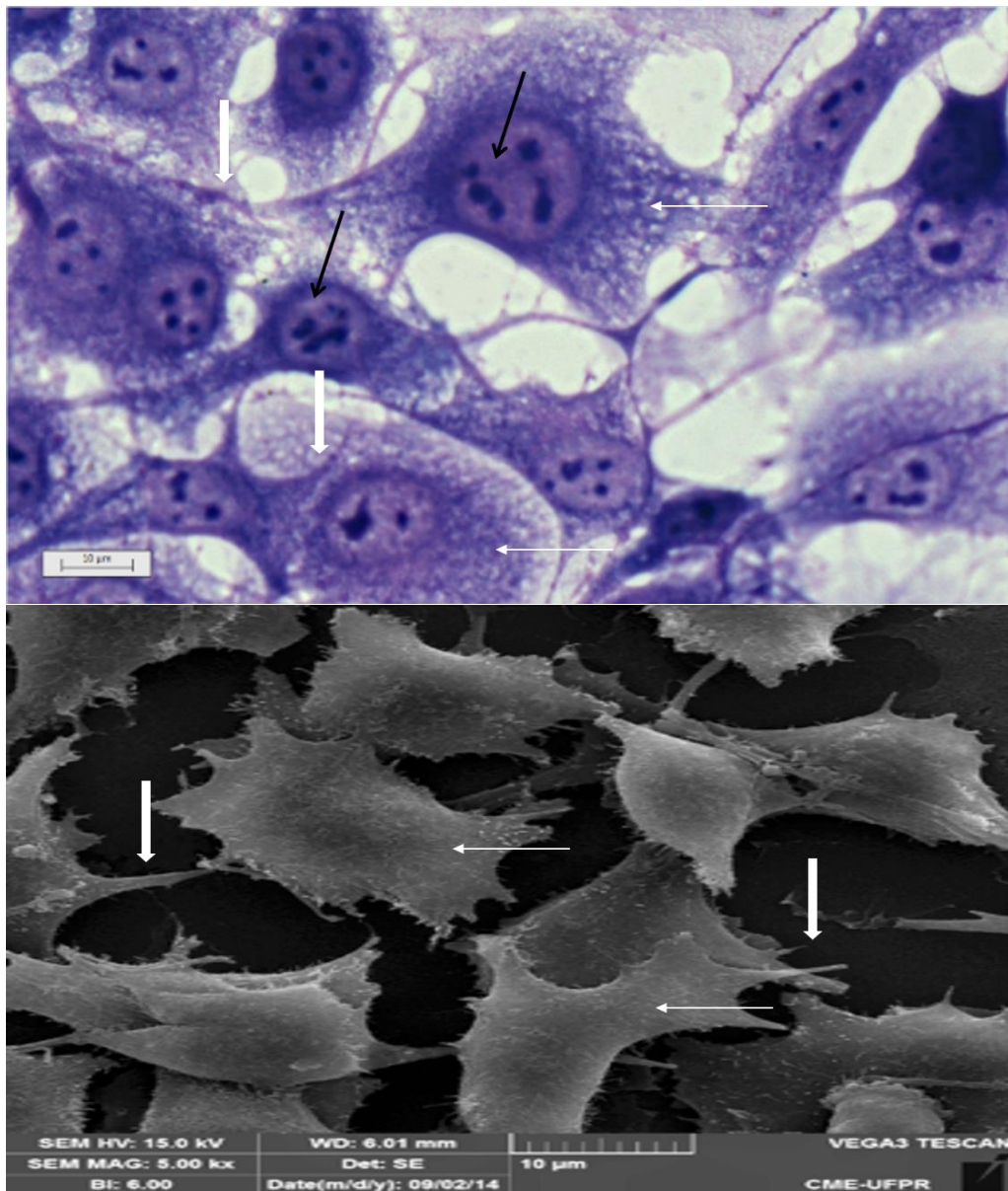


**Figura 10.** Análise morfológica de macrófagos murinos (RAW 264.7) após 24h de exposição aos corantes R120 e RB19. Microscopia Eletrônica de Varredura. As imagens foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM 6360LV (Peabody, Massachusetts, USA). Em (A) controle (PBS 1% v/v) em 500x; (B) 1000x; (C) 2000x e (D) 5000x. Em (E) efeitos do tratamento a 500  $\mu\text{g/ml}$  do corante RR120 em 500x; (F) 1000x; (G) 2000x e (H) 5000x. Em (I) efeitos do tratamento a 500  $\mu\text{g/ml}$  do corante RB19 em 500x; (J) 1000x; (K) 2000x e (L) 5000x.

Os resultados obtidos na microscopia eletrônica de varredura corroboram com as imagens morfológicas da microscopia de luz discutida acima e com os dados das avaliações de citotoxicidade obtidas pelo teste do MTT e ensaio NRU.

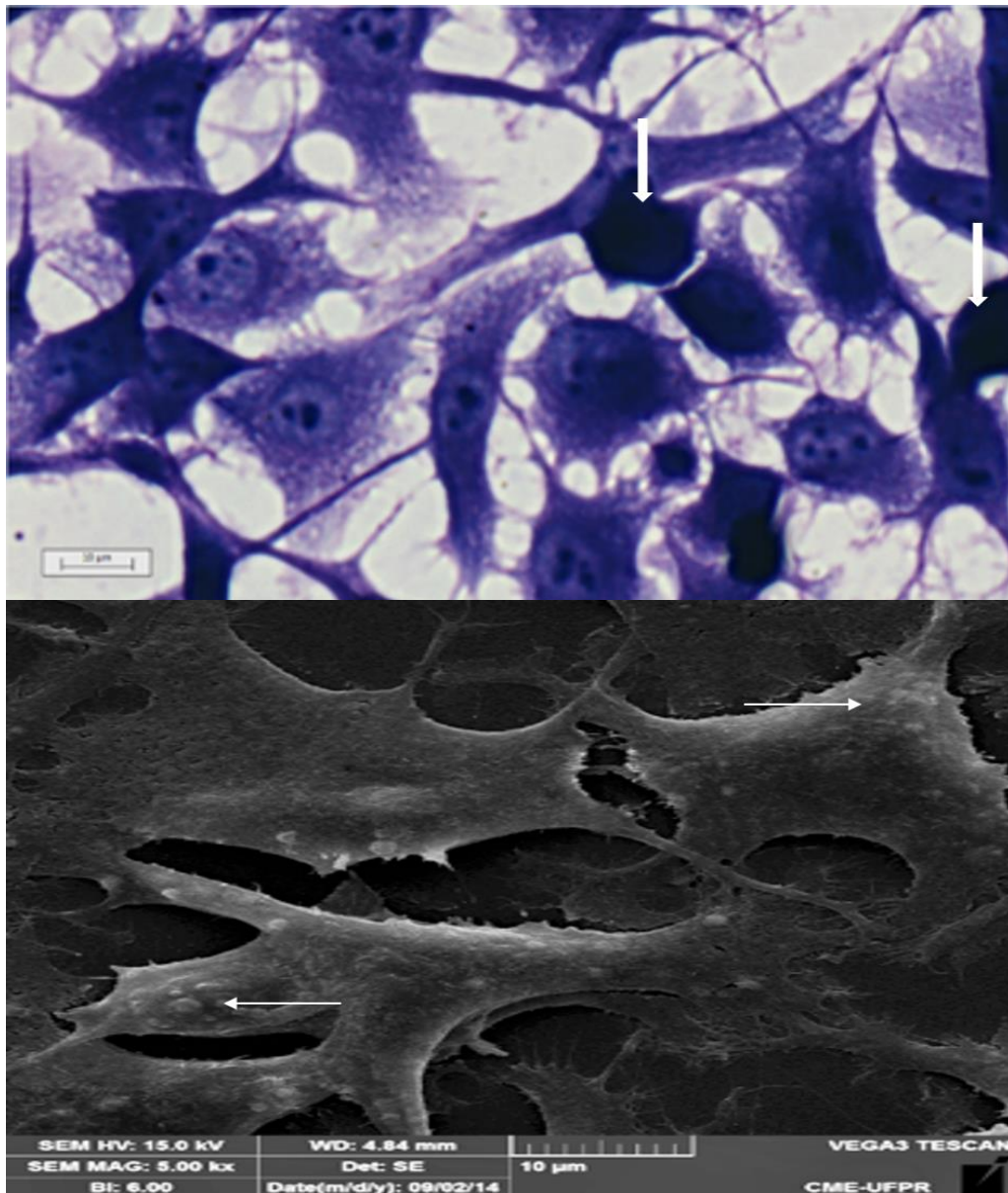
### 5.2.3. Corantes reativos têxteis provocam alteração morfológica em células de linhagem murino BALB 3T3

Conforme observado nas imagens acima (item 2.1 e 2.2), detalhamos abaixo as alterações morfológicas encontradas na linhagem celular BALB 3T3.



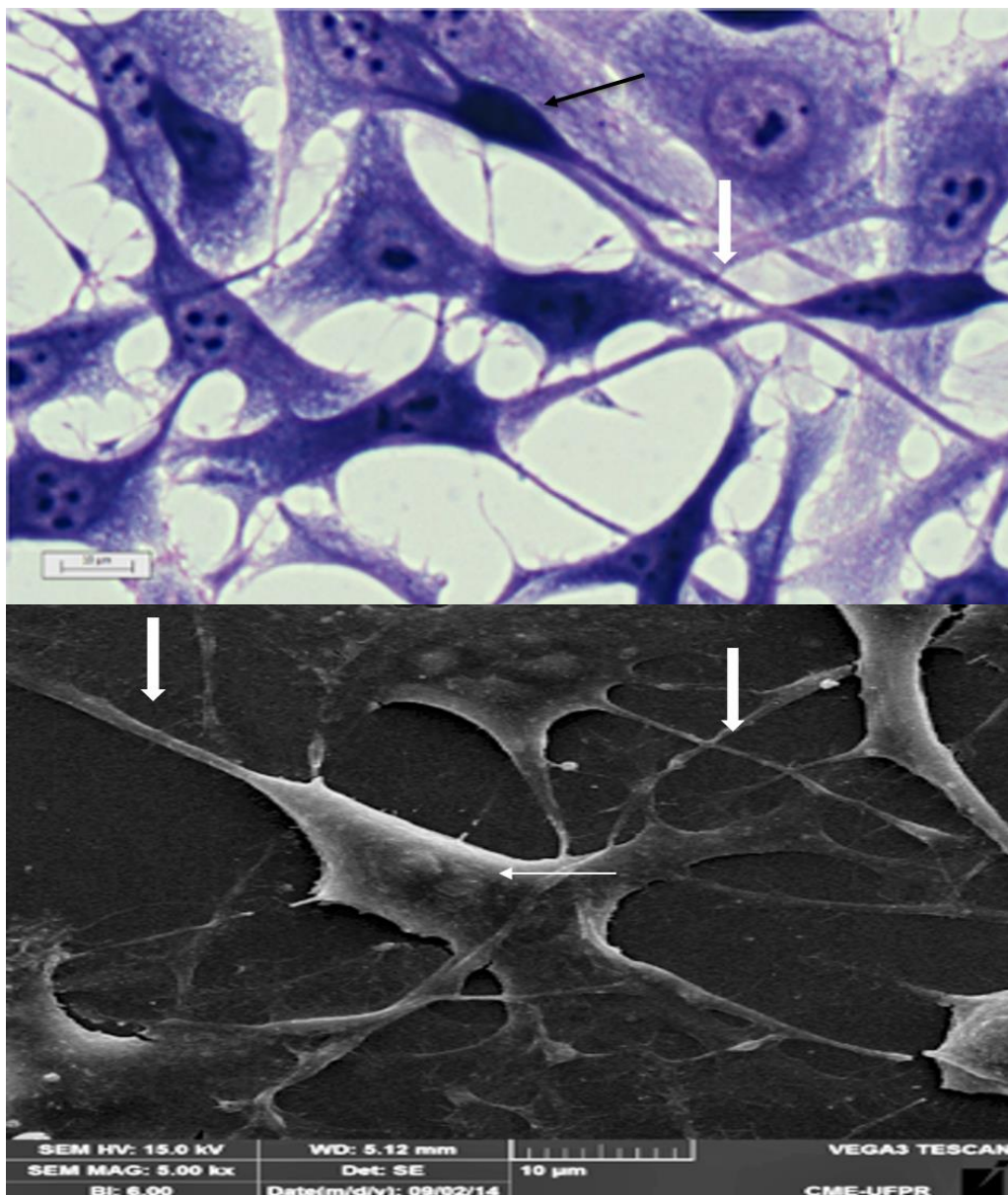
**Figura 11.** Análise morfológica de fibroblastos murinos (BALB 3T3) em situação controle (PBS 1% v/v).

A linhagem de células BALB 3T3 é derivada de fibroblastos murinos (Figura 11), em cultura mantém sua morfologia característica: as células em geral são espreiadas, grande núcleo, com diversos nucléolos (setas pretas), porém ainda rico em eucromatina (alto metabolismo), citoplasma ramificado e abundante (setas brancas finas), poucas, grossas e longas projeções citoplasmáticas (setas brancas grossas), quais permitem o contato com outras células, adesão e contato com o ambiente em geral.



**Figura 12.** Análise morfológica de fibroblastos murinos (BALB 3T3) após 24h de exposição ao corante RR120.

O corante vermelho na concentração de 500 µg/ml diminuiu a densidade celular na lamínula e alterou sua morfologia (Figura 12), deixando-as com citoplasma e núcleo condensados (setas brancas grossas). Com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura é possível perceber que algumas células possuem pequenas expansões na membrana superficial sugestivas de excitose, ficando com a superfície celular bolhosa (setas brancas finas). Este aspecto é característico do processo de apoptose. Em ambas microscopias percebe-se características de alteração morfológica bem definidas, sugerindo início de sofrimento celular (todas as setas).

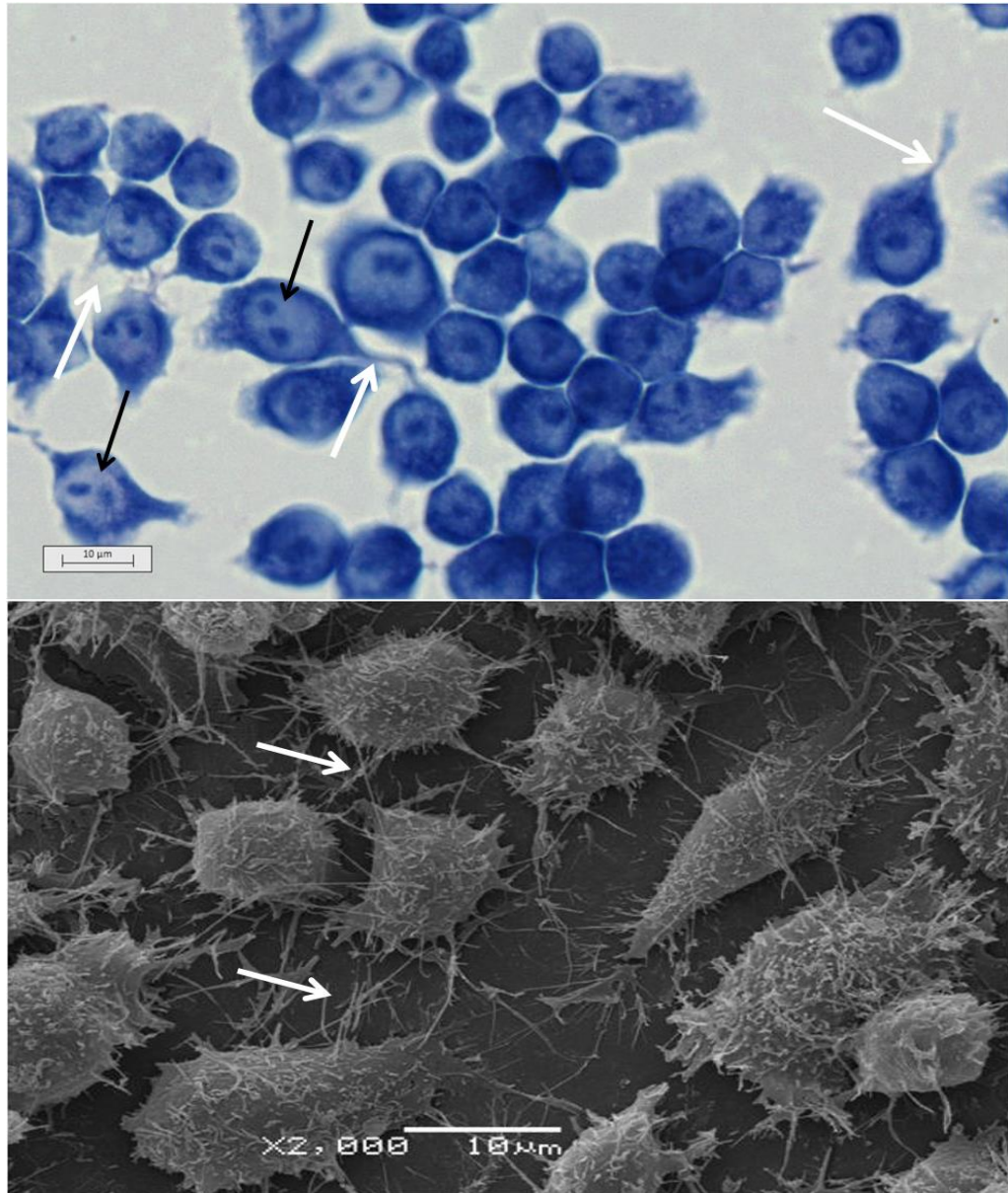


**Figura 13.** Análise morfológica de fibroblastos murinos (BALB 3T3) após 24h de exposição ao corante RB19.

O corante azul também diminuiu a densidade celular (Figura 13), provocando alongamento e afinamento das projeções citoplasmáticas (setas brancas grossas), uma vez que os fibroblastos são extremamente sensíveis ao contato celular para proliferação e divisão celular. Nota-se ainda, um condensamento celular (seta preta). Com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura, nota-se ainda pequenas gotículas sugestivas de exocitose, conferindo superfície celular bolhosa (setas brancas finas), sugerindo início de sofrimento celular. Esse aspecto é característico do processo de apoptose.

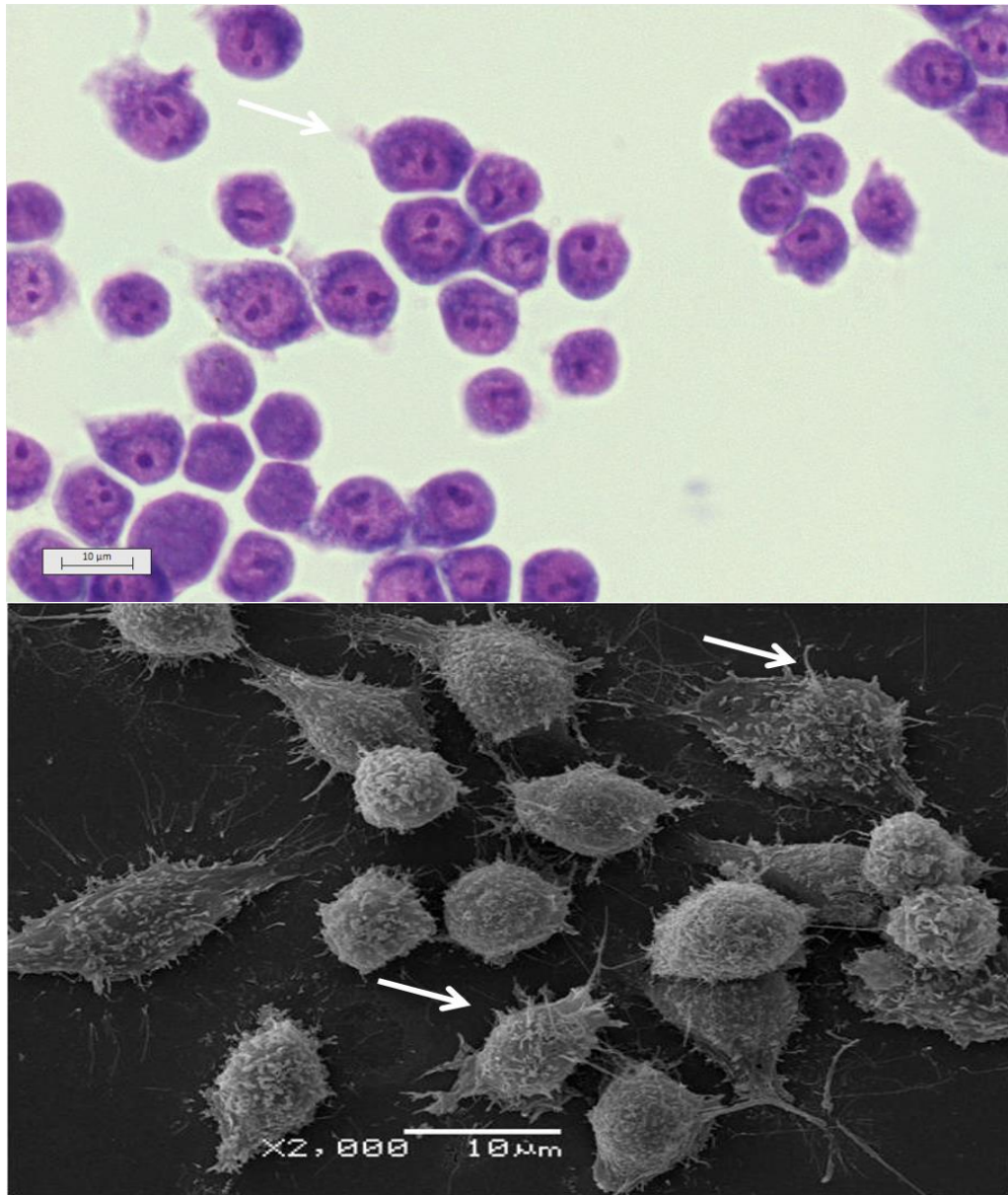
#### **5.2.4. Corantes reativos têxteis provocam alteração morfológica em células de linhagem murino RAW 264.7**

Conforme observado nas imagens a cima (item 2.1 e 2.2), detalhamos abaixo as alterações morfológicas encontradas, provocadas por ambos corantes, RR120 e RB19 à linhagem celular RAW 264.7.



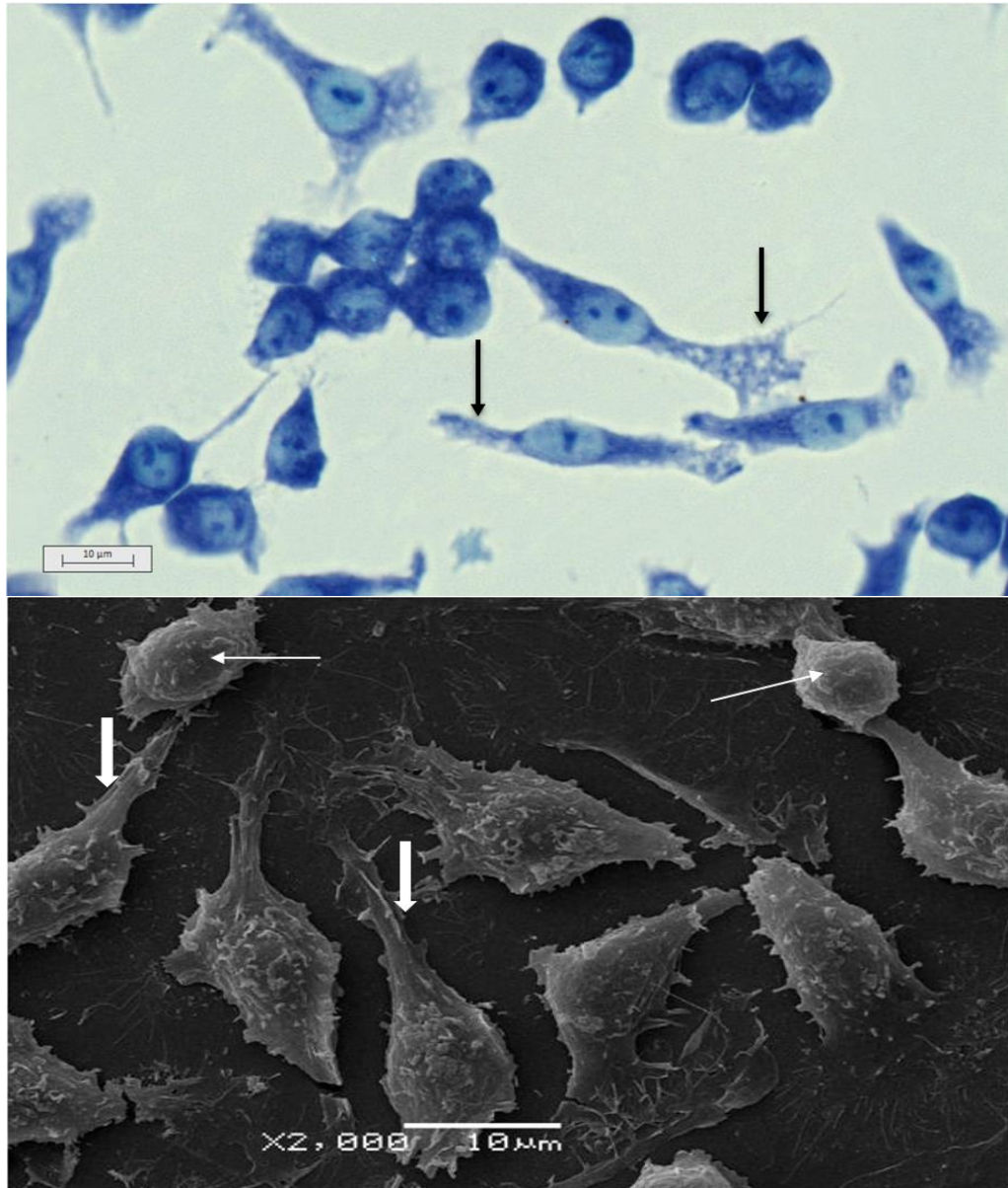
**Figura 14.** Análise morfológica de macrófagos murinos (RAW 264.7) em situação controle (PBS 1% v/v).

A linhagem de células RAW 264.7 é derivada de monócitos murinos (Figura 14), em cultura mantém a morfologia característica de monócitos: a maioria das células são pouco espalhadas, grande núcleo, rico em eucromatina (alto metabolismo), com um ou dois nucléolos (setas pretas), pouco citoplasma, longos e abundantes microvilos filiformes e projeções citoplasmáticas (setas brancas), os quais permitem o contato com outras células, adesão e contato com o ambiente em geral. Esses microvilos são os responsáveis pelo aspecto irregular da superfície celular.



**Figura 15.** Análise morfológica de macrófagos murinos (RAW 264.7) após 24h de exposição ao corante RR120.

O corante vermelho (Figura 15), apesar de aparentemente ser menos tóxico para as células RAW 264.7, ainda assim diminuiu o número de células, diminuindo a densidade celular nas lamínulas. As células possuem menos projeções citoplasmáticas e menores microvilos filiformes (setas brancas), com menos contato entre as células.



**Figura 16.** Análise morfológica de macrófagos murinos (RAW 264.7) após 24h de exposição ao corante RB19.

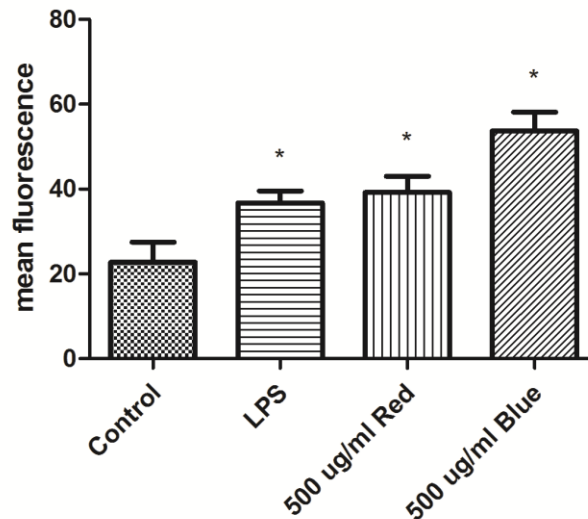
O corante azul (Figura 16), na concentração de 500 µg/ml diminuiu a densidade de células RAW 264.7 na lamínula e alterou sua morfologia, deixando-as mais alongadas (setas brancas grossas), com a maioria dos microvilos e projeções citoplasmáticas curtos e menos contato entre as células. Nota-se também que o citoplasma ficou mais vacuolizado (setas pretas). Com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura é possível perceber que algumas células praticamente perdem essas expansões citoplasmáticas, ficando com a superfície celular apenas ondulada e levemente enrugada (setas brancas finas), sugerindo início de sofrimento celular.

### 5.3. Corantes reativos têxteis estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células de pele murino

As figuras 17 e 18 a seguir, mostram os resultados da quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) dos fibroblastos (BALB 3T3) e macrófagos (RAW 264.7) respectivamente, após exposição aos corantes RR120 e RB19, onde utilizamos um controle (PBS 1% v/v) e como controle positivo Lipopolissacarídeo (LPS 10 ng/mL), sendo todos os tratamentos com exposição de 24 horas.

#### 5.3.1. Produção de ROS em BALB 3T3 por exposição à corantes reativos

ROS production in reactive dyes exposed BALB 3T3

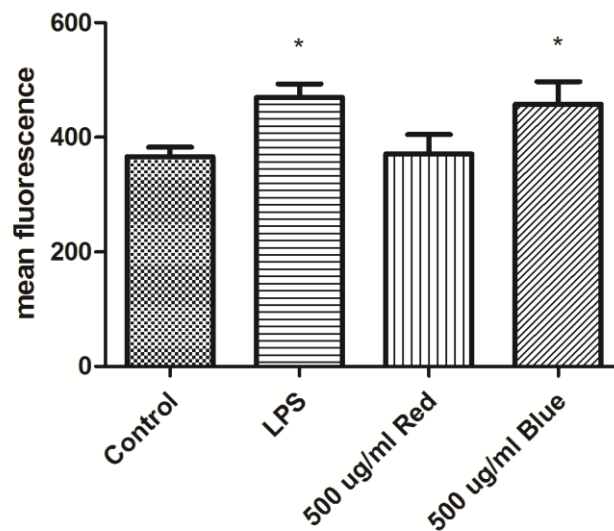


**Figura 17.** Efeitos dos corantes reativos têxteis na produção de espécies reativas de oxigênio em fibroblastos murinos BALB 3T3. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA, Tukey).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 17, observou-se, para a linhagem BALB 3T3, que ambos os corantes induziram aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. Observa-se que o corante RR120 induziu uma diferença que foi semelhante à do controle positivo (LPS). O corante RB19 induziu aumento ainda maior que o produzido pela presença de LPS na cultura.

### 5.3.2. Produção de ROS em RAW 264.7 por exposição à corantes reativos

ROS production in reactive dyes exposed RAW 264.7



**Figura 18.** Efeitos dos corantes reativos têxteis na produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos murinos RAW 264.7. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA, Tukey).

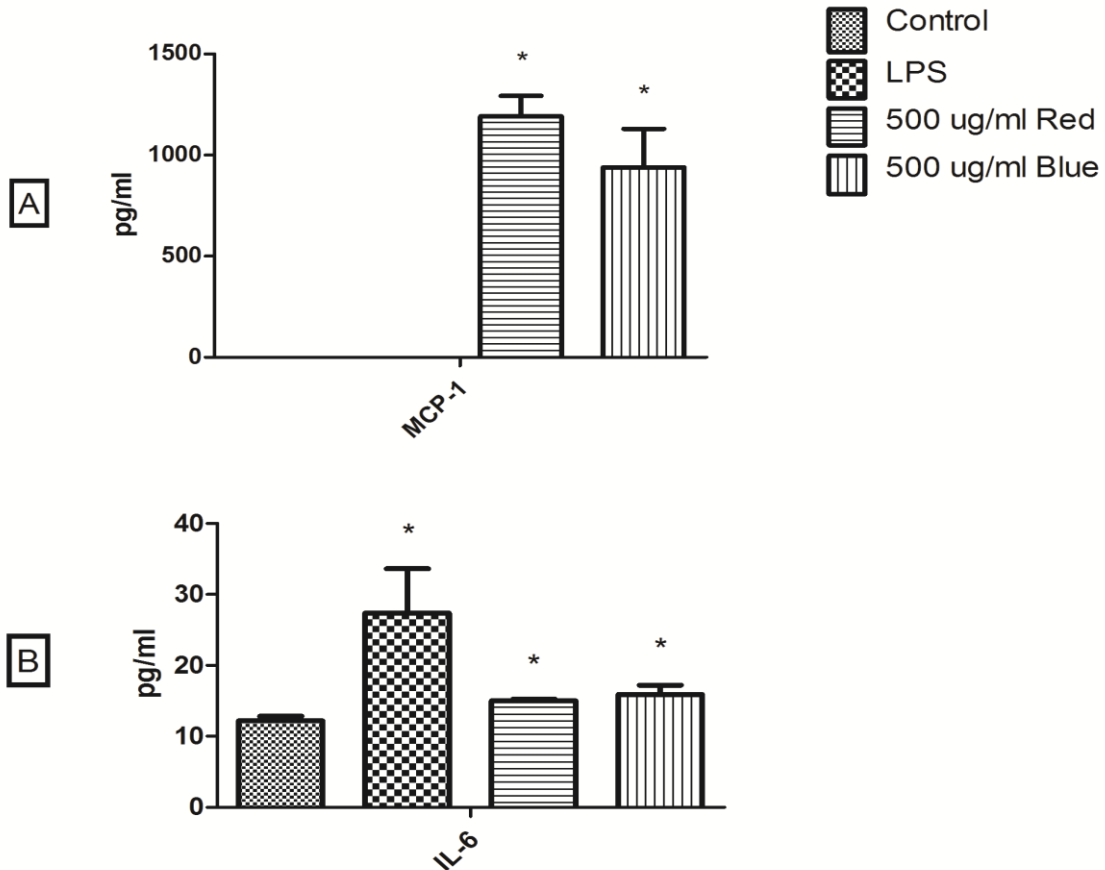
Já na Figura 18, com relação a linhagem RAW 264.7, observou-se leve aumento da produção de espécies reativas após exposição de ambos corantes em comparação ao controle, porém, este aumento foi significativo apenas para o corante RB19, estatisticamente semelhante ao controle positivo (LPS).

### 5.4. Corantes reativos têxteis estimulam a liberação de citocinas inflamatórias em células de pele murino

A seguir, as figuras 19 e 20, mostram os resultados da quantificação de citocinas inflamatórias liberadas por fibroblastos (BALB 3T3) e macrófagos (RAW 264.7) respectivamente, após exposição aos corantes RR120 e RB19, onde utilizamos um controle (PBS 1% v/v) e como controle positivo o Lipopolissacarídeo (LPS 10 ng/mL), sendo todos os tratamentos com exposição de 24 horas.

### 5.4.1. Secreção de citocinas por BALB 3T3 após exposição à corantes reativos

#### Cytokines secretion by fibroblasts

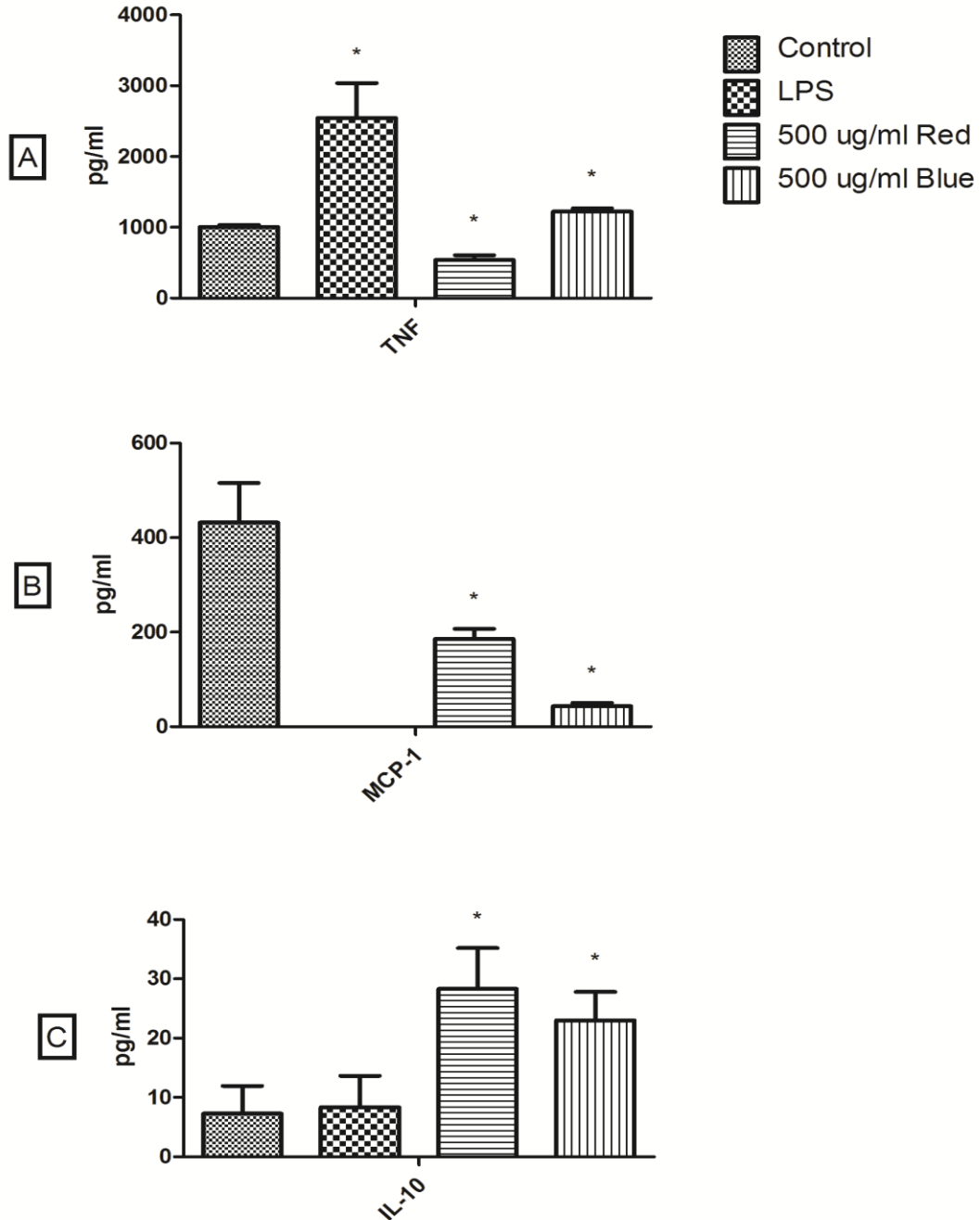


**Figura 19.** Efeitos dos corantes reativos têxteis na secreção de citocinas inflamatórias em fibroblastos murinos BALB 3T3. **(A)** MCP-1; **(B)** IL-6. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA, Tukey).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 19, observou-se, para a linhagem BALB 3T3, que ambos os corantes induziram aumento estatisticamente significativo na secreção da proteína MCP-1, sendo maior o aumento induzido pelo corante vermelho RR120. Não houve detecção de fluorescência para os controles, resultado coerente uma vez que os fibroblastos não são células que se caracterizam pela produção de citocinas inflamatórias. Observa-se também aumento na secreção de IL-6 para ambos corantes, com maior aumento para o controle positivo (LPS). Nenhuma produção significativa de IL-12p70, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-10 por fibroblastos expostos aos corantes foi detectada.

### 5.4.2. Secreção de citocinas por RAW 264.7 após exposição à corantes reativos

#### Cytokines secretion by macrophages



**Figura 20.** Efeitos dos corantes reativos têxteis na secreção de citocinas inflamatórias em macrófagos murinos RAW 264.7. **(A)** TNF; **(B)** MCP-1; **(C)** IL-10. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA, Tukey).

Nota-se que além de promover alterações na secreção de citocinas inflamatórias em ambas linhagens celulares, os corantes demonstraram diferentes resultados, sendo específicos para cada célula e citocina avaliada.

Na Figura 20, com relação a linhagem RAW 264.7, nota-se diferenças na secreção da citocina TNF após exposição aos corantes. Observa-se maior aumento na secreção desta citocina para o controle positivo (LPS) e logo após para o corante azul RB19. Já para o corante RR120 observa-se diminuição na secreção desta citocina. Com relação a MCP-1, não foi detectado fluorescência para o controle positivo (LPS), porém, observa-se diminuição na secreção desta citocina para ambos corantes, sendo mais significativo para o corante azul RB19 e em seguida para o corante vermelho RR120. Com relação a IL-10, nota-se aumento na secreção desta citocina para ambos corantes, com maior aumento para o corante vermelho RR120.

De acordo com o manual de instruções do kit utilizado para quantificação da secreção destas citocinas, “BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit Instruction Manual” (Catálogo No. 552364), deve-se obedecer a curva padrão pré-definida de concentrações, isto é, de 10 a 5.000 pg/mL. Desta forma, os valores detectados na citocina IL-6 não foram considerados para a linhagem RAW 264.7, uma vez que observou-se aumento apenas do controle positivo (LPS). Nenhuma produção significativa de IL-12p70 e IFN- $\gamma$  por macrófagos expostos aos corantes foi detectada.

## 6. DISCUSSÃO

Uma ampla gama de produtos químicos, naturais e sintéticos, são utilizados dentro da confecção de produtos têxteis, permitindo desta forma que partículas destes produtos possam entrar em contato direto com a pele, promovendo reações paralelas indesejáveis (ORLOWSKI *et al.*, 2013), dentre estes produtos químicos estão os corantes têxteis (HATCH; MAIBACH 1995; LADEMANN *et al.*, 2009). Uma vez que o suor liberado na pele favorece o desprendimento do corante, favorecendo a exposição as células (LEME *et al.*, 2014), e a sua configuração foi engenhada para reagir eficientemente com substâncias portadoras de grupos amina e hidroxila presentes nas fibras naturais, porém também presentes em todos os organismos vivos, construindo então uma rota perigosa pela qual se pode absorver estas

substâncias, promovendo reações alérgicas, inflamatórias e a sensibilização da pele (SEIDENARI *et al.*, 2002; BETTS *et al.*, 2005; BROOKSTEIN, 2009).

Neste sentido, e de acordo com o cenário acadêmico e industrial, nacional e internacional para o desenvolvimento de testes que não utilizem animais na avaliação da segurança e eficácia de produtos químicos (HU *et al.*, 2009; AEBY *et al.*, 2009; MCKIM *et al.*, 2010), buscamos através de métodos *in vitro*, possíveis respostas inflamatórias à corantes reativos têxteis, através da quantificação de mediadores específicos e avaliação da morfologia celular após exposição à corantes (IAN *et al.*, 1995; SCHEMAN *et al.*, 2008).

Em relação aos efeitos dos corantes nas linhagens celulares aqui estudadas, os resultados obtidos neste trabalho demonstram diminuição na viabilidade celular quando expostas aos corantes na concentração de 500 µg/ml. Estes efeitos corroboram as imagens obtidas através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, posto que, nas imagens de controle (Figura 11 e 14) as células mantiveram suas características morfológicas, com o núcleo rico em eucromatina (alto metabolismo), citoplasma característico e microvilos normais, permitindo o contato com as células vizinhas, adesão e contato com o ambiente em geral. Já nas imagens com o corante RR120 (Figura 12 e 15), apesar de aparentemente ser menos tóxica para as células, sofreram leve diminuição na densidade celular e alteração em suas características normais. Na linhagem BALB 3T3, sofreram condensação celular e percebe-se pequenos “blebs” sugerindo excitose e possível apoptose, ficando com a superfície celular bolhosa, indicando sofrimento celular. Por outro lado, na linhagem RAW 264.7, as células não se condensaram, porém apresentaram menos projeções citoplasmáticas e menores microvilos em comparação com o controle, desta forma, permitindo menor contato entre as células vizinhas e com o meio em geral. Nas imagens com o corante RB19 (Figura 13 e 16), as células também sofreram diminuição no número celular e alteração em suas características normais, o que provocou na linhagem BALB 3T3, alongamento e afinamento das projeções citoplasmáticas, condensamento celular e pequenas gotículas de excitose. Na linhagem RAW 264.7, as células ficaram mais alongadas, com a maioria das projeções citoplasmáticas curtas e menos contato entre as células, percebe-se também que algumas células perderam seus microvilos e ficaram com o citoplasma vacuolizado, o que pode ser explicado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio quando exposto especificamente ao corante.

Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (ROS), quando presentes em concentrações elevadas podem provocar apoptose celular (WANG *et al.*, 2000; TOCHHAWNG *et al.*, 2013), razão de se investigar se a exposição aos corantes alteraria ROS intracelular. Verificou-se que ambos corantes, RR120 e RB19, aumentaram a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) na linhagem BALB 3T3, sendo mais acentuado com o corante RB19 (Figura 17). Já na linhagem RAW 264.7 (Figura 18), apenas o corante RB19 induziu aumento na liberação, mais uma vez corroborando maior efeito nocivo deste corante.

Estudos anteriores apontam que o aumento na citotoxicidade celular pode ser decorrente ao aumento na concentração de ROS em células da pele em linhagens murinas (DUH *et al.*, 2012). Neste contexto ainda, o DNA das células cutâneas é surpreendentemente danificado pelo estresse oxidativo gerado em consequência da exposição diária à radiação ultravioleta (RUV) (SCHARFFETTER-KOCHANNEK *et al.*, 2000; NAGANO, 2003) e corantes têxteis (LEME *et al.*, 2014).

Sabe-se que os radicais livres induzem alterações na expressão gênica das células e, o processo inflamatório contribui intensamente para a degradação dos componentes da matriz extracelular (SCHARFFETTER-KOCHANNEK *et al.*, 2000; ISHIDA; SAKAGUSHI, 2007). Neste sentido, o aumento da atividade oxidante demonstrada neste trabalho por ambos corantes testados, podem ser parcialmente responsáveis pela atividade inflamatória observada.

Em vista da importância de se manter a integridade da unidade matricial intersticial para a organização do tecido cutâneo como um todo, avaliamos os efeitos dos corantes na produção de mediadores inflamatórios em culturas de fibroblastos e macrófagos murinos, linhagem BALB 3T3 e RAW 264.7, respectivamente. Os resultados demonstraram importante efeito nas linhagens celulares após exposição aos corantes, uma vez que foram capazes de responder significativamente e especificamente aos mesmos.

Vale lembrar que a morte celular e as reações inflamatórias subsequentes são os principais fatores do processo cumulativo de dano tecidual, o que pode provocar colapso funcional do órgão e alterar as características morfológicas e biofísicas da pele (GIACOMONI; REIN, 2001).

Com relação a linhagem BALB 3T3, observa-se um aumento das citocinas inflamatórias MCP-1 e IL-6 após exposição aos corantes (Figura 19). O corante RR120 induziu maior aumento da proteína MCP-1 em comparação ao corante RB19,

porém ambos foram significativos. Este fato pode ser explicado pela principal função da MCP-1, uma proteína quimiotática de monócitos (conhecida também por CCL2), atraindo monócitos e macrófagos para o local. Esta proteína é secretada principalmente por monócitos, macrófagos e células dendríticas (CORSINI; GALLI, 2000). Os fibroblastos quando expostos aos corantes, foram capazes de liberar grandes quantidades de MCP-1, aparentemente em uma tentativa de atrair monócitos e macrófagos para o local. Estudos anteriores demonstram a capacidade de células da pele em aumentar a síntese de proteínas inflamatórias quando expostas a substâncias químicas tóxicas (ORLOWSKI *et al.*, 2013). Segundo Corsini e Galli (2000), a MCP-1 possui a capacidade de ativar mastócitos e aumentar a expressão de mRNA de histidina descarboxilase, desta forma, impulsionando a inflamação crônica da pele. Em seres humanos quase todos os tecidos possuem histamina pré-formada em quantidades variáveis e, em grandes quantidades na pele, pulmões, e na mucosa intestinal. A histamina manifesta efeitos pró-inflamatórios como a indução da produção de IL-6 e IL-8 em ação conjunta ou não com outras interleucinas inflamatórias, como TNF ou IL-1 (KANDA; WATANABE, 2007).

Ainda sobre a linhagem BALB 3T3, o corante RR120 aumentou a produção de IL-6, porém o corante RB19 teve maior aumento. A exposição ao LPS induziu um aumento ainda maior, fato esperado, uma vez que existem dados sólidos na literatura, apontando o LPS como estimulante para a produção de IL-6 em monócitos e fibroblastos (HELFGOTT *et al.*, 1987; SEHGAL, 1992). Portanto, o corante RB19 não só induziu um maior aumento na liberação de ROS intracelular, como da IL-6. Essa interleucina é uma citocina pleiotrópica com diversas atividades biológicas, produzida por células tanto linfóides como não linfóides, participando da regulação do sistema imunitário, e na resposta de fase aguda da inflamação. Desta forma a IL-6 é um mediador essencial da resposta inflamatória em uma inflamação localizada (HIRANO; KISHIMOTO, 1992; FATTORI *et al.*, 1994).

Com relação a linhagem RAW 264.7, tivemos importantes resultados no seu perfil inflamatório após exposição aos corantes (Figura 20). É de conhecimento geral que os macrófagos são células fagocitárias e são componentes do sistema imunológico natural. Se originam na medula óssea como monócitos, circulam no sangue, amadurecem e tornam-se ativados em vários tecidos. Nos tecidos residentes recebem outros nomes, por exemplo na pele, células de Langherans

(BEUTLER, 2004; KRISHNATRY; BRAZEAU; FUNG, 2009). Considerando as diferentes localizações, as principais funções dos macrófagos são de fagocitar microrganismos e de produzir citocinas que irão promover o recrutamento e a ativação de outras células inflamatórias. Além do processo de fagocitose, os macrófagos podem ser ativados via receptores através da ligação de um ligante que irá promover a ativação de diferentes vias de sinalização intracelular, o que resultará na produção e secreção de diferentes substâncias como citocinas e quimiocinas (BEUTLER, 2004; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009).

Considerando suas características descritas na literatura, observa-se com relação aos resultados obtidos, que o corante RR120 diminuiu a produção da proteína TNF e MCP-1, porém aumentou significativamente a quantidade de IL-10. Os macrófagos são os principais produtores de TNF, os quais têm um papel importante na regulação da produção de citocinas e recrutamento de outras células inflamatórias, como neutrófilos e monócitos (DRISCOLL, 1994; ORLOWSKI *et al.*, 2013). Vale ressaltar que o LPS é o mais importante estimulador de liberação de TNF por macrófagos (MA *et al.*, 2003; BEUTLER, 2004). Estudos anteriores apontam o aumento de IL-10 quando produzidas em excesso por RAW 264.7, podem possuir efeitos supressivos sobre as respostas pró-inflamatórias. Além disso, a IL-10 limita a ativação e diferenciação de células T nos nódulos linfáticos e pode inicialmente estender os seus efeitos inibitórios para monócitos e macrófagos. Também uma citocina responsável por mediar IL-4, IL5 e IL-13, citocinas responsáveis pela ativação da resposta imunitária humoral, e responsáveis por inibir a resposta imunológica celular (WI *et al.*, 2012), sendo portanto, coerente que o aumento da IL-10 também diminui a produção de TNF e MCP-1. Portanto, da mesma forma que o corante RR120, o corante RB19 diminuiu significativamente a quimiocina MCP-1 e aumentou a IL-10, também sugerindo um aumento do perfil de resposta imunológica humoral.

O aumento detectado na citocina TNF para o corante RB19 na linhagem RAW 264.7, corrobora com os resultados anteriores, sobre o efeito agudo nocivo deste corante, não influenciando na regulação das outras citocinas, uma vez que, não alterou o perfil de resposta com aumento da IL-10. Vale ressaltar que o TNF em níveis elevados provoca injúria tecidual e morte celular (MA *et al.*, 2003), talvez responsável pelo efeito nocivo na morfologia celular, juntamente com o aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio.

Em conjunto estes resultados demonstram os efeitos nocivos dos corantes RR120 e RB19 aumentando a resposta oxidante e inflamatória através de diferentes mediadores. Estes dados possuem grande importância para a avaliação de segurança de produtos químicos de maneira geral, em especial de corantes têxteis, uma vez que podem entrar em contato direto com as células da pele. Estes resultados demonstram também a importância e qualidade de resultados utilizando como métodos de avaliação, testes *in vitro* em substituição aos testes em animais.

## 7. CONCLUSÃO

Concluimos que os corantes reativos RR120 e RB19, amplamente utilizados pela indústria têxtil como opção para coloração de vestimentas, quando avaliados *in vitro* em cultivo de fibroblastos e macrófagos murinos, apresentam atividade tóxica, oxidante e inflamatória, sendo capaz de alterar a produção de diferentes mediadores. Os dados sugerem que a atividade biológica detectada pode estar relacionada à estrutura química do corante, mais especificamente aos seus diferentes grupos cromóforos, RR120 um azo corante e o RB19 um corante antraquinona, sendo que o RB19 que possui o grupo azo demonstrou maior efeito nocivo as linhagens celulares estudadas.

De maneira geral as conclusões do presente trabalho, sobre os corantes reativos têxteis, são:

- Ambos corantes possuem citotoxicidade significativa a partir da concentração de 500 µg/ml nas linhagens BALB 3T3 e RAW 264.7;
- Ambos corantes alteram a morfologia celular característica, sendo o corante RB19 mais nocivo para ambas linhagens provocando maior sofrimento celular;
- Ambos corantes aumentaram a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na linhagem BALB 3T3 e, apenas o corante RB19 aumentou a produção de ROS na linhagem RAW 264.7.
- Ambos corantes induzem a resposta imunitária celular na linhagem BALB 3T3, aumentando a produção de citocinas responsáveis pelo recrutamento de monócitos e células do sistema imunológico.

- Ambos corantes induzem resposta imunitária humoral na linhagem RAW 264.7, alterando a liberação das citocinas inflamatórias.
- Os testes *in vitro* realizados se mostraram próprios para detecção de possível toxicidade, sendo uma alternativa para substituição a testes que utilizem animais.

Diante disso, pesquisas com estes e outros corantes devem ser continuadas a fim de complementar os dados obtidos neste trabalho e, para obtermos uma base de dados de segurança sólida de corantes disponíveis para utilização pela indústria têxtil no Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARONSON, S.A.; TODARO, G.T. Development of 3T3-like Lines from Balb/c Mouse Embryo Cultures: Transformation Susceptibility to SV40. **J. Cell. Physiol.**, v. 72, p. 141-148, 1968.
- ABELSON, H.T.; RABSTEIN, L.S. Lymphosarcoma: Virus-induced Thymic-independent Disease in Mice. **Cancer Research**, v. 30, p. 2213-2222, 1970.
- ABIT, Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção. **Cartilha de Regime Tributário Competitivo para Confecção – RTCC**. Brasília, junho de 2013. Cartilha.
- AEBY, P. *et al.* Skin Sensitization to p-Phenylenediamine: The Diverging Roles of Oxidation and N-Acetylation for Dendritic Cell Activation and the Immune Response. **J Invest Dermatol.**, v. 129, p. 99-109, 2009.
- ÂLCANTARA, M.R.; DALTIM, D. Química do Processamento Têxtil. **Quim. Nova**, v. 19, p. 320-330, 1996.
- ASP, L. *et al.* Effects of pro-inflammatory cytokines on expression of kynurenine pathway enzymes in human dermal fibroblasts. **J Inflammation.**, v. 8, n. 25, 2011.
- AUSUBEL, F.M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? **Nature Immunology**, v. 6, p. 973-979, 2005.
- BAE, J.S.; FREEMAN, H.S. Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the *Daphnia magna*. **Dyes and Pigments**, v. 73, n. 1, p. 81-85, 2007.
- BETTS, C.J.; DEARMAN, R.J.; KIMBER, I.; MAIBACH, H.I. Potency and risk assessment of a skin-sensitizing disperse dye using the local lymph node assay. **Contact Dermatitis**, v. 52, p. 268-272, 2005.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, v. 40, p. 845-859, 2004.
- BFR, Federal Institute of Risk Assessment. **Introduction to the problems surrounding garment textiles**, n. 41, p. 1-30, 6 julho 2012. Disponível em: <<http://www.bfr.bund.de/cd/531>>. Acesso em: 28/04/2014.
- BOELSMA, E.; HENDRIKS, H.F.J.; ROZA, L. Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids. **Am J Clin Nutr.**, v. 73, p. 853-864, 2001.
- BOWDISH, D.M.E.; LOFFREDO, M.S.; MUKHOPADHYAY, S.; MANTOVANI, A; GORDON, S. Macrophage receptors implicated in the “adaptive” form of innate immunity. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1680-1687, 2007.
- BRASIL. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. 2ª Edição, Brasília, DF: Anvisa, 2012. Disponível em: <[http://www.saocamilosp.br/biblioteca/ebooks/Guia\\_cosmeticos\\_grafica\\_final.pdf](http://www.saocamilosp.br/biblioteca/ebooks/Guia_cosmeticos_grafica_final.pdf)>. Acesso em: 11/02/2015.

BROOKSTEIN, D.S. Factors Associated with Textile Pattern Dermatitis Caused by Contact Allergy to Dyes, Finishes, Foams, and Preservatives. **Dermatol. Clin.**, v. 27, p. 309-322, 2009.

BRUSCHWEILER, B.; GNEHM, R.; BÜRGI, D.; ZARN, J. Prioritization of textile dyes from a consumer health perspective. **Toxicol. Lett.**, v. 189, p. 236-237, 2009.

CHEQUER, F.M.D.; DORTA, D.J.; OLIVEIRA, D.P. Azo Dyes and Their Metabolites: Does the Discharge of the Azo Dye into Water Bodies Represent Human and Ecological Risks? **Advances in Treating Textile Effluent**, p. 27-48, 2011.

CORSINI, E.; GALLI, C.L. Epidermal cytokines in experimental contact dermatitis. **Toxicol.**, v. 142, p. 203-211, 2000.

COSGROVE, M.C.; FRANCO, O.H.; GRANGER, S.P.; MURRAY, P.G.; MAYES, A.E. Dietary nutrient intakes and skin-aging appearance among middle-aged American women. **Am J Clin Nutr.**, v. 86, p. 1225-1231, 2007.

COSTIN, G.E.; HEARING, V.J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **The FASEB Journal.**, v. 21, p. 976-994, 2007.

DRISCOLL, K.E. Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. **Exp. Lung Res.**, v. 20, p. 473-490, 1994.

FATTORI, E.; CAPPELLETTI, M.; COSTA, P. *et al.* Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 1243-1250, 1994.

FERRAZ, E.R.A.; GRANDO, M.D.; OLIVEIRA, D.P. The azo dye Disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*. **J. Hazard Mater.**, v. 192, p. 628-633, 2011.

FORSS, J.; WELANDER, U. Biodegradation of azo and anthraquinone dyes in continuous systems. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 227-237, 2011.

DIEAMANT, G.C.; VELAZQUEZ, M.D.C.; EBERLIN, S.; NOGUEIRA, C.; WERKA, R.M.; SANTOS, I.M.N.S.R.; PERÓN, C.R.G.S.; QUEIROZ, M.L.S. Relievene® SK: neuroimunomodulação para o tratamento dermocosmético da pele sensível / Relievene® SK: neuroimmunomodulation for dermocosmetic treatment of sensitive skin. **Rev. Bras. Med.**, v. 65, p. 34-45, 2008.

DUH, P.D.; CHEN, Z.T.; LEE, S.W.; LIN, T.P.; WANG, Y.T.; YEN, W.J.; KUO, L.F.; CHU, H.L. Antiproliferative activity and apoptosis induction of Eucalyptus Citriodora resin and its major bioactive compound in melanoma B16F10 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 32, p. 7866-7872, 2012.

GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **Journal of Immunological Methods**, v. 94, n. 1-2, p. 57-63, 1986.

GIACOMONI, P.U.; REIN, G. Factors of skin aging share common mechanisms. **Biogerontology**, v. 2, p. 219–229, 2001.

GOLDSMITH, L.A. Skin effects of air pollution. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 114, p. 217-219, 1996.

GORDON S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 23-25, 2003.

GORDON, S.; TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity, **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 953-964, 2005.

GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes Têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.

HATCH, K.L.; MAIBACH, H. Textile dyes dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, p. 631-639, 1995.

HELFGOTT, D.C.; MAY, L.T.; STHOEGER, Z. *et al.* Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of 132 interferon by human fibroblasts. **J. Exp. Med.**, v. 166, p. 1300-1309, 1987.

HINNEBUSCH, B.J.; FISCHER, E.R.; SCHWAN, T.G. Evaluation of the Role of the Yersinia pestis Plasminogen Activator and Other. **J. Infect. Dis.**, v. 178, p. 1406-1415, 1998.

HIRANO, T; KISHIMOTO, T. In the 46th Forum in Immunology 'Molecular Biology and Immunology of Interleukin-6'. **Res. Immunol.**, v. 143, p. 723-783, 1992.

HOLBROOK, K.A. The biology of human fetal skin at ages related to prenatal diagnosis. **Pediatr Dermatol**, v.1, p. 97-111, 1983.

HU, T.; KALUZHNY, Y.; MUN, G.C.; BARNETT, B.; KARETSKY, V.; WILT, N.; KLAUSNER, M.; CURREN, R.D.; AARDEMA, M.J. Intralaboratory and interlaboratory evaluation of the EpiDerm™ 3D human reconstructed skin micronucleus (RSMN) assay. **Mutation Research**, v. 673, p. 100-108, 2009.

HUBNER, K. History - 150 Years of mauveine. **Chemie in unserer Zeit**, v. 40, n. 4, 274–275, 2006.

HUME, D.A. The mononuclear phagocyte system. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, p. 49-53, 2006.

HUNGER, K. **Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications**. 3th Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003.

IAN, K. *et al.* An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. **Toxicology**, v. 103, n. 1, p. 63-73, 1995.

KANDA, N.; WATANABE, S. Histamine enhances the production of human-defensin-2 in human keratinocytes. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 293, p.1916-1923, 2007.

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

KLUYTMANS, J.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 3, p. 505-520, 1997.

KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress – New approaches for their evaluation. **Biomed & Pharmacother**, v. 53, p. 181-192, 1999.

KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; NAGANO, T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 13, p. 2446–53, 1998.

KRISHNATRY, A.S.; BRAZEAU, D.A.; FUNG, H. Broad regulation of matrix and adhesion molecules in THP-1 human macrophages by nitroglycerin. **Nitric Oxide**, In press: doi:10.1016/j.niox.2009.10.004, 2009.

ISHIDA, T; SAKAGUCHI, I. Protection of human Keratinocytes from UVB-Induced Inflammation Using Root Extract of *Lithospermum erythrorhizon*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 5, p. 928-934, 2007.

JAGER, I.; HAFNER, C.; SCHNEIDER, K. Mutagenicity of different textile dye products in *Salmonella typhimurium* and mouse lymphoma cells. **Mutat. Res.**, v. 561, p. 35-44, 2004.

LADEMANN, J.; PATZELT, A.; WORM, M.; RICHTER, H.; STERRY, W.; MEINKE, M. Analysis of in vivo penetration of textile dyes causing allergic reactions. **Laser Phys. Lett.**, v. 6, p. 759-763, 2009.

LEME, D.M.; OLIVEIRA G.A.; MEIRELES G.; SANTOS T.C.; ZANONI M.V.; OLIVEIRA D.P. Genotoxicological assessment of two reactive dyes extracted from cotton fibres using artificial sweat. **Toxicol. in Vitro**, v. 28, p. 31-38, 2014.

LITMAN, G.W.; CANNON, J.P.; DISHAW, L.J. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 866-879, 2005.

LORD, C.J.; ASHWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v. 481, p. 287–294, 2012.

MA, J.; CHEN, T.; MANDELIN, J.; CEPONIS, A.; MILLER, N.E.; HUKKANEN, M.; MA, G.F.; KONTTINEN, Y.T. Regulation of macrophage activation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 2334-2346, 2003.

MARTINEZ, F.O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophage: an immunologic functional perspective. **The Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 451-483, 2009.

MCKIM, J.M.Jr *et al.* A new in vitro method for identifying chemical sensitizers combining peptide binding with ARE/EpRE-mediated gene expression in human skin cells. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v.29, p. 171-192, 2010.

MEINKE, M.; ABDOLLAHIA, M.; GÄHR, F.; PLATZEK, T.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Migration and penetration of a fluorescent textile dye into the skin – in vivo versus in vitro methods. **Exp. Dermatol.**, v. 18, p. 789-792, 2009.

MELLMAN, I. Antigen processing and presentation by dendritic cells: cell biological mechanism. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 560, p. 63-67, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAGANO T. Significance of anti-oxidant effects in cosmetic science. In: TAKEDA K.; HARADA S.; ANDO M. **Funcional Cosmetology**. Japan: Society of Cosmetic Chemists of Japan, p. 55-60, 2003.

NOVOTNY, C.; DIAS, N.; KAPANEN, A.; MALACHOVA, K.; VANDROVCOVA, M.; ITAVAARA, M.; LIMA, N. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. **Chemosphere**, v. 63, p. 1436-1442, 2006.

OECD Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the Testing of Chemicals. **OECD 432 - In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test**. Adopted on April 13, 2004.

OECD Organization for Economic Cooperation and Development. **Environment Directorate Joint Meeting Of The Chemicals Committee And The Working Party On Chemicals, Pesticides And Biotechnology**. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, Number 149. ENV/JM/MONO(2011)30, 126pp. **Balb/c 3t3 Cell Transformation Assay Prevalidation Study Report**, Paris, France, 2012.

ORLOWSKI, P.; KRZYZOWSKA, M.; ZDANOWSKI, R.; WINNICKA, A.; NOWAKOWSKA, J.; STANKIEWICZ, W.; TOMASZEWSKA, E.; CELICHOWSKI, G.; GROBELNY, J. Assessment of in vitro cellular responses of monocytes and keratinocytes to tannic acid modified silver nanoparticles. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p. 1798-1808, 2013.

O'SULLIVAN, R. L.; LIPPER, G.; LERNER, E.A. The Neuro-Immuno-Cutaneous-Endocrine Network: Relationship of Mind and Skin. **Arch Dermatol**, v. 134, p. 1431-1435, 1998.

- RAMAMOORTHY, L.; TIZARD, I.R. Induction of apoptosis in a macrophage cell line RAW 264.7 by acemannan, a  $\beta$ -(1,4)-acetylated mannan. **Molecular Pharmacology**, v. 53, p. 415-421, 1998.
- RASCHKE, W.C.; BAIRD, S.; RALPH, P.; NAKOINZ, I. Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. **Cell**, v. 15, p. 261-267, 1978.
- RYBERG, K.; GOOSSENS, A.; ISAKSSON, M.; GRUVBERGER, B.; ZIMERSON, E.; NILSSON, F.; BJÖRK, J.; HINDSEN, M.; BRUZE, M. Is contact allergy to disperse dyes and related substances associated with textile dermatitis? **Br. J. Dermatol.**, v. 160, p. 107-115, 2009.
- RONOT, X.; BENEL, L.; ADOLPHE, M.; MOUNLOU, J.C. Mitochondrial analysis in living cells: the use of rhodamine 123 and flow cytometry. **Bioogy of the Cell**, v. 57, p. 1-7, 1986.
- SALLUSTO, F. ; LANZAVECCHIA, A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. **Arthritis Res.**, v. 4, n. 3, p. 127-132, 2002.
- SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. *et al.* Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Exp Gerontolol.**, v. 35, n.3, p. 307-316, 2000.
- SCHEMAN, A.; JACOB, S.; ZIRWAS, M.; WARSHAW, E.; NEDOROST, S.; KATTA, R.; COOK, J.; CASTANEDO-TARDAN, M.P. Contact Allergy: Alternatives for the 2007 North American Contact Dermatitis Group (NACDG) Standard Screening Tray. **Dis. Mon.**, v. 54, p. 7-156, 2008.
- SCHNEIDER, K.; HAFNER, C.; JÄGER, I. Mutagenicity of textile dye products. **J. Appl. Toxicol.**, v. 24, p. 83-91, 2004.
- SEHGAL, P.B. Regulation of IL6 gene expression. **Res. Immunol.**, v. 143, p. 724-734, 1992.
- SEIDENARI, S.; GIUSTI, F.; MASSONE, F.; MANTOVANI, L. Sensitization to Disperse Dyes in a Patch Test Population Over a Five-Year Period. **American Journal of Contact Dermatitis**, v. 13, n. 3, p. 101-107, 2002.
- SELVATICI, R.; FALZARANO, S.; MOLLICA, A.; SPISANI, S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, v. 534, p. 1-11, 2006.
- SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J. Neuroendocrinology of the Skin. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 5, p. 457-487, 2000.
- STAHLMANN, R.; WEGNER, M.; RIECKE, K.; KRUSE, M.; PLATZEK, T. Sensitising potential of four textile dyes and some of their metabolites in a modified local lymph node assay. **Toxicology**, v. 219, p. 113-123, 2006.
- STREILEIN, J.W. The skin-associated lymphoid tissue (SALT): origins and functions. **J Invest Dermatol**, v.80, p. 12-16, 1983.

TOBIN, D.J. Biochemistry of human skin—our brain on the outside. **Chem. Soc. Rev.**, v. 35, p. 52-67, 2006.

TOCHHAWNG, L.; DENG, S.; PERVAIZ, S.; YAP, C.T. Redox regulation of cancer cell migration and invasion. **Mitochondrion**, v. 13, n. 3, p. 246-253, 2013.

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

UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.S.; WARREN, S.H.; OLIVEIRA, D.P.; TERAQ, Y.; WATANABE, T.; CLAXTON, L.D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. **Chemosphere**, v. 60, p. 55-64, 2005.

VAN FURTH, R.; DIESSELHOF-DEN DULK, M.M.C.; MATTIE, H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 138, p. 1314-1330, 1973.

VARIN A.; GORDON S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. **Immunobiology**, v. 214, n. 7, p. 630-641, 2009.

VENKATARAMAN, K. The chemistry of synthetic dyes. The reactive dyes. **Academic Press**, New York, v. 7, 1978.

WANG, H.H.; MCINTOSH, A.R.; HASINOFF, B.B.; RECTOR, E.S.; AHMED, N.; NANCE, D.M.; ORR, F.W. B16 Melanoma Cell Arrest in the Mouse Liver Induces Nitric Oxide Release and Sinusoidal Cytotoxicity : A Natural Hepatic Defense against Metastasis. **Cancer Research**, p. 5862-5869, 2000.

WI, H.J.; JIN, Y.; CHOI, M.; HONG, S.; BAE, Y.M. Predominance of IL-10 and TGF- $\beta$  production from the mouse macrophage cell line, RAW264.7, in response to crude antigens from *Clonorchis sinensis*. **Cytokine**, v. 59, p. 237-244.

WYSOCKI, A.B. Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. **Nurs. Clin. North. Am.**, v. 34, n. 4, p. 777-797, 1999.