

Universidade Católica de Pelotas  
Escolas de Psicologia e Medicina  
Mestrado em Saúde e Comportamento

**“Avaliação Histológica Seriada e Ultraestrutural  
da Fitofotodermatite Experimental em Ratos  
provocada pelo Limão Taiti ”**

Valéria Magalhães Jorge

Orientador: Dr. Hiram Larangeira de Almeida Junior

Dissertação apresentada à Universidade Católica de  
Pelotas como requisito parcial para obtenção do título de  
Mestre em Saúde e Comportamento

Pelotas, agosto de 2006

Ao Josayres, Marcelo e Rafaela,  
razão maior de tudo

## **Agradecimentos**

Ao Dr. Hiram de Almeida Junior, meu orientador;

Aos meu pais, Nasser e Norma, pelo incondicional apoio e incentivo;

À Elisa Curi Hallal, estagiária, pelo desprendimento no desenvolver do experimento;

À Cristiane Casarin Silva, histotécnica do Centro de Anatomia Patológica (CAP), pela realização das lâminas de histologia;

Ao Dr. Mário Amado, responsável pelo Biotério da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL);

À Nara Moreira Rocha e Luis Antônio Suíta de Castro, da Embrapa CPA-CT Pelotas, pela Microscopia Eletrônica de Transmissão;

À Dr<sup>a</sup>. Marta Amaral, pelo auxílio na revisão bibliográfica;

À Flávia Jonas, pela disponibilidade e atenção dispensadas.

## Índice:

Agradecimentos.....	página 03
Projeto de Pesquisa.....	página 05
▪ Introdução.....	página 06
▪ Material e Métodos.....	página 13
▪ Objetivos.....	página 16
▪ Autorização pela comissão de Ética.....	página 16
▪ Cronograma.....	página 17
Resultados.....	página 18
Discussão.....	página 53
Conclusão:.....	página 56
Referências Bibliográficas.....	página 57
Artigo.....	página 61

# **Projeto de Pesquisa**

## INTRODUÇÃO

As dermatoses por plantas (ou fitodermatoses) podem ser classificadas em vários subtipos: 1. lesão mecânica; 2. lesão farmacológica; 3. fitodermatite irritante primária; 4. fitodermatite alérgica; 5. pseudofitodermatite; 6. fitofotodermatite (FFD) e 7. pseudofitofotodermatite.<sup>1</sup>

1. lesão mecânica: corresponde a lesões traumáticas por plantas com ocasionais infecções secundárias ou granulomas por corpo estranho como, por exemplo, as lesões por espinhos de cactos;

2. lesão farmacológica: desenvolvem-se por contato com plantas que liberam substâncias ativas farmacologicamente, podendo acometer todas as pessoas afetadas por essas plantas. As plantas da família Urticaceae (urtiga) são as maiores responsáveis por tais reações;

3. fitodermatite irritante primária: constitui-se de plantas que produzem irritação primária na pele pela liberação de substâncias exsudadas diretamente na superfície ou quando a planta é rompida. São representadas pelas eufórbias, cuja seiva é irritativa;

4. fitodermatite alérgica: dermatite alérgica produzida por plantas resulta usualmente de reação de hipersensibilidade tipo IV (mediada por células), mas poucas plantas têm sido relatadas por causar reação urticariforme. O componente antigênico é contido na resina, seiva ou pólen;

5. pseudofitodermatite: essa erupção parece derivar de plantas, mas na realidade são causadas por artrópodes que habitam as plantas ou por agentes aplicados nestas;

6. fitofotodermatite: ocorre por contato com plantas seguido de irradiação com luz ultravioleta de comprimento de ondas longas (UVA) que produzem uma característica dermatite. Esta é fototóxica, ou seja, por efeito direto, sem participação do sistema imunológico;

7. pseudofitofotodermatite: reação resultante de uma furocumarina não produzida pela planta, mas por fungos que a infectam.

Destaca-se que a fotosensibilização da pele ocasionada por plantas relacionadas com a presença de psoralenos, também conhecidos como furocumarínicos, foi descrita pela primeira vez por Kuske em 1938 . Ele identificou psoralenos naturais em plantas, como fotosensibilizantes e isolou o bercapten (5-metóxi-psoraleno) do azeite de bergamota. Este estudo foi a primeira indicação de que psoralenos são agentes fotoativos<sup>2,3</sup>.

Os psoralenos são uma classe natural de produtos presentes em muitas plantas de quatro diferentes famílias: *Umbelliferae*, *Rutaceae*, *Moraceae* e *Leguminosae*, como por exemplo as frutas cítricas, principalmente os limões, no figo e no aipo<sup>3</sup>. Estes psoralenos naturais têm sido identificados como fitoalexinas; são parte da respostas defensivas das plantas contra fungos e insetos. Em 1957, pesquisas evidenciaram que os psoralenos são ativos por raios ultravioletas A (UV-A)<sup>2,3</sup>.

Os psoralenos são compostos heterocíclicos aromáticos, derivados da condensação de um anel furano com o anel cumarínico<sup>2</sup>.

Todas as plantas que causam fitofotodermatite contêm psoralenos. Somente 1 mg de 8- metóxi-psoraleno por centímetro quadrado da pele é necessário para produzir bolhas após 2.4J/ cm<sup>2</sup> (mais ou menos 10 minutos de luz solar do verão, em Colorado)<sup>2,3</sup>.

FFD é uma reação fototóxica inteiramente independente do sistema imunológico. Os ingredientes necessários para produzi-la incluem exposição temporal a ambos: substância fotossensibilizante e radiação ultravioleta por isso, são classificadas como reação fototóxica, diferenciando-se das reações fotoalérgicas, nas quais existe componente imunológico<sup>3, 4, 5, 6</sup>.

O espectro de emissão de luz solar natural alcança a Terra variando de aproximadamente 270-5000nm. Essa reação eletromagnética consiste de fótons, com uma recíproca relação entre o comprimento da onda e a energia destes. Somente a luz que é absorvida pela pele pode causar reação fotoquímica. Dentro do espectro da luz, a UV-A (ultravioleta A - 320-380nm) é responsável pela grande maioria das foto-reações, resultando em FFD<sup>7</sup>.

Quando um fóton com apropriado comprimento de onda, choca-se com um psoraleno, a energia é absorvida, elevando este químico ao triplo do estado básico. Ao retornar ao estado básico, a energia é liberada sobre a forma de calor, fluorescência, e/ou fosforescência; então um foto-produto pode se formar<sup>3, 6,7</sup>.

Há vários padrões clínicos de FFD: 1. *Dermatitis bullosa striata pratensis* (DBSP), 2. Dermatite em berloque. 3. Fitofotodermatite clássica<sup>1</sup>.

DBSP resulta da exposição a psoralenos, encontrados naturalmente em plantas. Os pacientes afetados têm contato fortuito com plantas ao ar livre, com exposição concomitante ao sol. A erupção começa 24hs depois da exposição, como um eritema que se torna bolhoso. Como as plantas deslizam sobre a pele, quando o indivíduo tem contato com as mesmas, as lesões são lineares. A cura resulta em intensa hiperpigmentação durando semanas a meses e é freqüentemente útil como pista diagnóstica.

A Dermatite em berloque ocorre pela aplicação de perfumes ou colônias contendo psoralenos, os quais classicamente contêm óleo de bergamota (ingrediente ativo 5-metóxi-psoraleno). A hiperpigmentação pode durar meses e ocorre, frequentemente, ao redor do pescoço, onde os perfumes são aplicados.

Fitofotodermatite clássica consiste numa erupção cutânea inflamatória fototóxica, por lesão celular dos psoralenos e da luz solar. Em Pelotas - RS estima-se uma incidência de 16 casos por 100.000 hab/verão; ao redor de 50 casos são vistos, por verão nesta cidade. Mais comumente, os pacientes manipulam limões taiti em caipirinhas ou como guarnição (Figura 1); por isso, a localização mais freqüente é o dorso das mãos (Figura 2). Inclusive, casos graves com bolhas intensas, afetando ambas as mãos, são freqüentes. Também ocorre, de os pacientes passarem a mão no tronco e produzirem queimaduras à distância. Já vimos também

crianças afetadas por terem sido tocadas por adultos que manipulavam os limões<sup>4,8</sup>.

Salienta-se que a FFD pode simular várias dermatoses, sendo, por vezes, de difícil diagnóstico clínico<sup>9, 10</sup>. Casos de queimaduras graves por uso de "bronzeadores" com folhas de figo são relatados, bem como sua ocorrência profissional<sup>11-13</sup> e afetando vários indivíduos de forma epidêmica<sup>9,10</sup>.

A pigmentação pós-inflamatória ocorre por dois mecanismos: Primeiro, a melanina normalmente encontrada na epiderme cai na derme e é englobada por melanófagos; segundo, há um aumento do número de melanócitos funcionais e melanossomos. A população de melanócitos dobrará ou triplicará dentro de sete a dez dias, bem como a hipertrofia e arborização também são vistos<sup>3, 4</sup>.

A atividade da tirosinase aumenta sintetizando mais melanina, que é demonstrada em um número crescente de melanossomas encontrada nos melanócitos e transferida aos queratinócitos da camada de Malpighi. Essa hiperpigmentação aparece uma ou duas semanas após a exposição a radiação ultra-violeta e dura meses ou anos, e talvez sirva como mecanismo protetor contra novas lesões<sup>3</sup>.

Existem pouquíssimas informações sobre os achados histológicos das reações fototóxicas, provavelmente devido ao fato, de os diagnósticos serem estabelecidos clinicamente. É relatada degeneração epitelial em uma publicação, na qual foi realizada histologia ótica. Em outra FFD provocada pelo aipo, a biópsia de uma vesícula demonstrou espongirose, microvesículas e vesículas e um esparso infiltrado inflamatório em derme<sup>5, 7, 8, 11-13</sup>.

Em um estudo morfológico e imuno-histoquímico de pseudofitofotodermatite, houve ausência de deposição de imunocomplexos na junção dermo-epidérmica, bem como a ausência de dermatite de interface liquenóide. Esses achados suportam a prévia hipótese de lesão induzida fototóxicamente.<sup>5</sup>

Vários modelos animais têm sido utilizados para investigar reações fototóxicas por medicações<sup>14-18</sup>.

Com relação à FFD, havia apenas um trabalho experimental em humanos, realizado com luz artificial<sup>19</sup>. Nosso grupo de pesquisa conseguiu reproduzir experimentalmente a FFD em ratos<sup>8</sup>, demonstrando que pequenos períodos de exposição, de dois e meio minutos, são capazes de induzi-la (Figura 3). Nas biópsias realizadas, foi demonstrada lesão epitelial que surge em 24 h. Não foram realizadas biópsias seriadas tampouco microscopia eletrônica de transmissão nessa primeira pesquisa.

Esclarece-se não haver informações sobre achados ultraestruturais da FFD na literatura pesquisada.

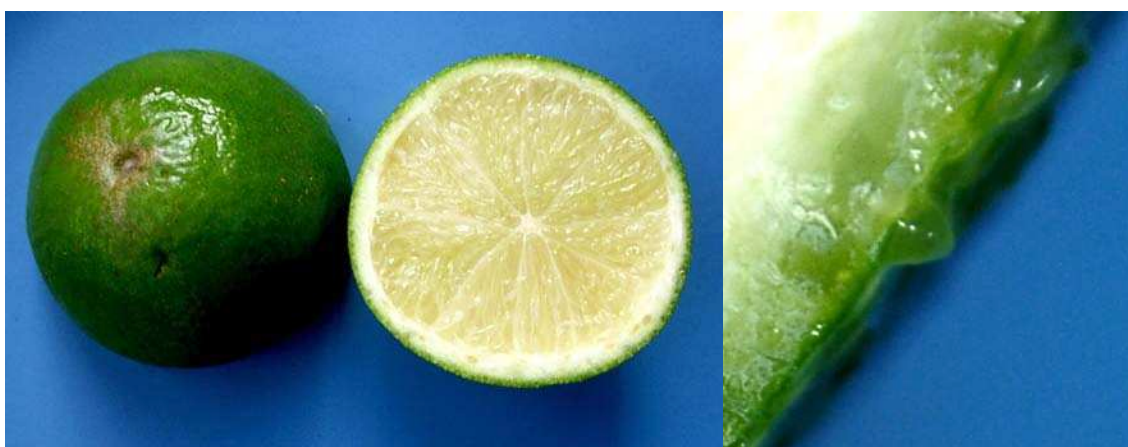


Figura 1. Limão taiti mostrando, no detalhe, gotículas do sumo da casca

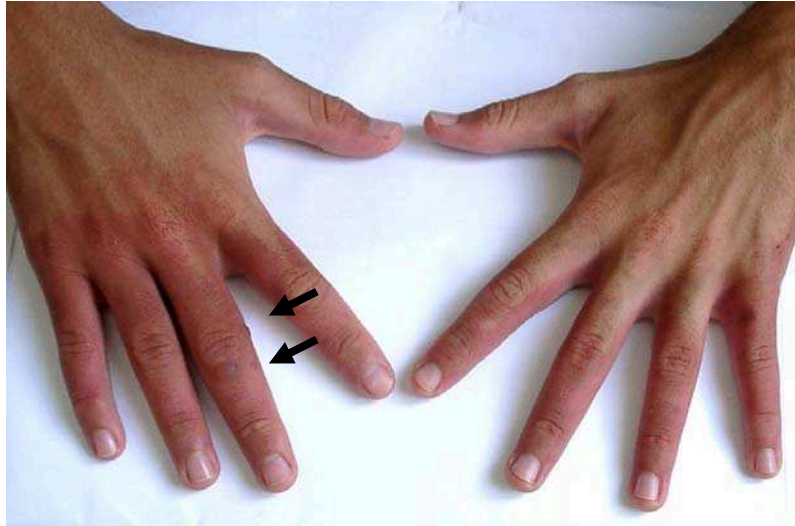


Figura 2: lesão de FFD aguda exibindo eritema e bolhas (setas)



Figura 3 – Lesões experimentais de fitofotodermatite induzidas no dorso de rato depilado previamente. Nota-se evidente eritema e descamação nas áreas onde foi aplicado o sumo da casca do limão taiti, com posterior exposição ao sol, por tempos inferiores a 10 minutos.

## Material e Métodos

Serão utilizados para o experimento quatro ratos albinos (*Rattus norwegicus wistar*) do biotério central da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), previamente depilados manualmente 72 horas antes, a fim de se evitarem artefatos traumáticos.

Após a anestesia com Zoletil 50 ( Cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam) por via intramuscular, com a dose de 50,0mg por kilo, os ratos numerados terão seu dorso direito borrifados com suco da casca do limão taiti e expostos ao sol de verão (2ª quinzena de fevereiro) às 11 horas (horário solar); uma área por 5 minutos e outra por 8 minutos.

O lado esquerdo do dorso dos ratos servirá de controle com exposição ao sol e sem o limão taiti. Um segundo controle será desenvolvido em outra área de pele, exposto somente ao sumo da casca e livre de exposição solar.

As biópsias serão realizadas com "punch" de 3mm, com diferentes intervalos de tempo, após a indução experimental e imediatamente fixadas em formalina a 10% para microscopia ótica e em glutaraldeído, para microscopia eletrônica e processadas de rotina.

Para a microscopia ótica, as lâminas serão coradas com Hematoxilina e Eosina e obtidas após 30 minutos, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 24 h, 48 h e 72 horas da exposição ao sol. Para a microscopia eletrônica, o intervalo após a exposição de 8 minutos será de 2 horas. Os controles somente com sol serão biopsiados

com os mesmo intervalos da MO e somente com limão em 1 h, 24 h e 48 horas.

A avaliação histológica será feita independentemente por um patologista e um dermatologista, com experiência em microscopia com cegamento sobre os tempos de exposição e os intervalos de realização das biópsias.

Os aspectos histológicos avaliados serão: espongiose, vacuolização isolada ou confluenta, atipia dos queratinócitos, necrose, exocitose, microabcesso na camada córnea, bolha sub-córnea, intra-epidérmica ou sub-epidérmica, edema dérmico, congestão, micro-hemorragia e infiltrado inflamatório dérmico. Os achados foram submetidos aos escores: zero quando ausente; 1 quando presente.

Os critérios histológicos considerados serão os seguintes:

**Espongiose:** acúmulo de líquido extracelular dentro da epiderme que causa separação dos queratinócitos.

**Exocitose:** infiltração da epiderme por células inflamatórias ou células sanguíneas

**Vacuolização:** formação de vacúolos intracelulares, acometendo queratinócitos aleatoriamente (isolada) ou grupamentos (confluenta).

**Atipia dos queratinócitos:** células exibindo macronucleose, membrana nuclear irregular, halo peri-nuclear e nucléolo evidente.

**Micro-hemorragia:** presença de hemácias isoladas fora do leito vascular, em derme.

**Congestão:** vasos dérmicos ectásicos com empilhamento de hemácias.

**Necrose:** célula contraída, citoplasma com densa eosinofilia, núcleo encolhido irregular (picnótico), fragmentado (cariorréxis) ou lisado (cariólise).

**Microabcesso:** pequeno agregado de neutrófilos ou eosinófilos.

**Vesícula:** é uma cavidade preenchida por líquido com clivagem dentro ou abaixo da epiderme, contendo plasma e variável componente de células inflamatórias.

**Edema dérmico:** é o acúmulo anormal de líquido intersticial.

**Infiltrado inflamatório dérmico:** presença de leucócitos extravasculares na derme.

## **Objetivos**

### **Objetivo Geral**

- Avaliação histológica seriada e ultraestrutural das lesões provocadas experimentalmente em ratos expostos à luz solar, previamente aspergidos com o sumo da casca do limão taiti.

### **Objetivos Específicos**

- Verificar quanto tempo após a indução experimental surgem as lesões histologicamente.
- Identificar as alterações celulares provocadas.
- Avaliar histologicamente a evolução cronológica das lesões.
- Avaliar com microscopia eletrônica de transmissão em 2 horas após a indução, quais as estruturas subcelulares que são lesadas pelo efeito fototóxico.

### **Aspectos Éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pelotas.

## Cronograma

	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago
<b>Revisão Literatura</b>	X	X	X	X	X								
<b>Elaboração Projeto</b>	X	X											
<b>Indução Experimental</b>						X	X						
<b>Análise dos Dados</b>								X	X	X			
<b>Redação</b>										X	X	X	
<b>Defesa</b>													X

## Resultados

A avaliação histológica da pele do controle dos ratos sem exposição ao sol ou limão mostrou discretas diferenças da pele humana (Figura 4). A epiderme mostra-se mais delgada nos ratos; os folículos pilosos são mais freqüentes e há a atenuação das papilas dérmicas.

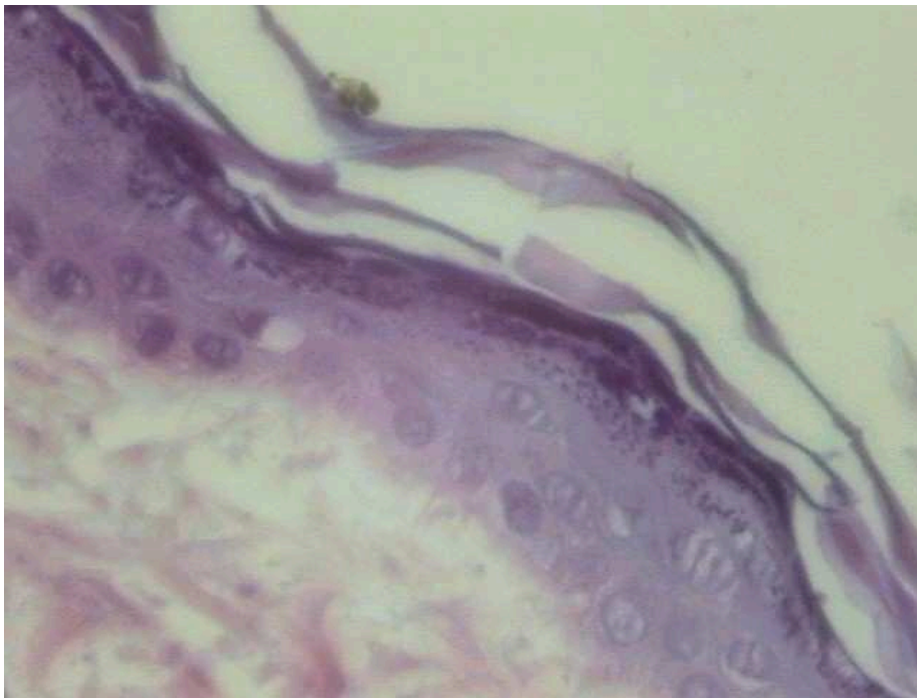


Figura 4: Controle de pele sem limão, sem exposição ao sol: demonstrando o aspecto normal da epiderme do rato. HE 400X

### **Achados com menos de 24 horas**

Os achados histológicos das biópsias de pele dos ratos expostos ao sol por 5 (T5) e 8 minutos (T8), realizadas nos intervalos de tempo de 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas, após a indução experimental da FFD, demonstraram epiderme com aspecto normal, tanto nas áreas aspergidas com limão quanto nos controles (Figuras 5 a 11).

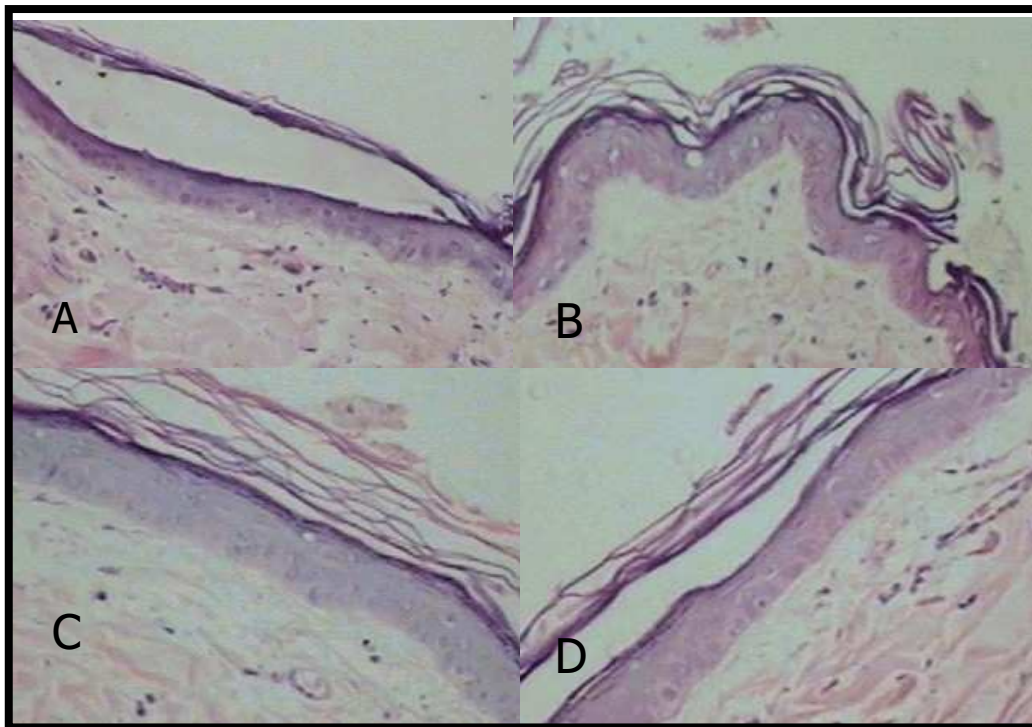


Figura 5: Meia horas após a exposição ao sol: controle de 5 minutos (A), Controle de 8 minutos (C), limão de 5 minutos (B) e limão de 8 minutos (D): sem alterações significativas.

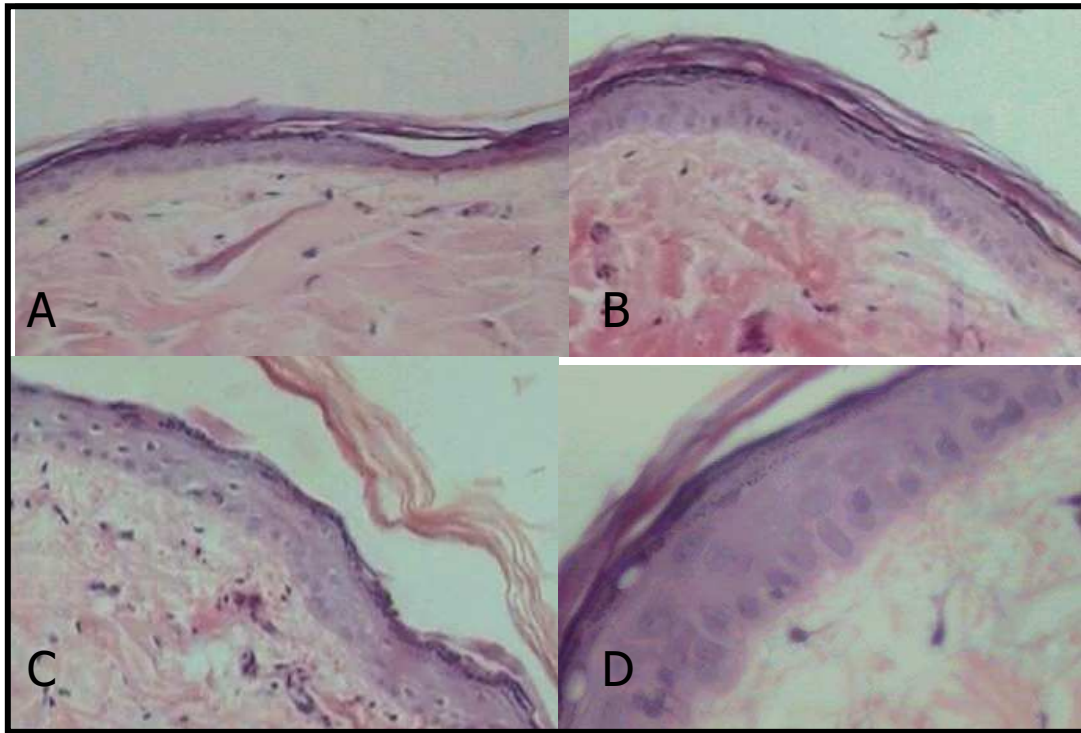


Figura 6: Uma hora após a exposição ao sol: controle de 5 minutos (A), controle de 8 minutos (C), limão de 5 minutos (B) e limão de 8 minutos (D): sem alterações significativas.

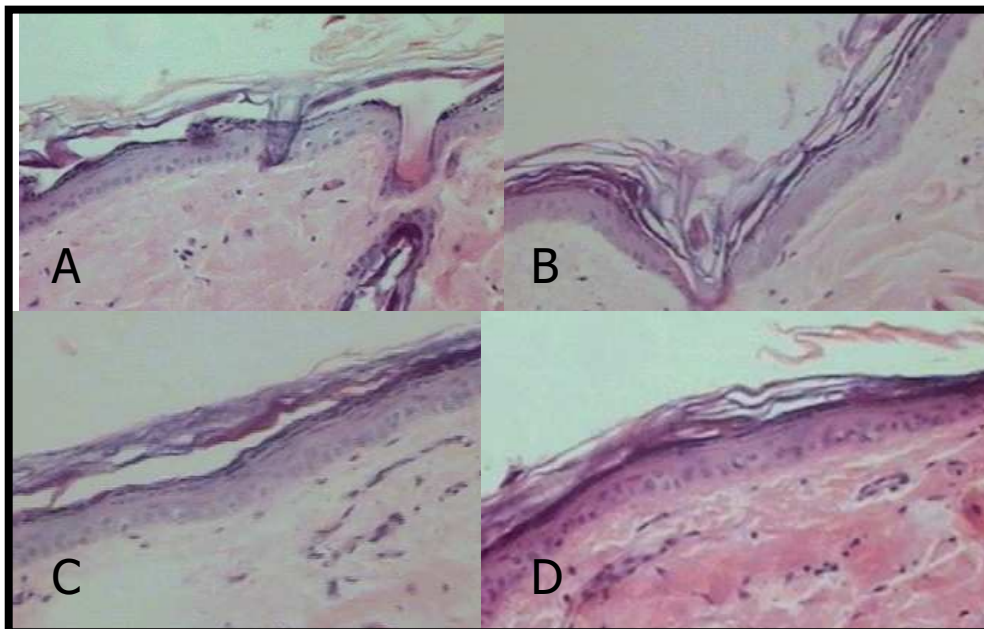


Figura 7: Duas horas após a exposição ao sol: controle de 5 minutos (A), controle de 8 minutos (C), limão de 5 minutos (B) e limão de 8 minutos (D): sem alterações significativas.

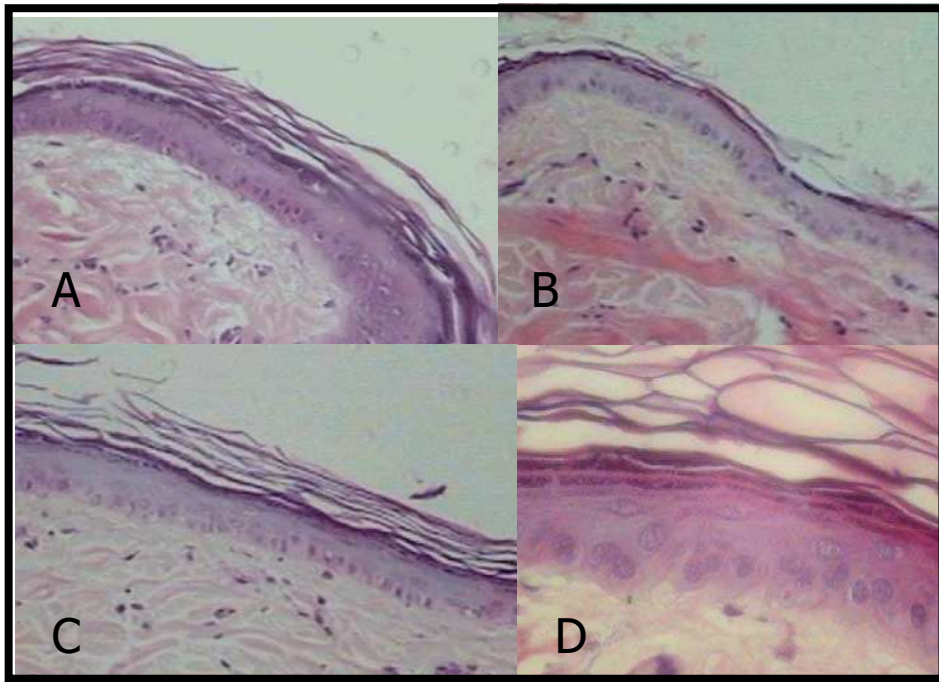


Figura 8: Três horas após a exposição ao sol: controle de 5 minutos (A), controle de 8 minutos (C), limão de 5 minutos (B) e limão de 8 minutos (D): sem alterações significativas.

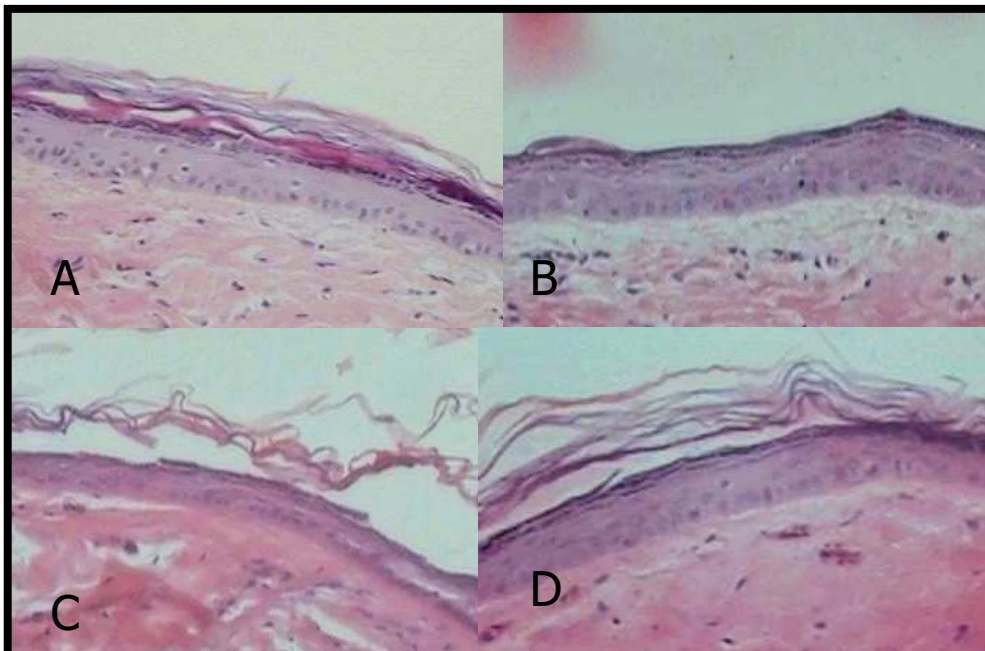


Figura 9: Quatro horas após a exposição ao sol: controle de 5 minutos (A), controle de 8 minutos (C), limão de 5 minutos (B) e limão de 8 minutos (D) : sem alterações significativas.

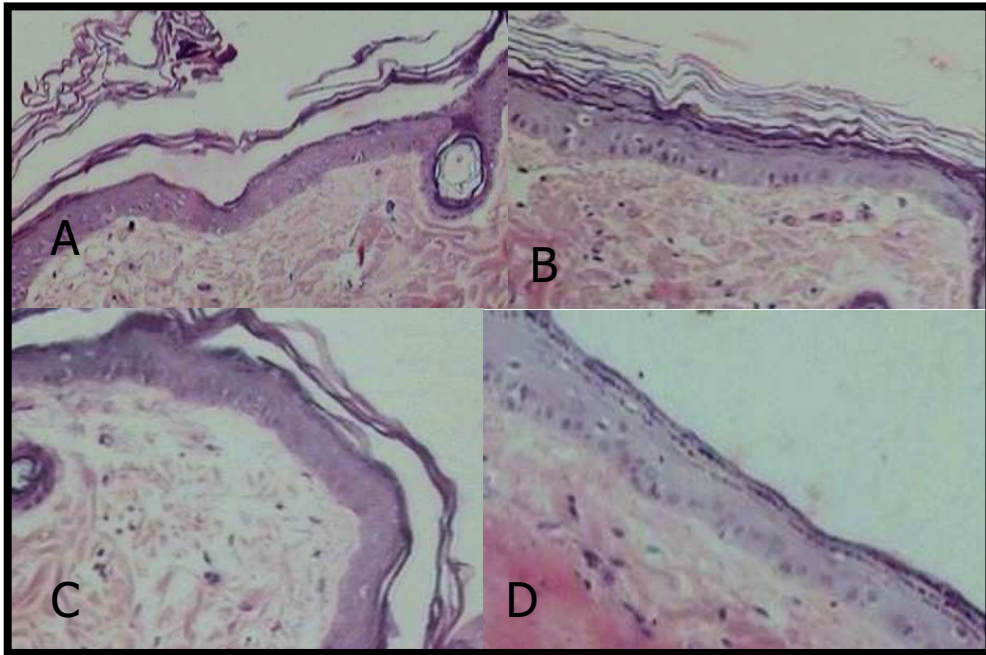


Figura 10: Cinco horas após a exposição ao sol: controle de 5 minutos (A), controle de 8 minutos (C), limão de 5 minutos (B) e limão de 8 minutos (D): sem alterações significativas.

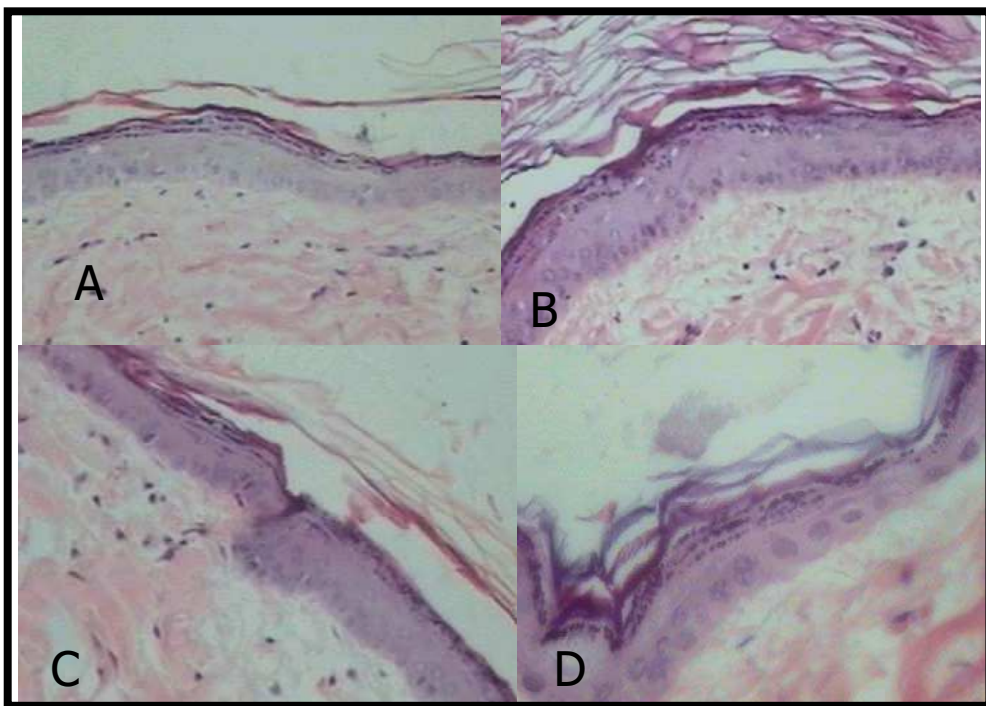


Figura 11: Seis horas após a exposição ao sol: controle de 5 minutos (A), controle de 8 minutos (C), limão de 5 minutos (B) e limão de 8 minutos (D): sem alterações significativas.

## **Resultados em 24 Horas**

A inspeção clínica, realizada 24 horas após a realização do experimento, não evidenciou lesões na pele dos ratos.

Nas biópsias dos controles com exposição solar e sem limão (Figura 12 e 13), observou-se somente necrose isolada e ocasional de queratinócitos em 3 ratos expostos ao sol, somente por período de 8 minutos (Figura 14).

As biópsias da área com limão demonstraram necrose de queratinócitos em três dos quatro ratos em T5 e nos quatro ratos em T8, tendo sido encontrada necrose de queratinócitos agrupada (figura 15). A vacuolização citoplasmática dos queratinócitos foi observada em todos os ratos, sendo confluyente (figura 16) ou isolada (figura 17) e sem relação com o tempo de exposição solar. A espongiose foi demonstrada em todos os casos (figura 18).

Com T8, a espongiose, vacuolização citoplasmática e necrose acometem grupos de queratinócitos confluentes (figura 19). A derme mostrou congestão em 3 dos 4 ratos aspergidos com limão em T5 e nos 4 ratos em T8.

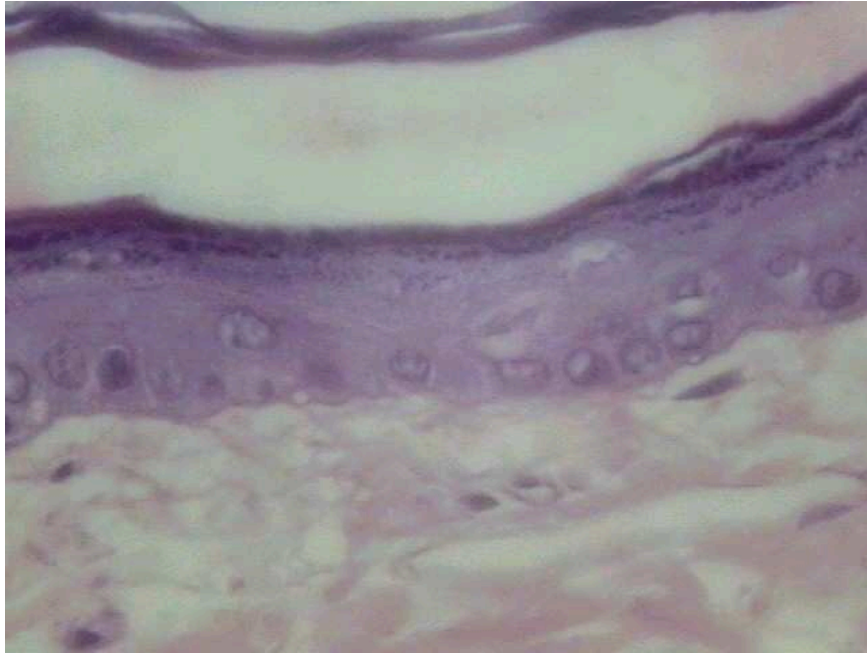


Figura 12: controle com 5 minutos de exposição ao sol, após 24 horas: epiderme sem alterações significativas. HE 400X

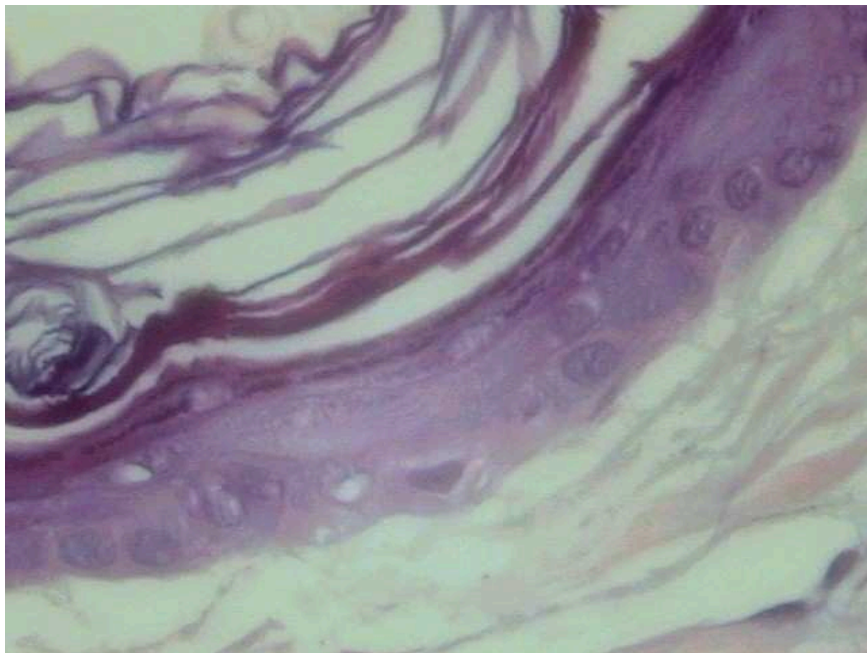


Figura 13: controle com 8 minutos de exposição ao sol, após 24 horas: epiderme sem alterações significativas. HE 400X



Figura 14: controle com 8 minutos de exposição ao sol, após 24 horas: necrose isolada, provocada pela luz solar (seta). HE 400X



Figura 15: pele com limão exposta ao sol por 5 minutos, após 24h: necrose confluyente de queratinócitos (seta). HE 400X



Figura 16: pele com limão, exposta ao sol por 5 minutos, após 24h: necrose de queratinócitos, espongiose e vacuolização confluyente (setas). HE 400X

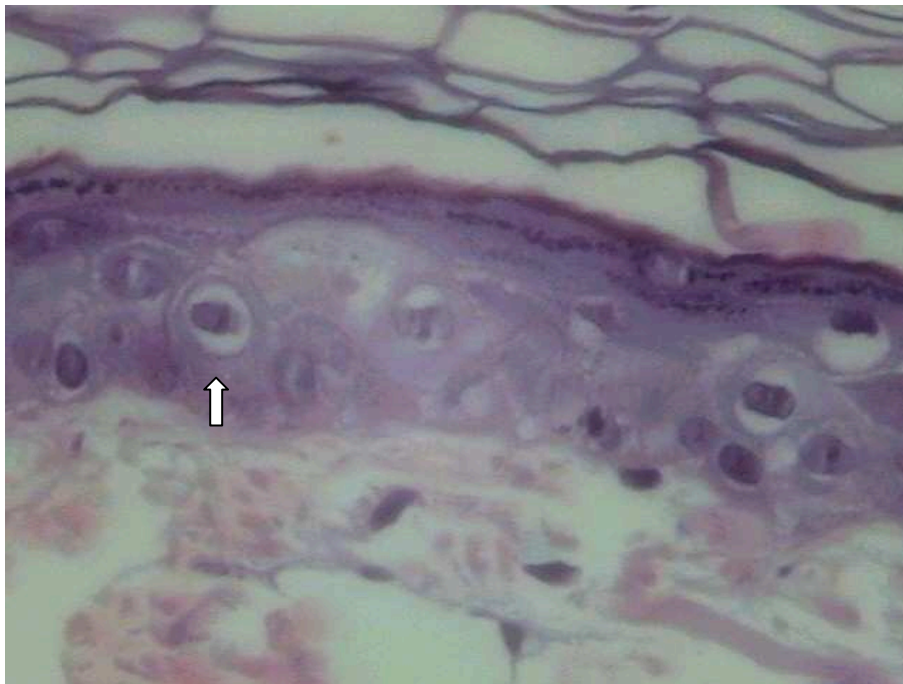


Figura 17: pele com limão, exposta ao sol por 5 minutos, após 24h: vacuolização isolada (seta) de queratinócito, espongiose e necrose. HE 400X

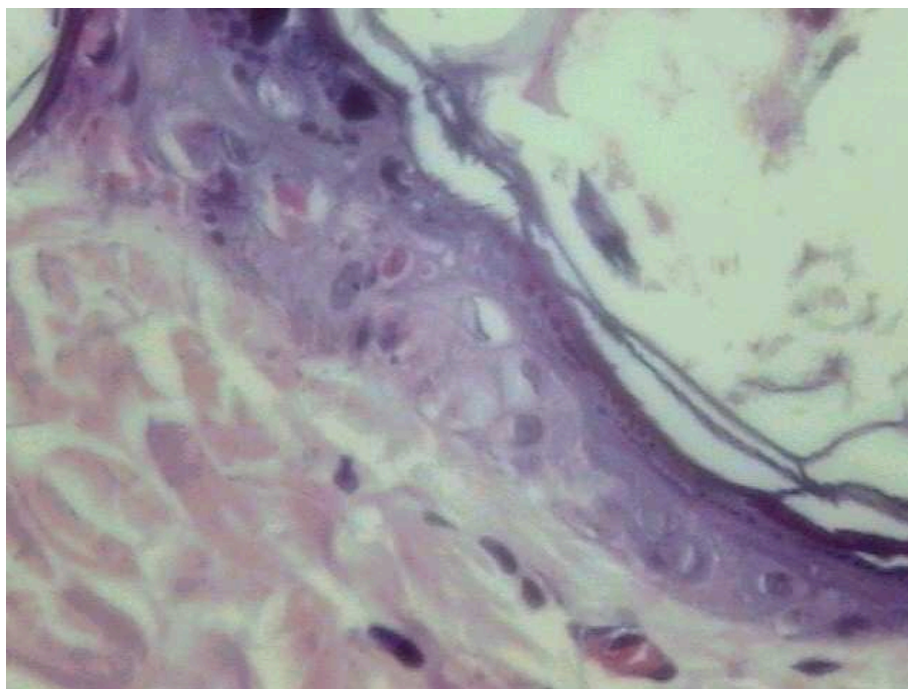


Figura 18: pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 24h: necrose de queratinócitos, espongiose e vacuolização isolada.

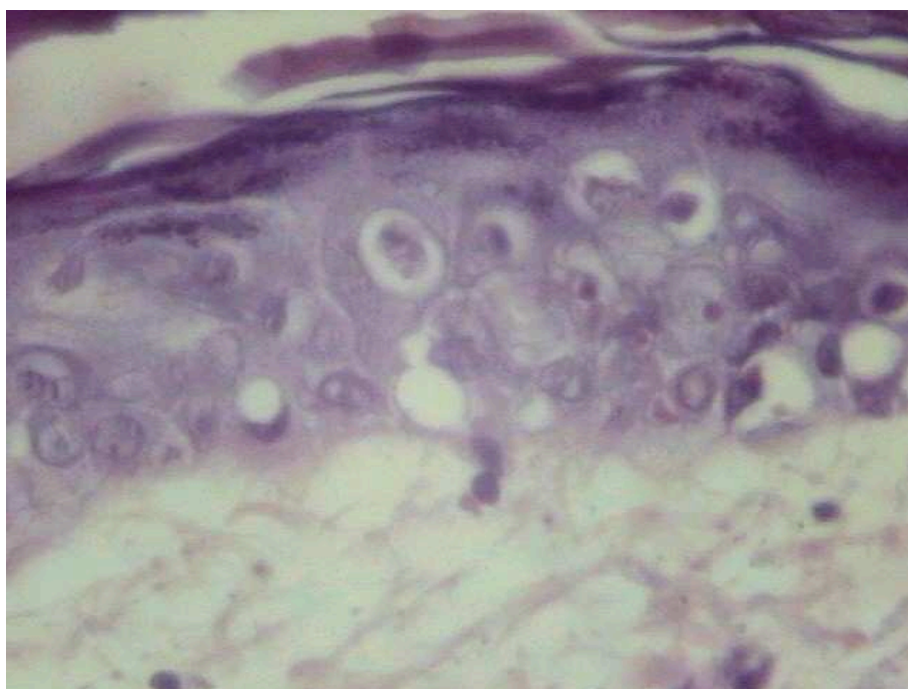


Figura 19: pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 24h: necrose de queratinócitos, espongiose e vacuolização confluyente.

## **Resultados em 48 horas**

Enfatiza-se que clinicamente evidenciou-se eritema nas áreas aspergidas com limão, tanto em T5, quanto em T8.

Por sua vez nos controles com exposição somente ao sol, houve presença ocasional de espongiose e vacuolização (Figura 20 e 21). Necrose e clivagens comprometeram todos os ratos aspergidos com limão, tanto em T5, como em T8.

No pequeno aumento (100X) são evidenciadas clivagens sub ou intraepidérmicas (Figuras 22 e 23). A avaliação histológica em maior aumento (400X) mostrou em alguns cortes vacuolização intensa com clivagem incipiente (Figura 24). Em outras áreas, houve clivagem subepitelial total com necrose de queratinócitos (Figura 25 e 26) e também necrose ocasional. Da mesma forma que nos cortes histológicos de 24 horas, houve áreas com espongiose importante e vacuolização confluyente (Figura 27). Além disso a exocitose foi observada pela primeira vez em 48 horas (figura 28).

Avaliando-se a derme, em pequeno aumento (100X), foram observadas congestão, micro-hemorragia e células inflamatórias isoladas em 3 dos quatro ratos em T5 e nos quatro ratos em T8 (Figura 29). Além do mais, a exocitose foi evidenciada em todos os ratos aspergidos com limão, nos dois tempos de exposição. A nível epitelial encontramos microabcesso em apenas um rato com limão em T8 (Figura 30).

Em T8 ficou bem evidente a vacuolização e espongiose intensas (Figura 31) que progridem para a formação de bolhas intraepidérmicas com necrose de queratinócitos (Figura 32).

Nas figuras 33 e 34 ficou demonstrado a evolução da exocitose intensa para microabceso, caracterizada por grupamentos de neutrófilos mesclados com células necróticas.

Neste mesmo intervalo de 48 horas após a indução, em pequeno aumento (100X), detectou-se a presença de alteração do epitélio folicular (Figuras 35 e 36). No detalhe (400X) vêem-se vacuolização e necrose dos queratinócitos foliculares (Figuras 37 e 38).

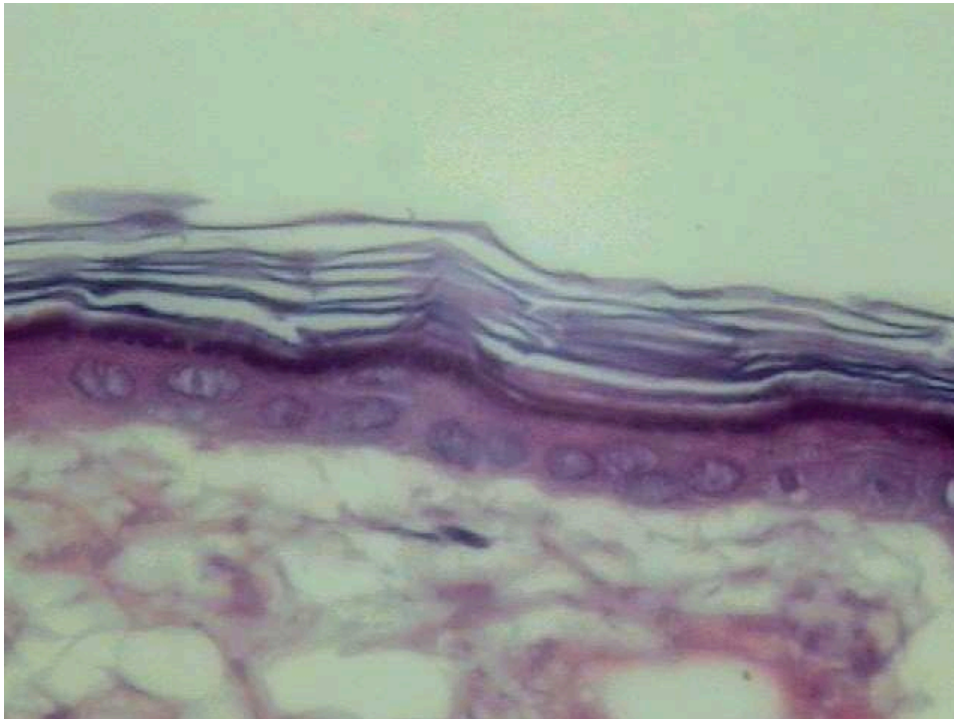


Figura 20: controle com 5 minutos de exposição ao sol, após 48 horas: epiderme sem alterações significativas. HE 400X



Figura 21: controle com 8 minutos de exposição ao sol, após 48 horas: epiderme sem alterações significativas. HE 400X

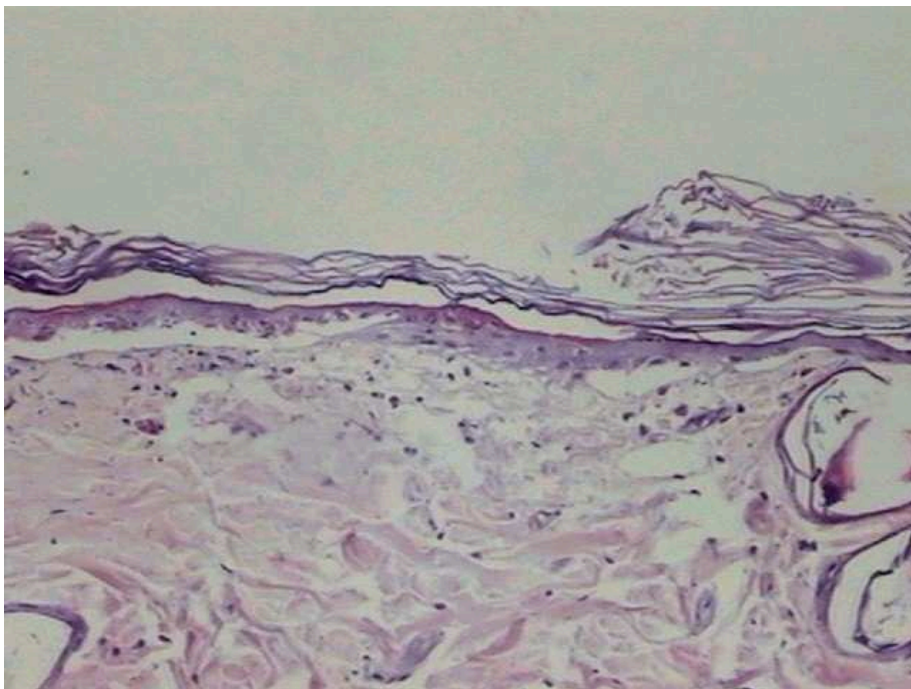


Figura 22: pele com limão, exposta ao sol por 5 minutos, após 48h: bolhas sub-epidérmicas. HE 100X



Figura 23: pele com limão, exposta ao sol por 5 minutos, após 48h: extensas vesículas subepidérmica e intraepidérmica. HE 100X

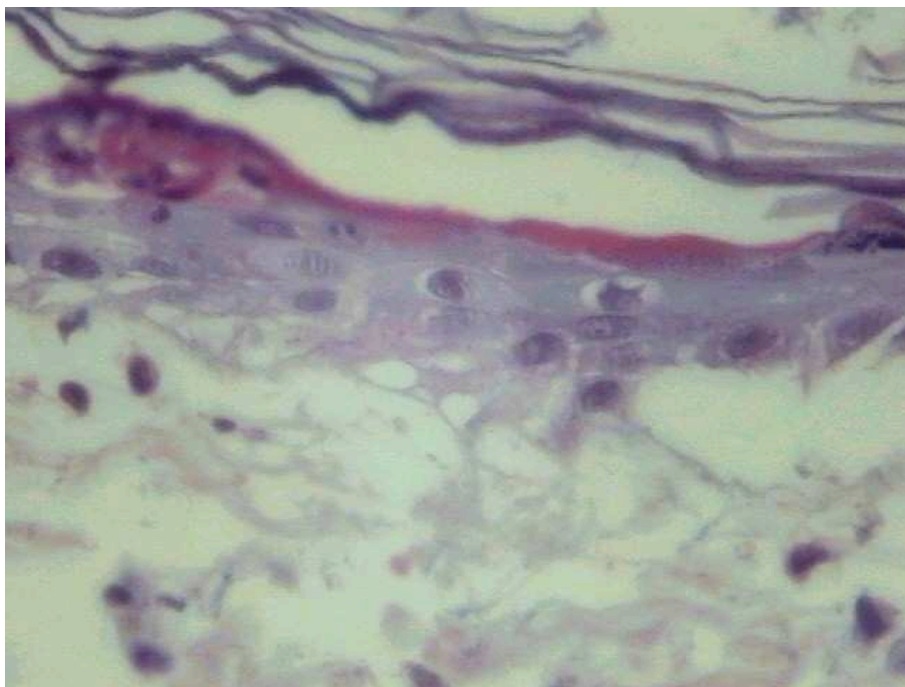


Figura 24: pele com limão, exposta ao sol por 5 minutos, após 48h: epiderme exibindo vesícula subepidérmica, vacuolização de queratinócitos e necrose. HE 400X

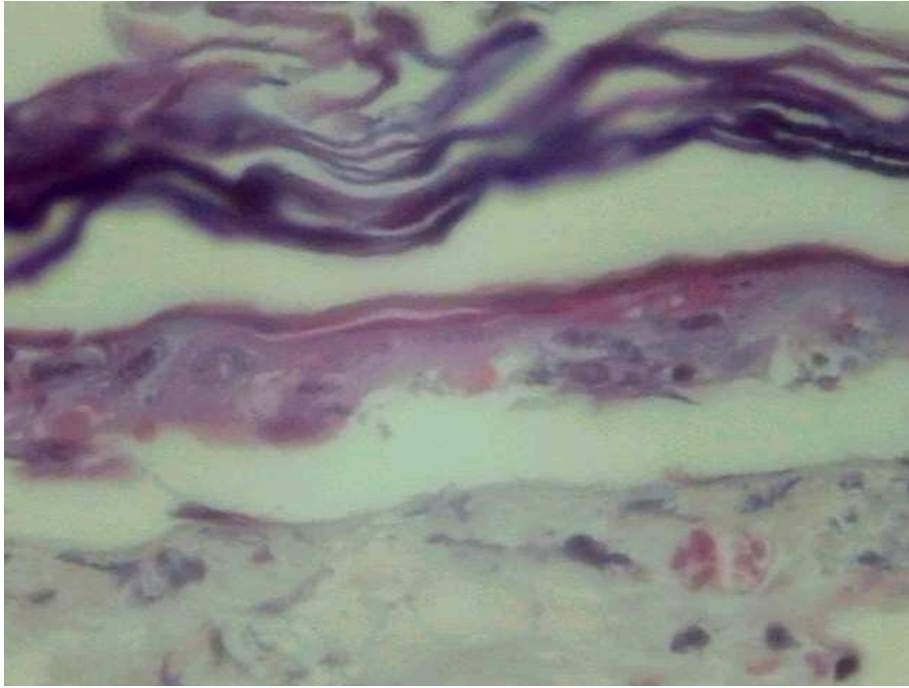


Figura 25: pele com limão, exposta ao sol por 5 minutos, após 48h: vesícula sub-epidérmica e necrose. HE 400X

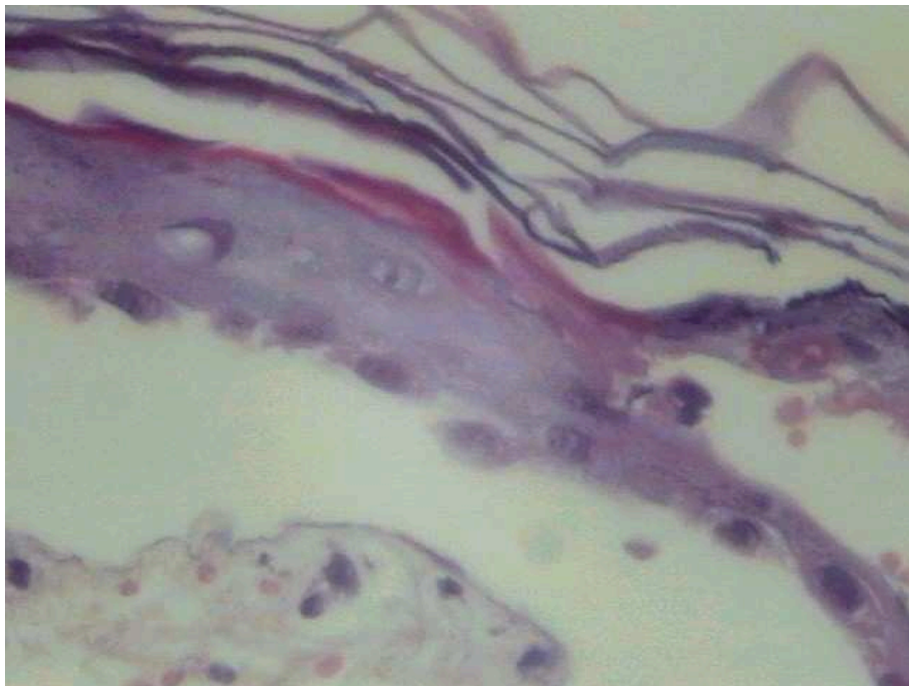


Figura 26: pele com limão, exposta ao sol por 5 minutos, após 48h: vesículas sub e intraepidérmicas, necrose. HE 400X

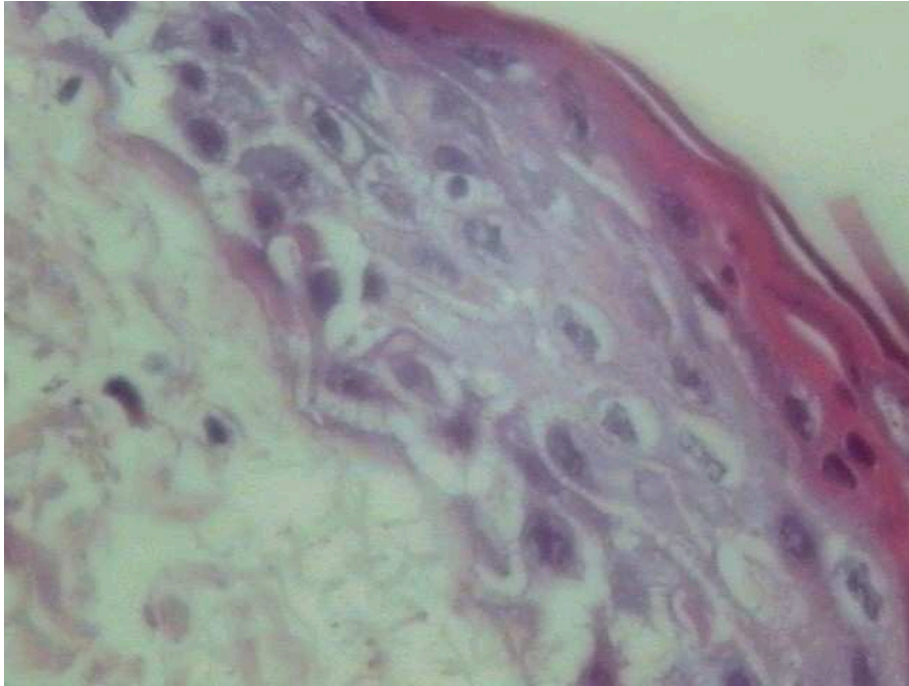


Figura 27: pele com limão, exposta ao sol por 5 minutos, após 48h: vacuolização citoplasmática confluyente e espongiöse. HE 400X

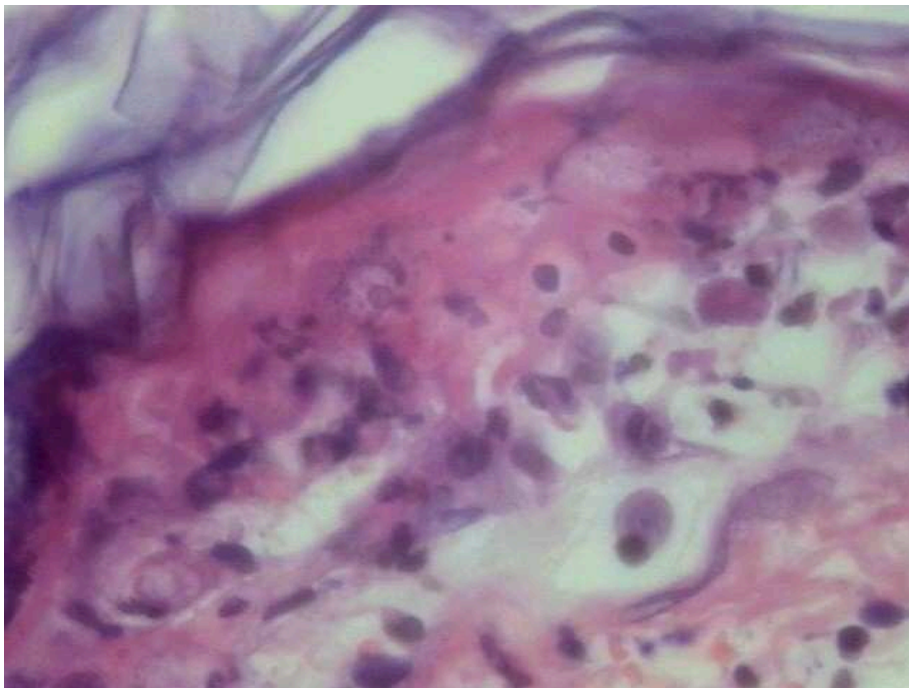


Figura 28: pele com limão, exposta ao sol por 5 minutos, após 48h: vacuolização citoplasmática confluyente, necrose e exocitose. HE 400X



Figura 29: pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 48h: infiltrado inflamatório dérmico, vacuolização e exocitose. HE 100X

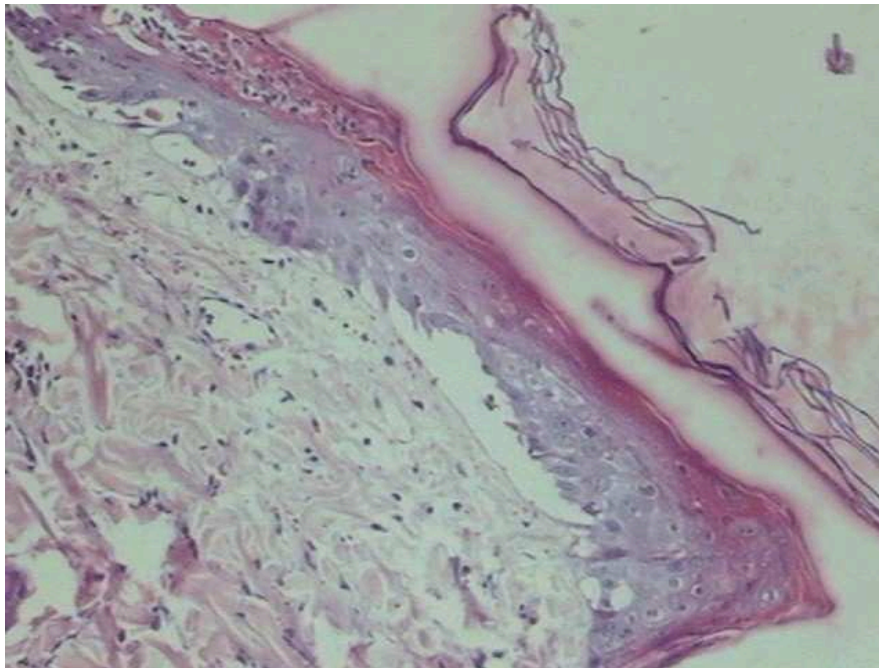


Figura 30: pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 48h: vesícula sub-epidérmicas, microabcesso em camada córnea, espongiose, congestão. HE 100X

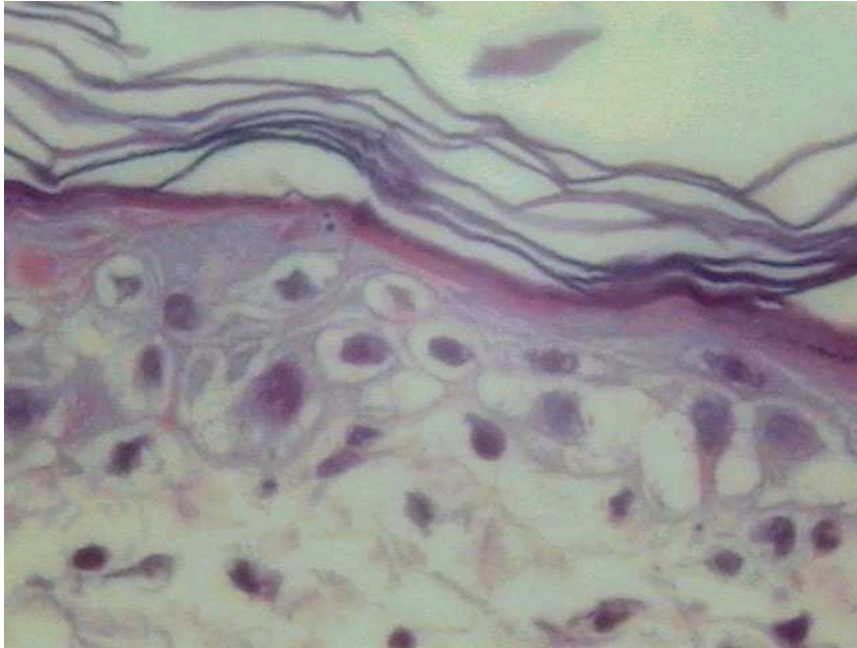


Figura 31: pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 48h: vacuolização citoplasmática confluyente . HE 400X

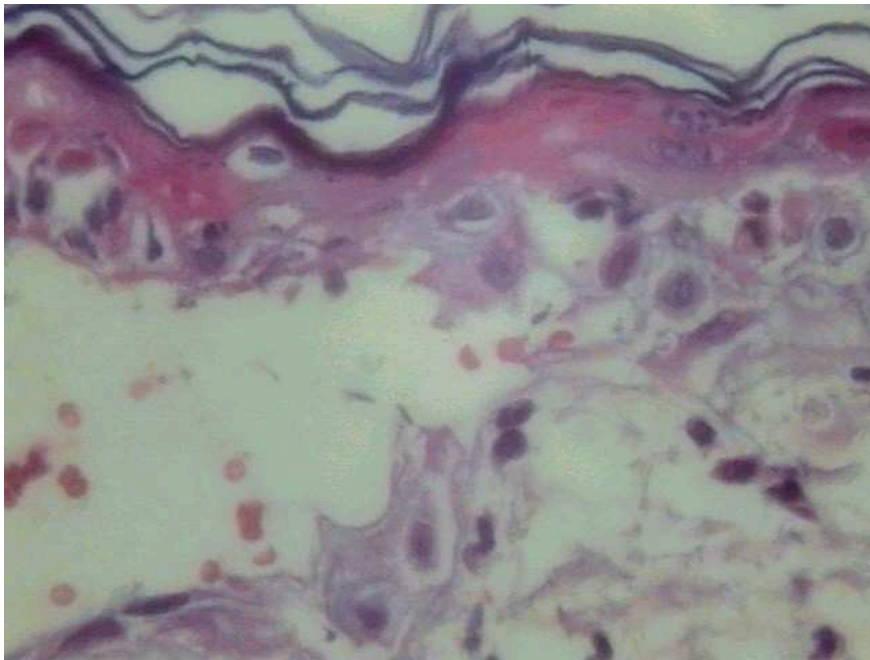


Figura 32: pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 48h: vesícula intra-epidérmica, necrose de queratinócitos, vacuolização citoplasmática. HE 400X

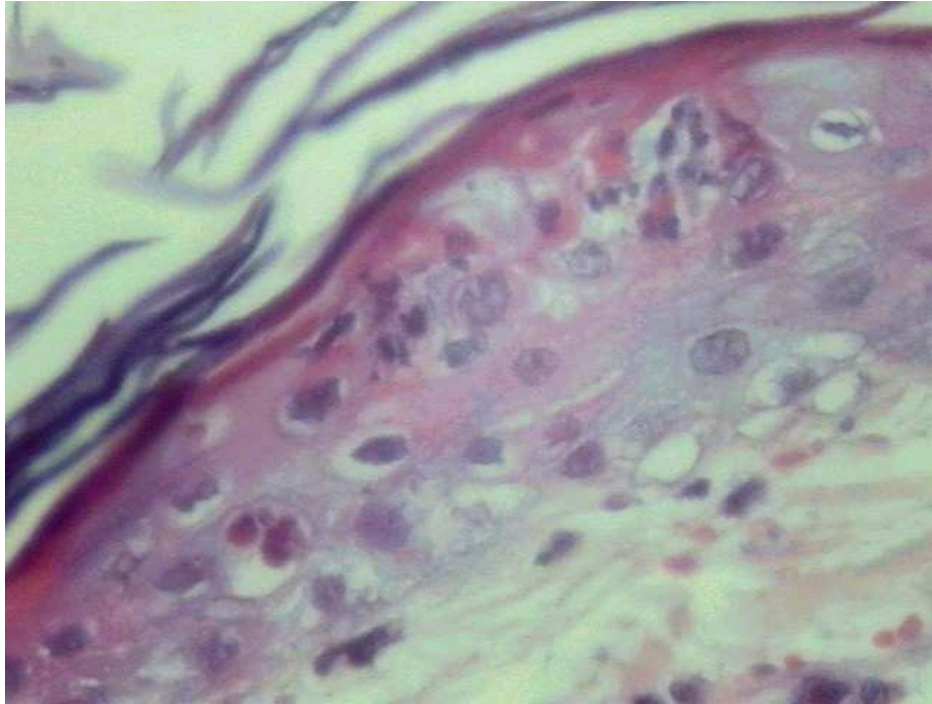


Figura 33: pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 48h: espongiose, vacuolização citoplasmática isolada, exocitose. HE 400X

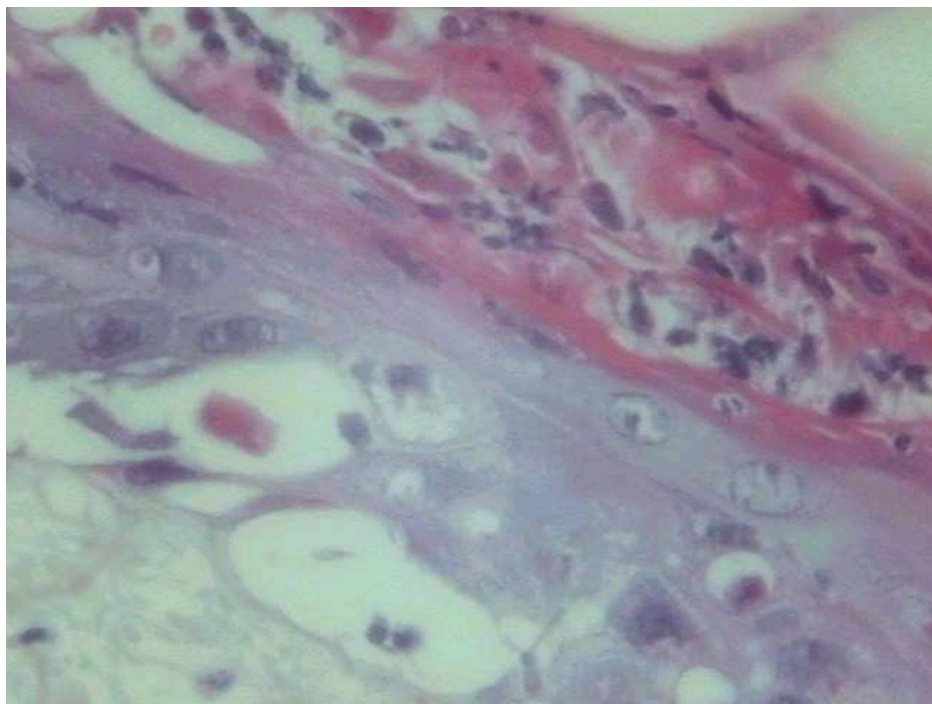


Figura 34: pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 48h: necrose de queratinócitos, vacuolização citoplasmática confluyente e microabcesso em camada córnea. HE 400X

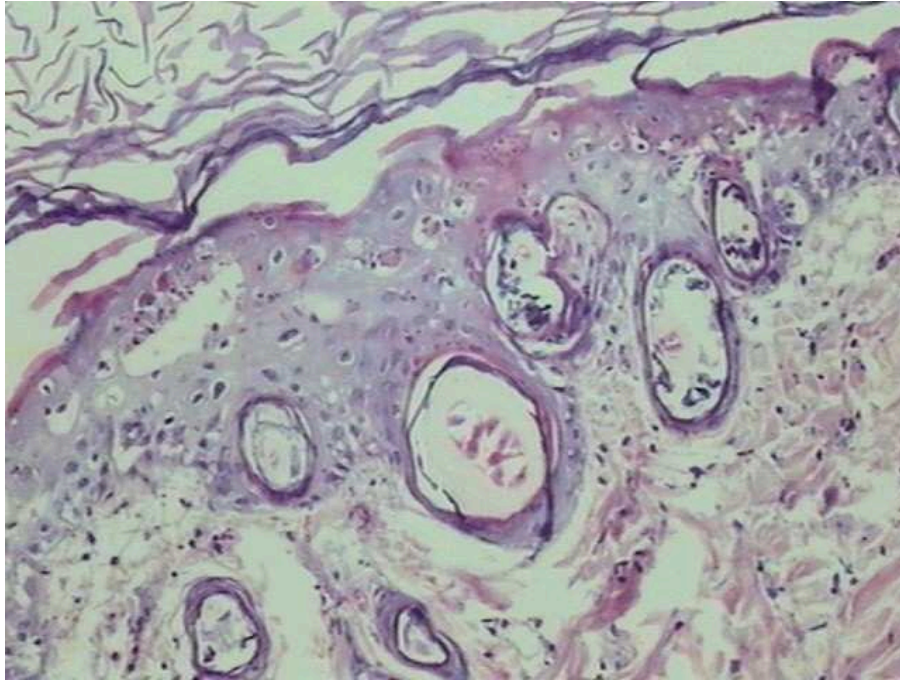


Figura 35: pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 48h: exocitose, espongiose, vacuolização citoplasmática, vesícula intra-epidérmica e comprometimento folicular. HE 100X

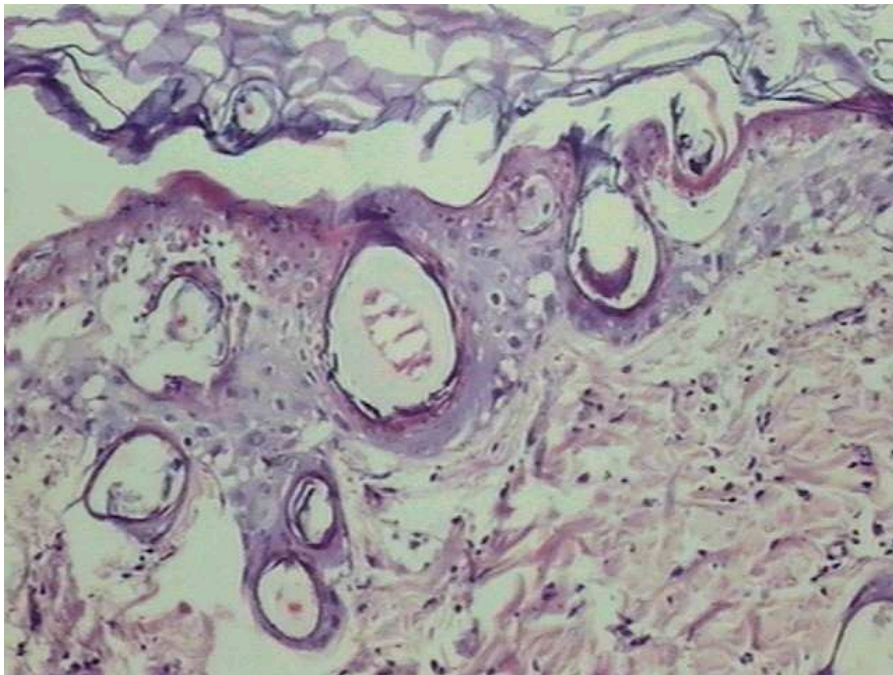


Figura 36: pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 48h: exocitose, espongiose, vacuolização citoplasmática, vesícula intra-epidérmica e comprometimento folicular. Vê-se infiltrado inflamatório dérmico incipiente. HE 100X



Figura 37: pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 48h: folículo piloso com vacuolização e necrose . HE 400X



Figura 38: pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 48h: folículo piloso com vacuolização. HE 400X (48 h L8 folículo A)

## **Resultados em 72 horas**

Salienta-se que na avaliação clínica, permanecia o eritema.

Por sua vez os controles com exposição somente ao sol não demonstraram alterações histológicas relevantes (Figura 39 e 40), tendo sido encontradas isoladas atipias dos queratinócitos em 1 rato.

Em T5, a espongiose e vacuolização continuaram presentes nos cortes histológicos avaliados (Figura 41), associadas, agora, às células atípicas, evidenciadas por contornos celulares e nucleares irregulares, bem como macronucleolose (Figura 42).

As alterações de vacuolização e espongiose foram evidenciadas em todos os ratos, enquanto que a necrose foi vista em dois em T5, e em dois em T8. Os microabcessos foram evidenciados em dois ratos: um em T5 (Figura 42) e outro, em T8.

Ainda, no pequeno aumento (100X), identificou-se a vacuolização dos queratinócitos em T8 (figura 43). No detalhe (400X), verificam-se exocitose, espongiose e vacuolização que acomete menor número de queratinócitos em comparação com 48 horas, além de micro-hemorragia dérmica (figura 44). Percebe-se, ainda, a presença de atipias celulares em queratinócitos sem evidência de necrose (figura 45).

Enfatiza-se que os achados dérmicos de congestão, micro-hemorragia e infiltrado leucocitário já começam a demonstrar regressão, ocorrendo apenas ocasionalmente, sem relação com o tempo de exposição ao sol.

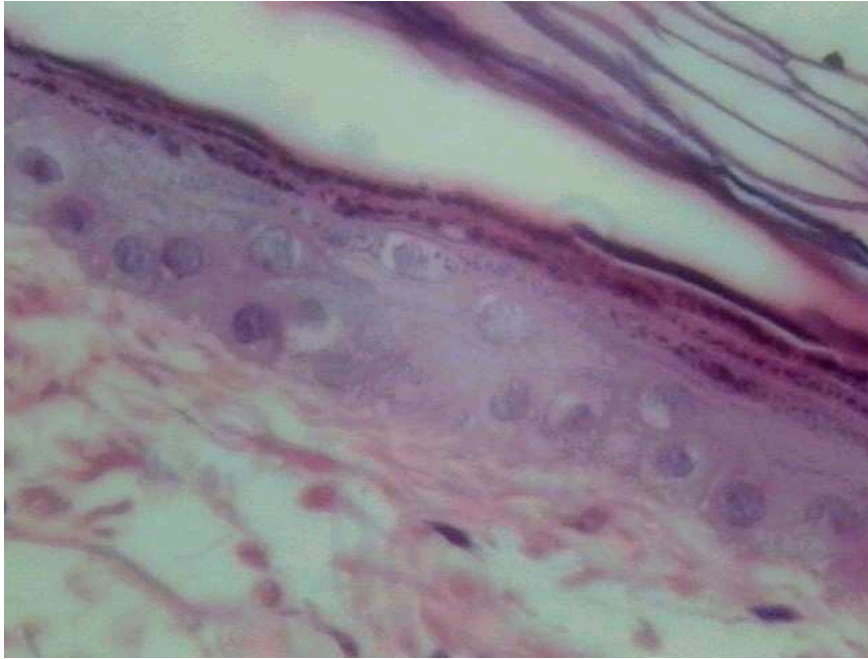


Figura 39: controle com 5 minutos de exposição ao sol, após 72 horas: epiderme sem alterações significativas. HE 400X

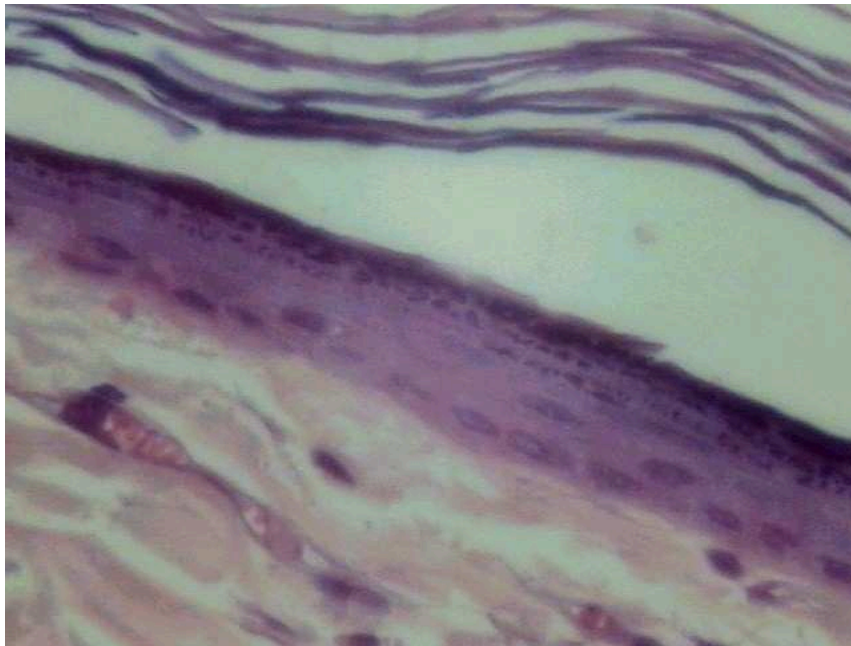


Figura 40: controle com 8 minutos de exposição ao sol, após 72 horas: epiderme sem alterações significativas. HE 400X

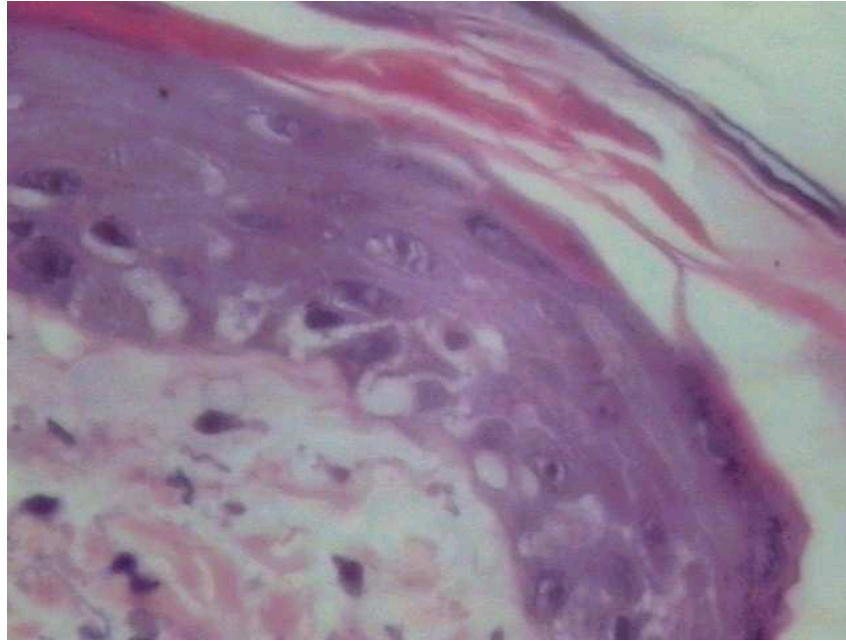


Figura 41: Pele com limão, exposta ao sol por 5 minutos, após 72 horas: vacuolização citoplasmática agrupada, espongiose e atipias celulares. HE 400X

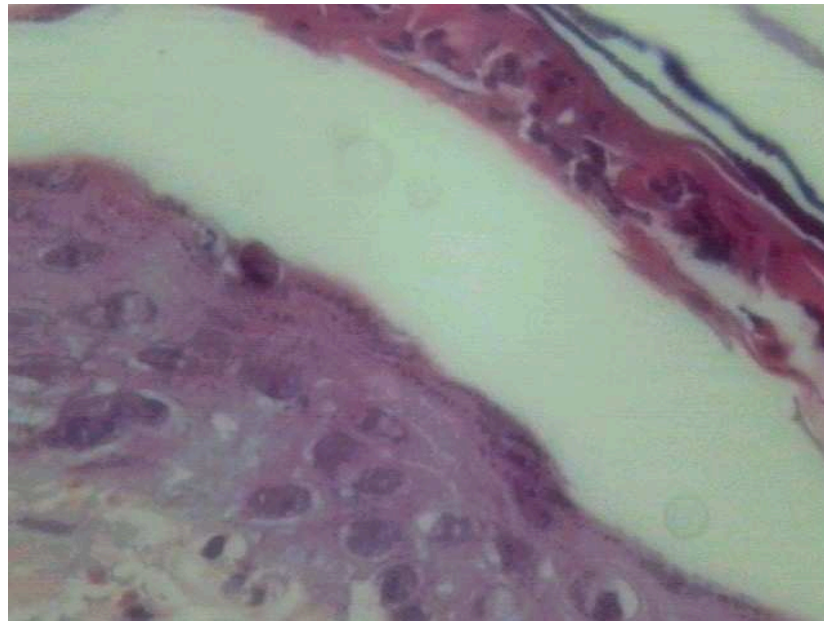


Figura 42: Pele com limão, exposta ao sol por 5 minutos, após 72 horas: vacuolização citoplasmática, espongiose, atipias nucleares e microabcesso em camada córnea. HE 400X

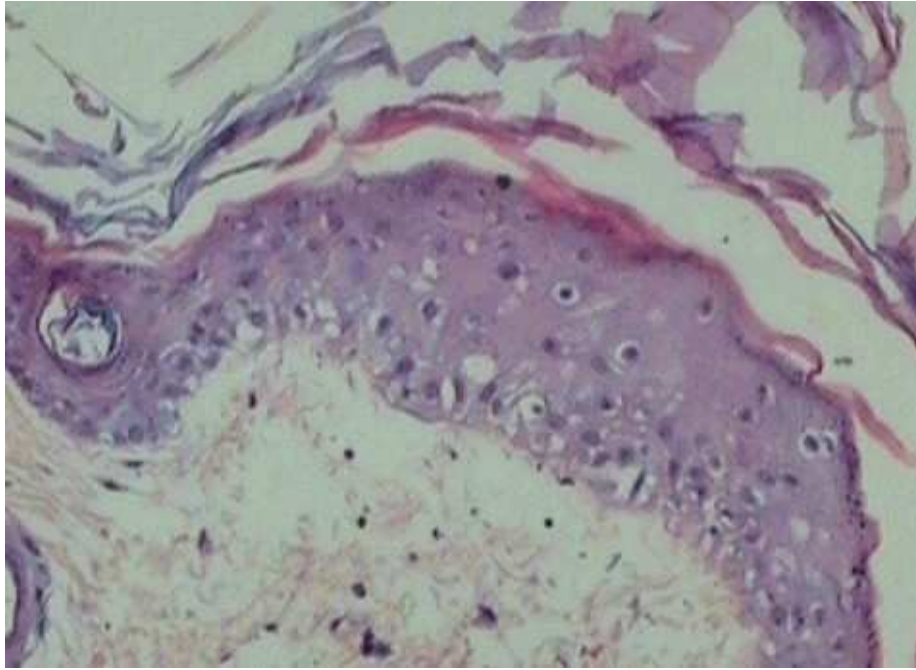


Figura 43: Pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 72 horas: vacuolização citoplasmática. HE 100X

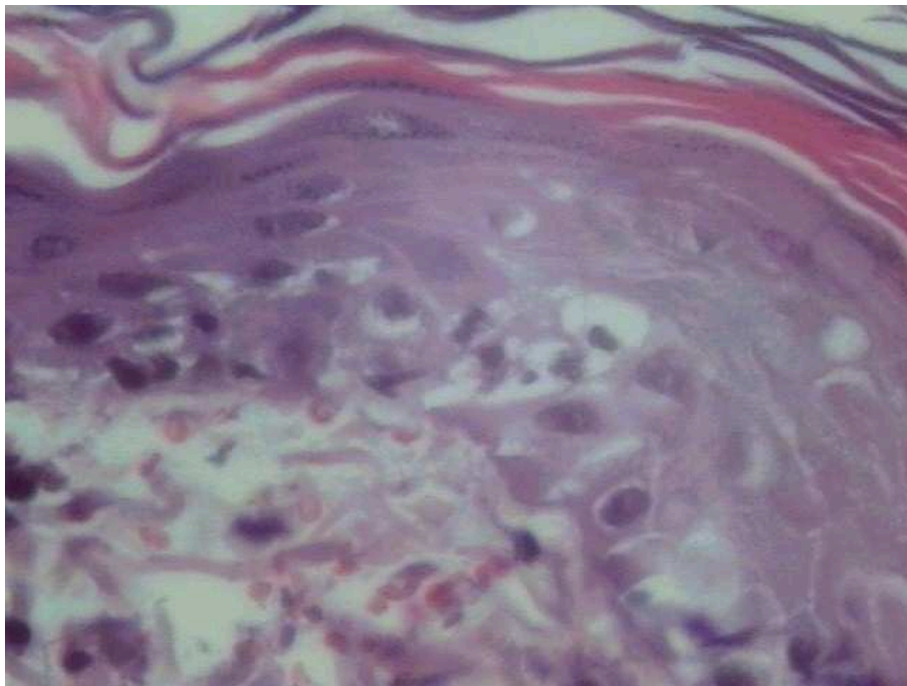


Figura 44: Pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 72 horas: vacuolização citoplasmática, eongiose e exocitose representada por escassos leucócitos residuais em epiderme. A derme exhibe microhemorragia. HE 400X

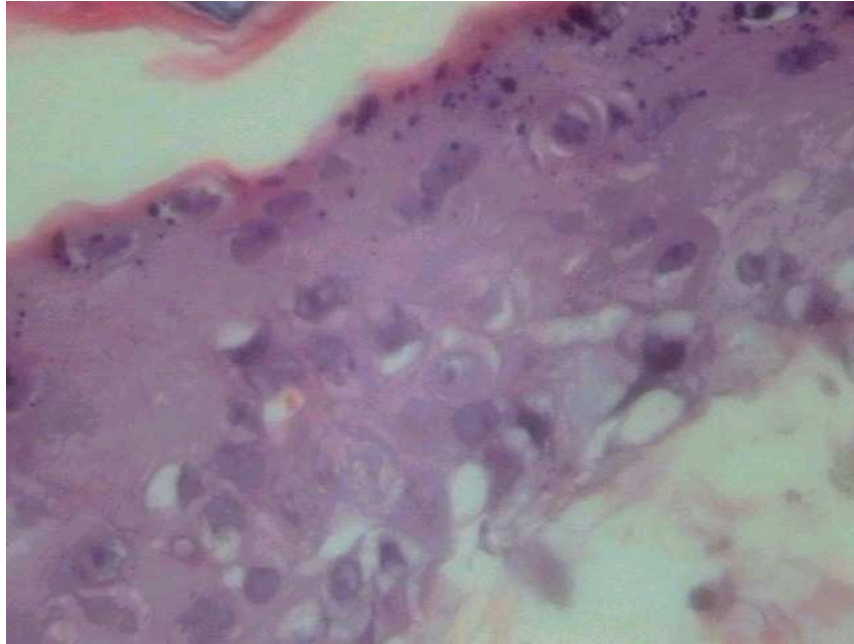


Figura 45: Pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 72 horas: espongiose, vacuolização citoplasmática e atipias nucleares.  
HE 400X

### **Controles**

Um segundo tipo de controle foi realizado somente com o limão e sem exposição ao sol, sendo, os ratos, biopsiados com intervalo de 1 hora, 24 e 48 horas. Os achados histológicos não exibiram alterações significativas (figuras 46, 47 e 48).

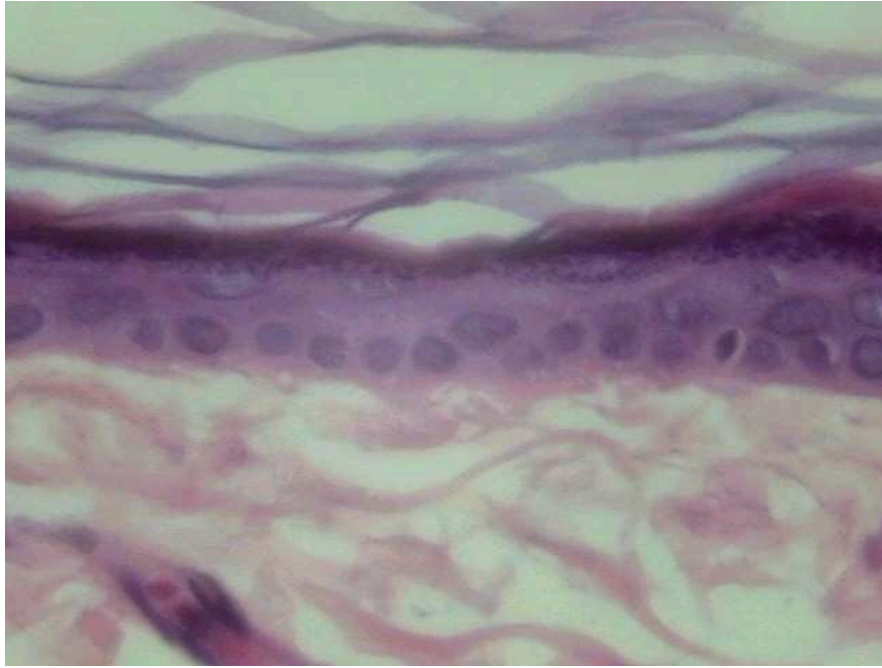


Figura 46: Controle de pele com limão, após 1 hora: epiderme e derme sem alterações histológicas significativas. HE 400X

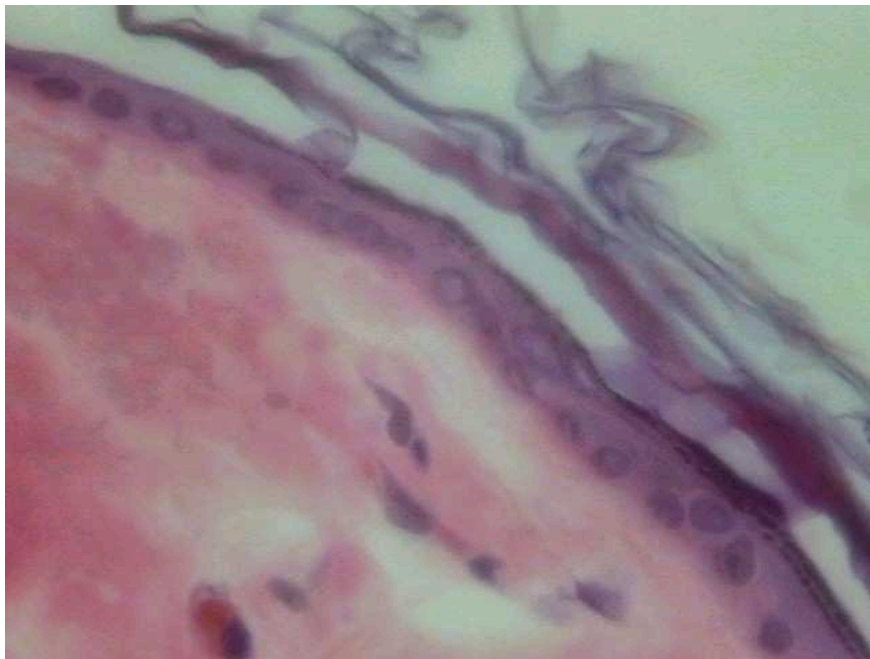


Figura 47: Controle de pele com limão, após 24 horas: epiderme e derme sem alterações histológicas significativas. HE 400X

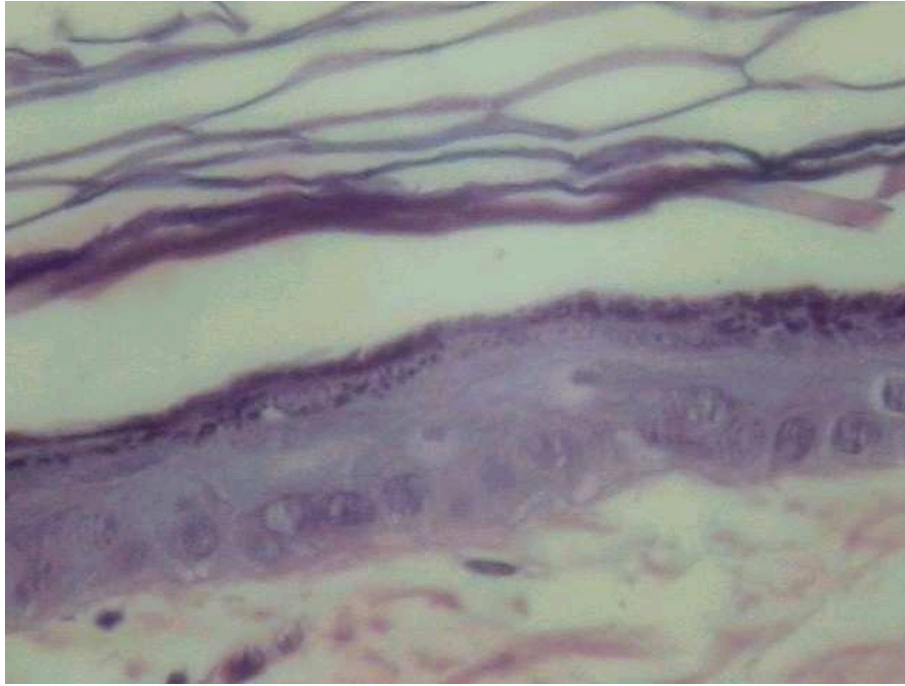


Figura 48: Controle de pele com limão, após 48 horas: epiderme e derme sem alterações histológicas significativas. HE 400X

## **Microscopia Eletrônica de Transmissão**

A avaliação da microscopia eletrônica de transmissão, realizada em dois ratos aspergidos com limão e expostos à luz solar por 8 minutos, já demonstrava lesão tão precocemente quanto por 2 horas.

Com pequeno aumento, observou-se vacuolização do citoplasma (Figura 49). Com aumentos maiores, constataram-se ruptura da membrana citoplasmática e vacuolização (Figura 50).

O exame detalhado dos desmossomas mostrou diminuição da ancoragem dos filamentos de queratina e ruptura dos mesmos (Figura 51). Além disso, o espaço entre as placas desmossômicas aumentou (Figura 52).

Examinando-se o queratinócito basal, verificou-se vacuolização citoplasmática periférica e membrana basal íntegra (Figura 53). Em maior aumento evidenciaram-se prováveis rupturas na ancoragem dos filamentos de queratina na placa hemidesmossômica (Figura 54).

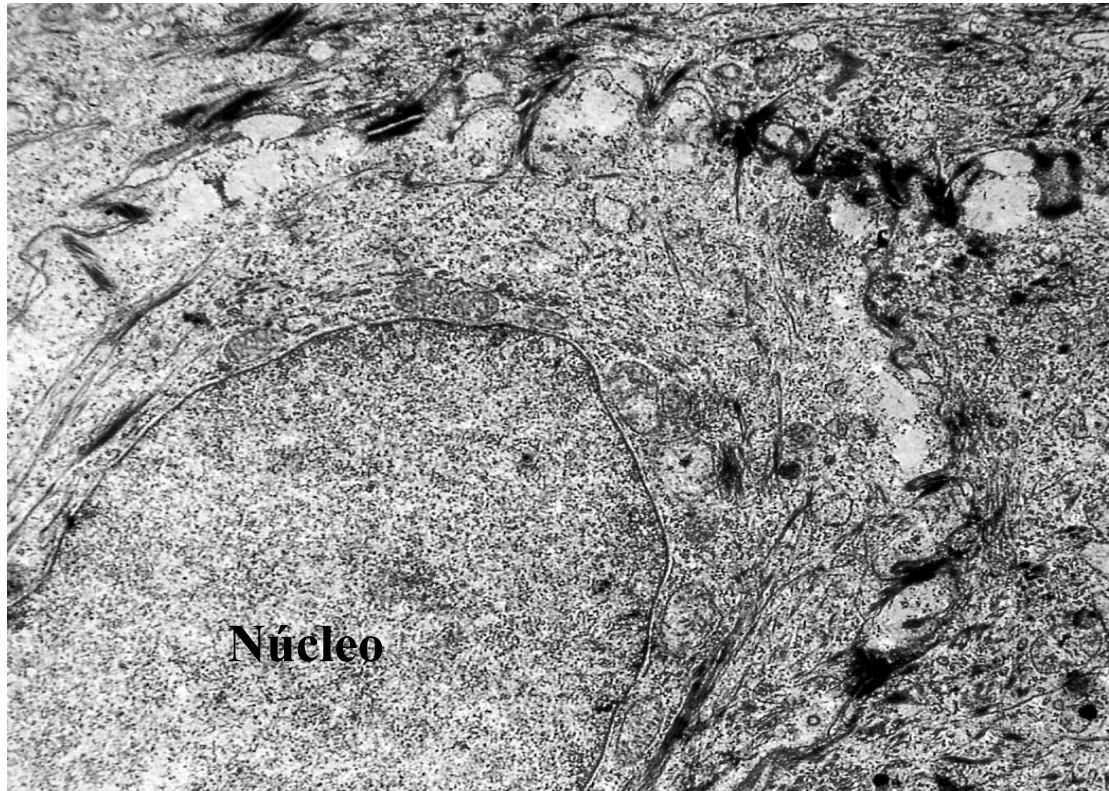


Figura 49: Queratinócito com vacuolização  
MET 3.000

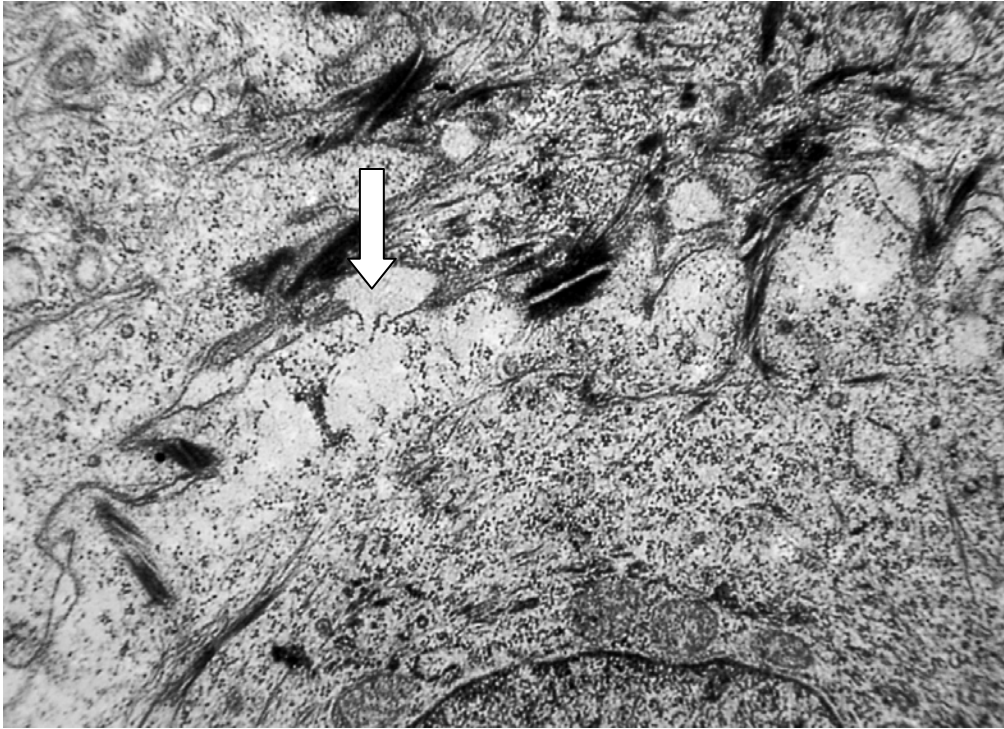


Figura 50: Detalhe da junção intercelular epidérmica com desmossomas bem visualizados, membrana citoplasmática com perda da integridade (seta) e vacuolização citoplasmática. MET 14.000X



Figura 51: Detalhe do desmossoma, mostrando diminuição dos filamentos de queratina na placa desmossômica superior (cabeças de seta) e provável fratura da queratina na placa inferior. MET 20.000X

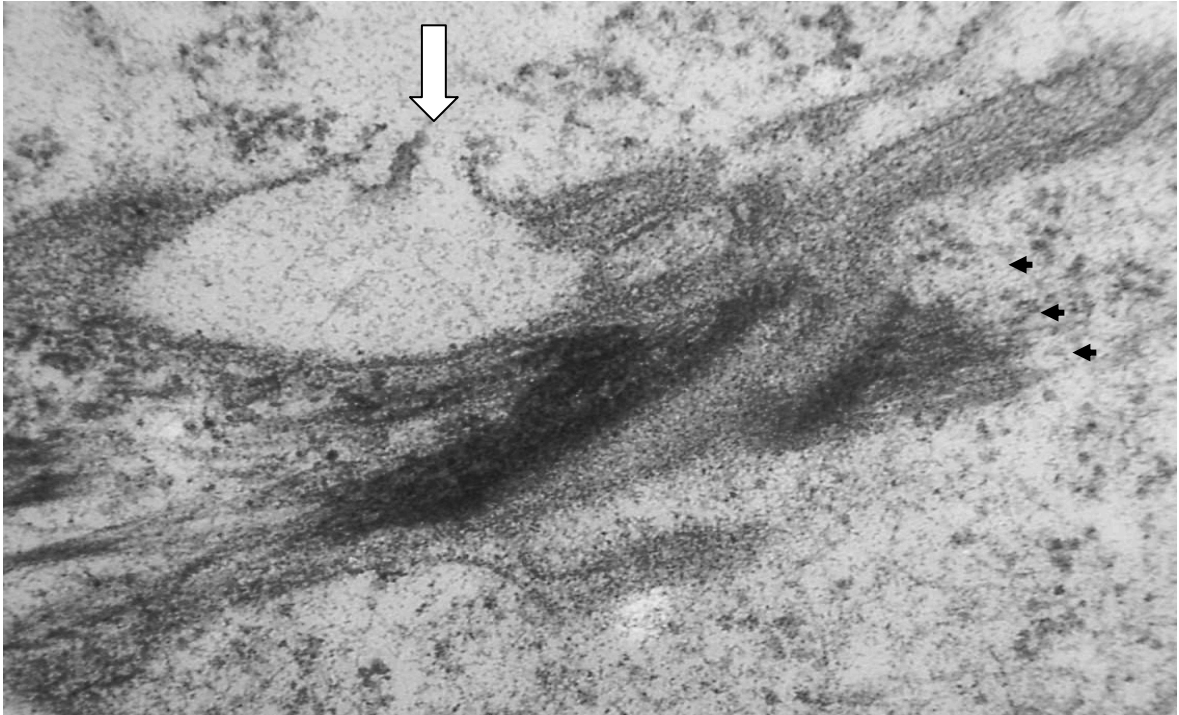


Figura 52: Detalhe da ruptura da membrana celular (seta) e provável diminuição dos filamentos de queratina (cabeça de seta). Vê-se aumento do espaço entre as placas desmossômicas. MET 20.000X

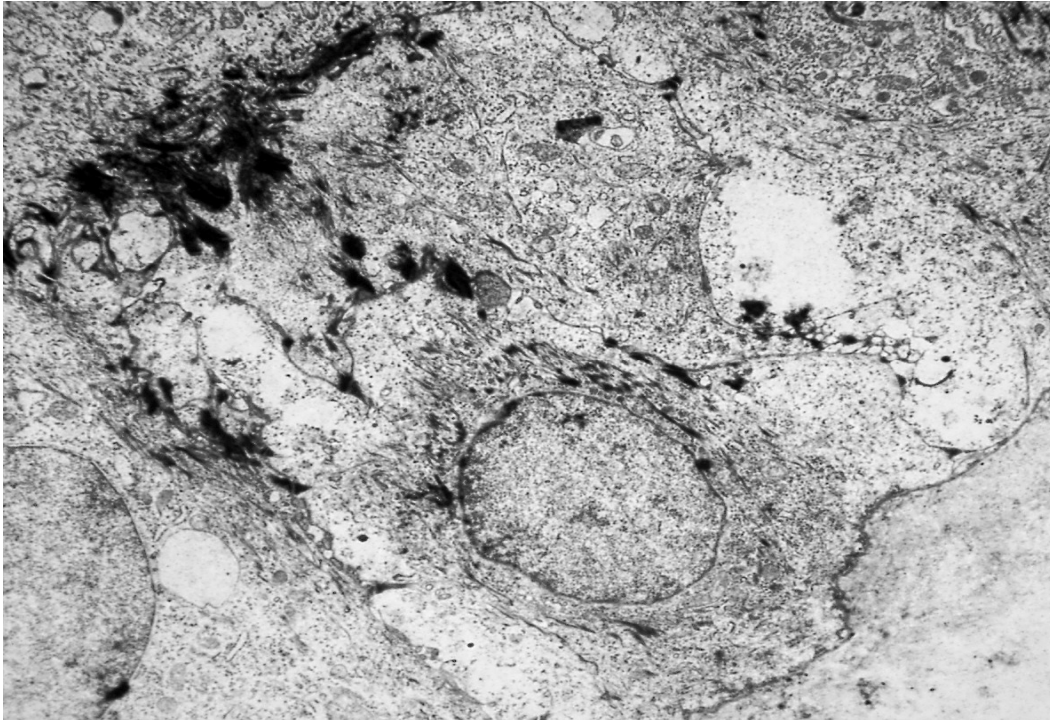


Figura 53: queratinócito basal com vacuolização citoplasmática periférica. MET 3.000X

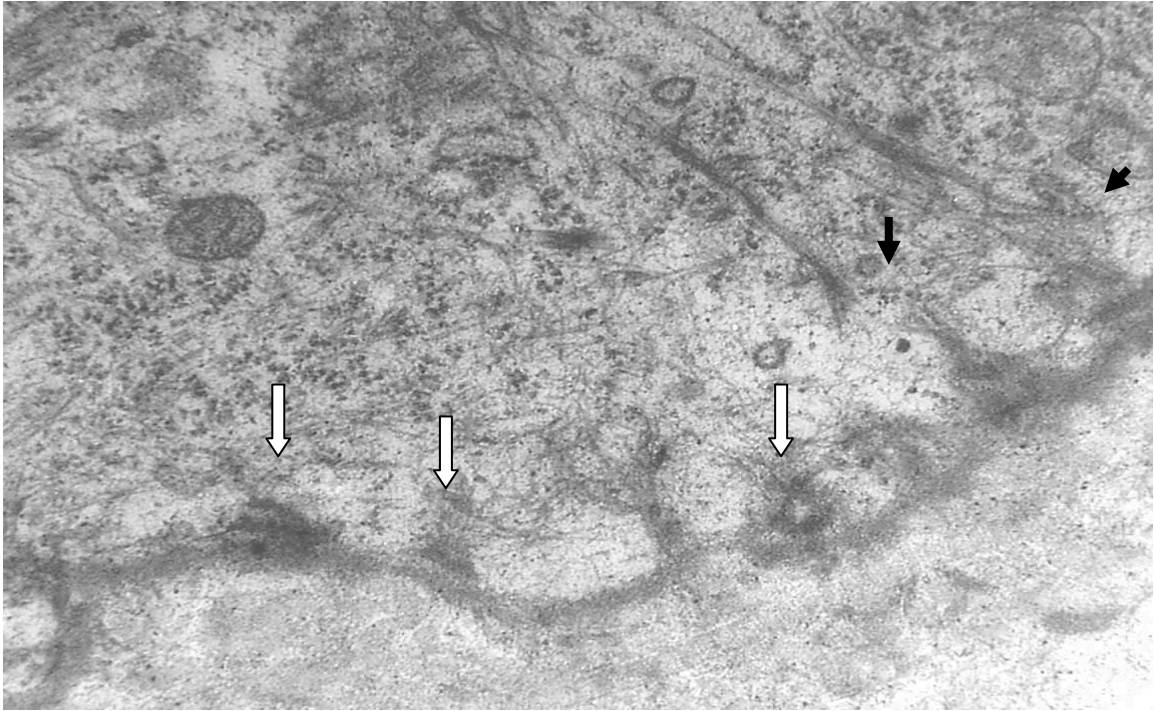


Figura 54: Detalhe de queratinócitos basal, com membrana basal íntegra. Percebe-se diminuição da inserção (seta) e ruptura de filamentos de queratina (cabeça de seta) MET 20.000X

## Discussão

Como se tem observado em diversos trabalhos, modelos animais têm sido utilizados para estudos experimentais em doenças fototóxicas e também na FFD<sup>14-18</sup>.

Julga-se relevante destacar ter havido a reprodução da lesão clinicamente em todos os quatro ratos utilizados no experimento efetuado pela equipe.

Nas primeiras seis horas, a avaliação clínica e histológica não evidenciou lesão, tendo sido visualizada epiderme normal, tanto nos controles, quanto na área aspergida com limão. Isto vem ao encontro dos conhecimentos sobre morfologia da lesão e morte celular. Sabe-se que há um intervalo de tempo entre o estímulo lesivo e a manifestação morfológica da célula lesada ou morta. A duração deste retardo pode variar de acordo com a sensibilidade do método utilizado para detectar as alterações<sup>20</sup>.

Por sua vez a microscopia eletrônica de transmissão (MET), obtida de pele duas horas após a exposição solar no tempo de oito minutos, foi capaz de demonstrar alterações antes de haver lesão na microscopia ótica. Vacuolização e espongiose foram vistas, bem como lesão dos filamentos de citoqueratina e da membrana dos queratinócitos.

Em 24 horas após a indução experimental, não foi constatada clinicamente, lesão; no entanto, na microscopia ótica ficaram evidentes espongiose, vacuolização dos queratinócitos e necrose.

A lesão foi evidenciada clinicamente em 48 horas, pela presença de eritema, sem diferença nos tempos de exposição de 5 e

8 minutos. A MO demonstrou lesão mais intensa do que em 24 horas com presença de clivagens sub e intraepidérmicas além da exocitose, sendo mais intensas em T8. A derme apresentou congestão, micro-hemorragia e esparsas células inflamatórias, achados esses inespecíficos.

Da mesma forma a presença de lesão do epitélio folicular foi verificada, de forma semelhante à epiderme, com vacuolização da bainha radicular por provável difusão da substância fotoativa para dentro do folículo.

Embora o eritema tenha permanecido inalterado após 72 horas da indução experimental, as lesões na MO já demonstraram alguma involução. As alterações de vacuolização, espongirose, necrose e exocitose acometem menor número de queratinócitos numa distribuição mais esparsa. Começam a aparecer, neste momento, atipias celulares. Tais atipias já foram descritas em lesões provocadas pela radiação solar, e como não foram identificadas nos controles da pele aspergidas com limão e sem sol, talvez possam ser consideradas uma alteração actínica<sup>12</sup>.

Destaca-se não ter havido lesão clínica nem na MO nos controles realizados: pele aspergida com limão e sem exposição ao sol e pele exposta ao sol e sem limão. Isso demonstra que a lesão só se desenvolve pela junção dos dois fatores: furocumarínicos e radiação UV.

Além do mais, o diagnóstico da FFD quando acompanhado de uma história clínica apropriada, não oferece dificuldade. Em outras circunstâncias, pode ser confundido com dermatite de contato, linfangite superficial e queimaduras químicas. Nestes casos, a

biópsia pode contribuir para que os diagnósticos diferenciais sejam afastados <sup>21, 22</sup>.

Enfatiza-se que, há escassos relatos na literatura sobre os achados histológicos da FFD. O conhecimento detalhado das alterações morfológicas da FFD visa a prover dados para que haja uma confirmação de uma hipótese diagnóstica <sup>5, 7, 8, 11-13</sup>.

Assim sendo, numa consideração com respeito ao experimento realizado, suspeita-se que pelo fato de os ratos serem albinos uma maior exposição solar seja necessária para que a lesão se desenvolva em humanos. Acredita-se que a espessura da camada de queratina também possa interferir no desenvolvimento da lesão, bem como a intensidade de raios ultravioleta A.

## Conclusões

- Nas primeiras seis horas não ocorreu lesão na MO;
- Na MET, houve vacuolização citoplasmática e ruptura da membrana com diminuição da ancoragem dos filamentos de queratina, na placa desmossômica, bem como aumento do espaço entre as placas. De forma semelhante ocorreu diminuição da ancoragem de queratina na placa hemidesmossômica;
- Em 24 horas, não se evidenciou lesão clínica. A MO demonstrou espongirose, vacuolização e necrose de queratinócitos;
- Em 48 horas houve eritema cutâneo. À MO, apareceram além das alterações vistas em 24 horas, vesículas sub ou intraepidérmicas, exocitose e ocasionais microabcessos;
- Em 72 horas permanecia clinicamente o eritema. As lesões vistas na MO demonstraram moderada regressão, com acometimento isolado dos queratinócitos e aparecimento de atipia dos queratinócitos.

## Referências Bibliográficas

1. Stoner JG, Rasmussen JE. Plant dermatitis. J Am Acad Dermatol 1983; 9: 1-15.
2. Padilla HC. Fitofotodermatitis. Algunos aspectos fotobiológicos de los psoralenes. Med Cut ILA 1988; 16: 267 - 272.
3. [www.telemedicine.org/botanical/bot5htm](http://www.telemedicine.org/botanical/bot5htm) . Electronic textbook of Dermatology. Botanical Dermatology – Phytophotodermatitis: pp 1-17 .
4. Wagner AM, Wu JJ, Hansen RC, Nigg HN, Beiere RC. Bullous Phytophotodermatitis associated with high natural concentrations of furanocoumarins in limes. Am J Contact Dermat 2002; 13: 10-14.
5. Drijkoningen M, Wolf-Peeters C, Roelandts R, Loncke J, Desmet V. A morphological and immunohistochemical study of phytophotodermatitis-like bullae induced by PUVA. Photodermatology 1986; 3: 199-201

6. Mateos F, Canals AG, Arboix ML. Fitofotodermatitis. An Esp Pediatr 2000; 52: 72-73.
7. Baugh WP, Barnette DJr, Phytophotodermatitis, [www.emedicine.com/DERM/topic324.htm](http://www.emedicine.com/DERM/topic324.htm)
8. Gonçalves NEL, de Almeida Jr. HL , Hallal EC, Amado M. Experimental phytophotodermatitis. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2005;21 :318-21.
9. Walemborg N, Urkin Y, Witztum A. Phytophotodermatitis due to figs. Cutis 1991; 48:151-152.
10. Seligman PJ, Mathias T, Malley MA, et al. Phytophotodermatitis from celery among grocery store workers. Arch Dermatol 1987; 123: 1478-1482.
11. Lever WF, Schaumburg-Lever G. Histopathology of the skin. Philadelphia: JB Lippincott Company, 7th ed, 1990: 286.
12. Barnhill RL. Textbook of Dermatopathology. New York: McGraw-Hill, 1<sup>st</sup> ed, 1998: 274-275.
13. Afek U, Gross E, Aharomi N, Rosenberg L, Halevy S. An outbreak of phytophotodermatitis due to celery. Int J dermatol 1994; 33:116-118

14. Sasaki T, Shimizu H, Tokuyama S . Antigenic characterization in ampiroxicam-induced photosensitivity using an in vivo model of contact hypersensitivity. *J Dermatol Sci.* 1999 Nov;21(3):170-5.
15. Selvaag E, Thune P. Phototoxicity to sulphonamide-derived oral antidiabetics and diuretics: investigations in hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1997 Feb-Apr;13(1-2):4-8.
16. Gerberick GF, Ryan CA. Use of UVB and UVA to induce and elicit contact photoallergy in the mouse. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1990 Feb;7(1):13-9.
17. Giudici PA, Maguire HC Jr. Experimental photoallergy to systemic drugs. *J Invest Dermatol.* 1985 Sep;85(3):207-11.
18. Maguire Jr. HC, Kaidbey K. Experimental photoallergic contact dermatitis: a mouse model. *J Invest Dermatol.* 1982 Sep;79(3):147-52.
19. Martins EC, Tomimori PK, Sampaio SAP. Fitofotodermatose experimental pelo limão Taiti. *Med Cut ILA* 1974; 5: 441-446.
20. Kumar V, Abbas A, Fausto N. *Pathologic Basis of Disease* Robbins and Cotran. Philadelphia: Elsevier Saunders, Seventh Edition, 2005: 4-44

21. Solis RR, Dotson DA, Trizna Z. Phitophotodermatitis A Sometimes Difficult Diagnosis. Arch Fam Méd. 200;9:1195-1196
  
22. Ahamed I, Holmes RC. Phytphotodermatitis mimicking superficial lymphangitis. Br J Dermatol 2000; 142: 1047-1070.

## **ARTIGO**

### **“Avaliação Histológica Seriada e Ultraestrutural da Fitofotodermatite Experimental em Ratos provocada pelo Limão Taiti ”**

**Valéria Magalhães Jorge**

**Hiram Larangeira de Almeida Jr.**

**Nara Moreira Rocha**

**Luis Antônio Suíta de Castro**

## **Introdução**

As dermatoses por plantas (ou fitodermatoses) podem ser classificadas em vários subtipos: 1. lesão mecânica decorrente de trauma com infecção secundária ou granulomas tipo corpo estranho; 2. lesão farmacológica por contato com substância farmacologicamente ativa; 3. fitodermatite irritante primária por irritação direta na pele; 4. fitodermatite alérgica promovendo uma reação de hipersensibilidade tipo IV; 5. pseudofitodermatite provocada por artrópodes ou agentes localizados em plantas; 6. fitofotodermatite (FFD) e 7. pseudofitofotodermatite decorrente da presença de furocumarínicos produzidos por fungos que infectam a planta e não produzida por ela <sup>1</sup>.

Fitofotodermatite consiste numa erupção cutânea inflamatória fototóxica, por lesão celular dos psoralenos e da luz solar. FFD é uma reação fototóxica inteiramente independente do sistema imunológico. Os ingredientes necessários para produzir FFD incluem exposição temporal a ambos, substância fotossensibilizante e radiação ultravioleta; por isso, tal fenômeno classifica-se como reação fototóxica, diferenciando-se das reações fotoalérgicas, nas quais existe componente imunológico<sup>1-3</sup>.

Todas as plantas que causam fitofotodermatite contêm psoralenos. Esses são compostos heterocíclicos aromáticos derivados da condensação de um anel furano com o anel cumarínico<sup>4</sup>.

Em Pelotas –RS estima-se uma incidência de 16 casos por 100.000 hab/verão; ao redor de 50 casos são vistos, por verão<sup>5</sup>. Mais comumente, os pacientes manipulam limões taiti em caipirinhas ou como guarnição; por isso a localização mais freqüente é o dorso das mãos. Inclusive, casos graves, com bolhas intensas, afetando ambas as mãos, são freqüentes. Também ocorre de os pacientes passarem a mão no tronco e produzirem queimaduras à distância. Já se viram também crianças afetadas por terem sido tocadas por adultos que manipulavam os limões.

Salienta-se que a FFD pode simular várias dermatoses, sendo, por vezes, de difícil diagnóstico clínico<sup>6-9</sup>. Existem pouquíssimas informações sobre os achados histológicos das reações fototóxicas<sup>5, 10-12</sup> provavelmente devido aos diagnósticos serem estabelecidos clinicamente.

Inclusive não há informações sobre achados ultraestruturais da FFD na literatura pesquisada.

O objetivo desse trabalho é a avaliação histológica seriada e ultraestrutural das lesões provocadas experimentalmente em ratos expostos à luz solar, previamente aspergidos com o sumo da casca do limão taiti.

## Material e Métodos

Foram utilizados, para o experimento, quatro ratos albinos (*Rattus norvegicus wistar*) do biotério central da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) previamente depilados manualmente 72 horas antes, a fim de se evitarem artefatos traumáticos.

Após a anestesia com Zoletil 50 ( Cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam) por via intramuscular, com a dose de 50,0mg por kilo, os ratos numerados tiveram seu dorso direito borrifados com suco da casca do limão taiti e expostos ao sol de verão (2ª quinzena de fevereiro) às 11 horas (horário solar); uma área por 5 minutos e outra por 8 minutos.

O lado esquerdo do dorso dos ratos serviu de controle com exposição ao sol e sem o limão taiti. Um segundo controle foi desenvolvido em outra área de pele, exposto somente ao sumo da casca e livre de exposição solar.

As biópsias foram realizadas com "punch" de 3 mm, com diferentes intervalos de tempo, após a indução experimental e imediatamente fixadas em formalina a 10% para microscopia ótica e em glutaraldeído para microscopia eletrônica e processadas de rotina.

Para microscopia ótica (MO), as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina e obtidas após 30 minutos, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 24 h, 48 h e 72 horas da exposição ao sol. O controle somente com sol foram biopsiados nestes mesmos intervalos e somente com limão em 1h, 24h e 48 horas. Para a microscopia

eletrônica de transmissão (MET) realizada em dois ratos, o intervalo após a exposição, foi de 2 horas.

A avaliação histológica foi feita independentemente, por um patologista e um dermatologista com experiência em microscopia com cegamento sobre os tempos de exposição e os intervalos de realização das biópsias.

## **Resultados**

A lesão foi reproduzida em todos os quatro ratos submetidos ao experimento.

### **Resultados dos controles**

Foram identificados necrose isolada e ocasional de queratinócitos nos ratos expostos ao sol e atipias celulares isoladas em 1 rato em biópsia realizada 72 horas após a indução experimental.

### **Resultados em menos de 24 horas**

Os achados histológicos das biópsias de pele dos ratos expostos ao sol por 5 (T5) e 8 minutos (T8), realizadas nos intervalos de tempo de 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas, demonstraram epiderme com aspecto normal, tanto nas áreas aspergidas com limão, quanto nos controles.

### **Resultados em 24 horas**

Enfatiza-se que a inspeção clínica, realizada 24 horas após a realização do experimento, não evidenciou lesões.

Por sua vez, as biópsias da área com limão demonstraram necrose de queratinócitos em três dos quatro ratos em T5, e nos quatro ratos em T8, tendo sido encontrado necrose de queratinócitos agrupada (figura 1). A vacuolização citoplasmática dos queratinócitos foi observada em todos os ratos, sendo isolada (figura 1) ou confluyente (figura 2) e sem relação com o tempo de exposição solar. A espongiose foi demonstrada em todos os casos (figura 2).

Com T8, a espongiose, vacuolização citoplasmática e necrose acometem grupos de queratinócitos confluentes (figura 2).

Salienta-se ainda, que a derme mostrou congestão em 3 dos 4 ratos aspergidos com limão em T5 e nos 4 ratos em T8.

### **Resultados em 48 horas**

Destaca-se que clinicamente evidenciou-se eritema nas áreas aspergidas com limão, tanto em T5, quanto em T8.

Por sua vez na área com limão, é evidenciada vacuolização intensa (Figura 3) que progride para bolhas sub ou intraepidérmicas (Figura 4 e 5), e necrose de queratinócitos (Figura 4). Da mesma forma que nos cortes histológicos de 24 horas, houve áreas com espongiose importante e vacuolização confluyente (figura 3). Além disso a exocitose foi verificada pela primeira vez em 48 horas e acometeu todos os ratos aspergidos com limão, nos dois tempos de exposição (figura 4). Houve progressão para microabcesso caracterizado por grupamentos de neutrófilos mesclados com células apoptóticas em apenas um rato com limão, em T8.

Ocorreu lesão do epitélio folicular evidenciada pela presença de vacuolização e necrose dos queratinócitos foliculares.

As alterações dérmicas evidenciadas foram congestão e presença de células inflamatórias isoladas e micro-hemorragia.

### **Resultados em 72 horas**

Salienta-se que na avaliação clínica, permanecia o eritema.

Em T5, a espongiose e vacuolização continuaram presentes, associada agora a células atípicas, evidenciadas por contornos celulares e nucleares irregulares, bem como macronucleolose (figura 6).

Os microabcessos estavam presentes em dois ratos em T5 e em um em T8. A vacuolização e espongiose estavam presentes em todos os ratos, e necrose em dois em T5 e em dois em T8. Estes achados agora acometem menor número de queratinócitos.

Os achados dérmicos de congestão, micro-hemorragia e infiltrado leucocitário começaram a demonstrar regressão, ocorrendo apenas ocasionalmente sem relação com o tempo de exposição ao sol.



Figura 1: pele com limão, exposta ao sol por 5 minutos, após 24h: necrose confluyente de queratinócitos (seta) e vacuolização isolada. HE 400X

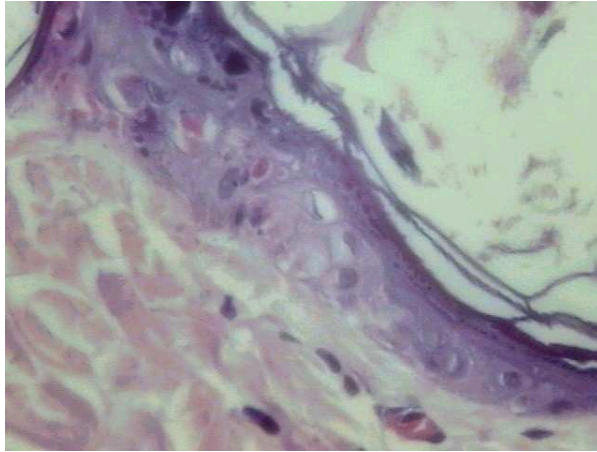


Figura 2: pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 24h: necrose de queratinócitos, espongiose e vacuolização isolada. HE 400X

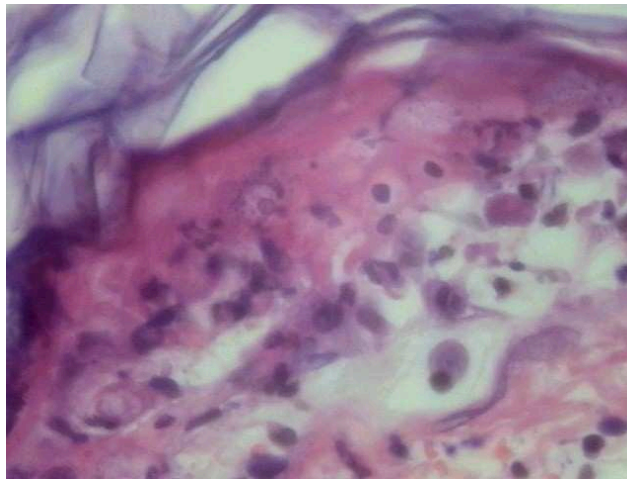


Figura 3: pele com limão, exposta ao sol por 5 minutos, após 48h: vacuolização citoplasmática confluyente, necrose e exocitose. HE 400X

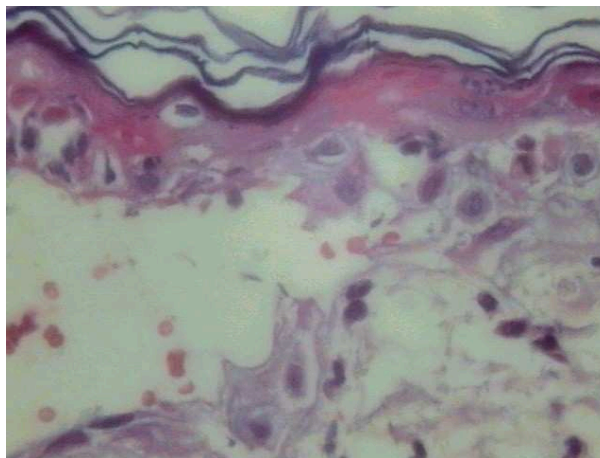


Figura 4: pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos, após 48h: vesícula intraepidérmica, necrose de queratinócitos, vacuolização citoplasmática. HE 400X

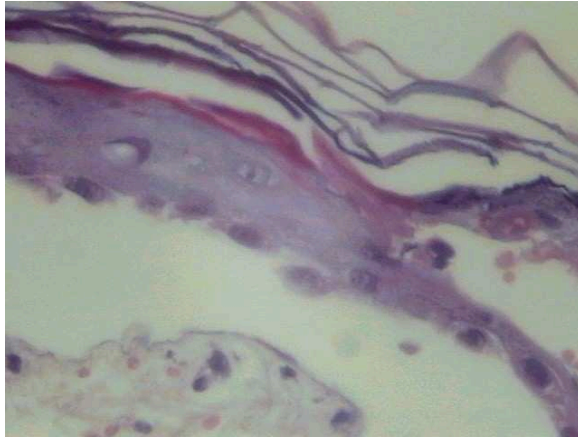


Figura 5: pele com limão, exposta ao sol por 5 minutos, após 48h: vesículas sub e intraepidérmicas, necrose. HE 400X .

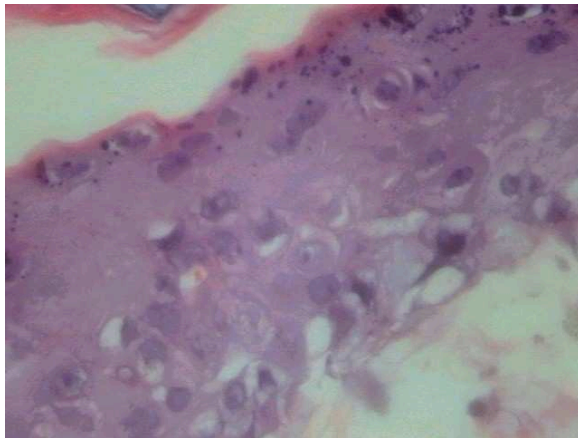


Figura 6: Pele com limão, exposta ao sol por 8 minutos após 72 horas: espongiose, vacuolização citoplasmática e atipias nucleares. HE 400X

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão**

A avaliação da microscopia eletrônica de transmissão realizada em dois ratos aspergidos com limão e expostos à luz solar por 8 minutos, já demonstrava lesão tão precocemente quanto por 2 horas.

Com pequeno aumento observa-se vacuolização do citoplasma. Com aumentos maiores observa-se ruptura da membrana citoplasmática (Figura 7).

O exame detalhado dos desmossomas mostra diminuição da ancoragem dos filamentos de queratina e ruptura dos mesmos. Além disso, o espaço entre as placas desmossômicas está aumentado.

Examinando-se o queratinócito basal vê-se vacuolização citoplasmática periférica. Em maior aumento evidencia-se membrana basal íntegra e prováveis rupturas na ancoragem nos filamentos de queratina na placa hemidesmossômica.

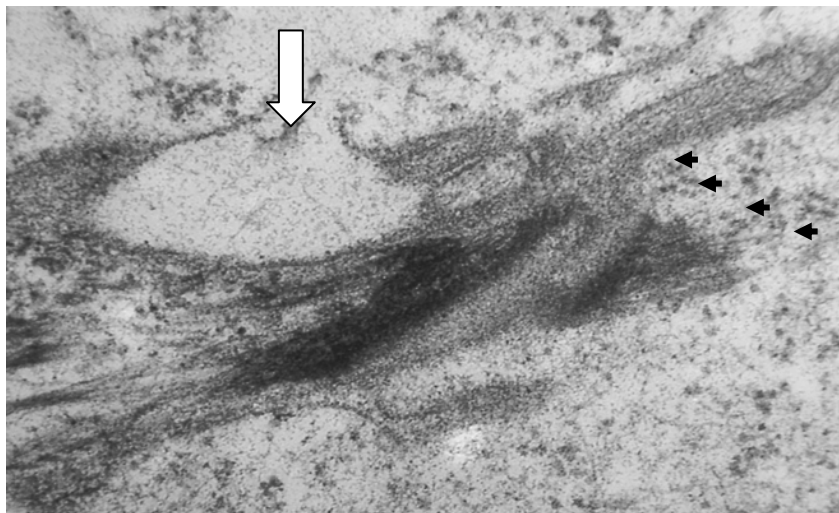


Figura 7 : Detalhe da ruptura da membrana celular (seta) e provável diminuição dos filamentos de queratina (cabeça de seta) MET 20.000X

## Discussão

Como se tem observado em diversos trabalhos, modelos animais têm sido utilizados para estudos experimentais em doenças fototóxicas e também FFD<sup>13-16</sup>.

Houve a reprodução da lesão clínica em todos os quatro ratos utilizados no experimento.

A avaliação clínica e histológica não evidenciou lesão nas primeiras seis horas, tendo sido visualizada epiderme normal, tanto nos controles, quanto na área aspergida com limão. Isto vem ao encontro dos conhecimentos sobre morfologia da lesão e morte celular. Sabe-se que há um intervalo de tempo entre o estímulo lesivo e a manifestação morfológica da célula lesada ou morta. A duração desse retardo pode variar de acordo com a sensibilidade do método utilizado para detectar as alterações<sup>6</sup>.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET), obtida de pele duas horas após a exposição solar no tempo de oito minutos, foi capaz de demonstrar alterações antes de haver lesão na microscopia ótica. Vacuolização e espongiose foram vistas, bem como lesão dos filamentos de citoqueratina na ancoragem ao desmossoma e hemidesmossoma e da membrana dos queratinócitos.

Em 24 horas após a indução experimental, não foi evidenciada clinicamente lesão; no entanto, na microscopia ótica, ficaram evidentes espongiose, vacuolização dos queratinócitos e necrose.

A lesão clínica foi verificada em 48 horas, pela presença de eritema sem diferença nos tempos de exposição de 5 e 8 minutos. A

MO demonstrou lesão mais intensa, com presença de clivagens sub e intraepidérmicas, além da exocitose. A derme apresentou alterações inespecíficas como: congestão, micro-hemorragia e esparsas células inflamatórias.

A presença de lesão do epitélio folicular foi observada, de forma semelhante à epiderme, com vacuolização da bainha radicular e necrose.

Embora o eritema tenha permanecido inalterado após 72 horas da indução experimental, as lesões na MO já demonstraram alguma involução. As alterações de vacuolização, espongirose, necrose e exocitose acometem menor número de queratinócitos, numa distribuição mais esparsa. Começam a aparecer, neste momento, atipias celulares. Essas atipias já foram descritas em lesões provocadas pela radiação solar e, como não foram identificadas nos controles da pele aspergidas com limão e sem sol, talvez possam ser consideradas uma alteração actínica.

Nos controles realizados ( pele aspergida com limão e sem exposição ao sol e pele exposta ao sol e sem limão ) não houve lesão clínica nem histológica. Isto demonstra que a lesão só se desenvolve pela junção dos dois fatores: psoralenos e radiação UV.

Importa ressaltar que o diagnóstico da FFD, quando acompanhado de uma história clínica apropriada, não oferece dificuldade. Em outras circunstâncias, pode ser confundido com dermatite de contato, linfangite superficial e queimaduras químicas. Nestes casos, a biópsia pode contribuir para que os diagnósticos diferenciais sejam afastados.

Há escassos relatos na literatura sobre os achados histológicos da FFD. Salienta-se que o conhecimento detalhado das alterações morfológicas da FFD visa a prover dados para uma confirmação de uma hipótese diagnóstica.

Numa consideração com respeito ao modelo experimental, suspeita-se que, pelo fato de os ratos serem albinos, uma maior exposição solar seja necessária para que a lesão se desenvolva em humanos, ficando interrogado o papel da melanina nessa reação fototóxica. Acredita-se que a espessura da camada de queratina também possa interferir no desenvolvimento da lesão bem como a intensidade de raios ultravioleta A.

## Conclusão

- Nas primeiras seis horas não há lesão na MO;
- Na MET há vacuolização citoplasmática e ruptura da membrana citoplasmática com diminuição da ancoragem dos filamentos de queratina na placa desmossômica bem como aumento do espaço entre as placas.
- Em 24 horas não se evidencia lesão clínica. A MO demonstra espongiose, vacuolização e necrose de queratinócitos;
- Em 48 horas há eritema cutâneo. À MO, aparecem além das alterações vistas em 24 horas, vesículas sub ou intraepidérmicas, exocitose e ocasionais microabcessos;
- Em 72 horas permanecia clinicamente o eritema. As lesões vistas na MO demonstraram acometimento isolado dos queratinócitos com o aparecimento de atipia dos queratinócitos.

## Referências Bibliográficas

01. Stoner JG, Rasmussen JE. Plant dermatitis. J Am Acad Dermatol 1983; 9: 1-15.
02. [www.telemedicine.org/botanical/bot5htm](http://www.telemedicine.org/botanical/bot5htm) . Electronic textbook of Dermatology. Botanical Dermatology – Phytophotodermatitis: pp 1-17 .
03. Wagner AM, Wu JJ, Hansen RC, Nigg HN, Beiere RC. Bullous Phytophotodermatitis associated with high natural concentrations of furanocoumarins in limes. Am J Contact Dermat 2002; 13: 10-14.
04. Padilla HC. Fitofotodermatitis. Algunos aspectos fotobiológicos de los psoralenos. Med Cut ILA 1988; 16: 267 - 272.
05. Gonçalves NEL, de Almeida Jr. HL , Hallal EC, Amado M. Experimental phytophotodermatitis. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2005;21 :318-21.
06. Walemborg N, Urkin Y, Witztum A. Phytophotodermatitis due to figs. Cutis 1991; 48:151-152.
07. Seligman PJ, Mathias T, Malley MA, et al. Phytophotodermatitis from celery among grocery store workers. Arch Dermatol 1987; 123: 1478-1482.

08. Solis RR, Dotson DA, Trizna Z. Phitophotodermatitis A Sometimes Difficult Diagnosis. Arch Fam Méd. 200;9:1195-1196
09. Ahamed I, Holmes RC. Phytophotodermatitis mimicking superficial lymphangitis. Br J Dermatol 2000; 142: 1047-1070.
10. Drijkoningen M, Wolf-Peeters C, Roelandts R, Loncke J, Desmet V. A morphological and immunohistochemical study of phytophotodermatitis-like bullae induced by PUVA. Photodermatology 1986; 3: 199-201
11. Lever WF, Schaumburg-Lever G. Histopathology of the skin. Philadelphia: JB Lippincott Company, 7th ed, 1990: 286.
12. Barnhill RL. Textbook of Dermatopathology. New York: McGraw-Hill, 1<sup>st</sup> ed, 1998: 274-275.
13. Sasaki T, Shimizu H, Tokuyama S . Antigenic characterization in ampiroxicam-induced photosensitivity using an in vivo model of contact hypersensitivity. J Dermatol Sci. 1999 Nov;21(3):170-5.
14. Selvaag E, Thune P. Phototoxicity to sulphonamide-derived oral antidiabetics and diuretics: investigations in hairless mice. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 1997 Feb-Apr;13(1-2):4-8.

15. Gerberick GF, Ryan CA. Use of UVB and UVA to induce and elicit contact photoallergy in the mouse. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1990 Feb;7(1):13-9.

16. Giudici PA, Maguire HC Jr. Experimental photoallergy to systemic drugs. *J Invest Dermatol*. 1985 Sep;85(3):207-11.

17. Kumar, Vinay; Abbas, Abul; Fausto, Nelson. *Pathologic Basis of Disease Robbins e Cotran*. Philadelphia, Elsevier Saunders 7<sup>th</sup> edition, 2005 3-46.