






DESENVOLVIMENTO DE PELE TRIDIMENSIONAL *IN VITRO* PARA ESTUDOS DE RADIODERMITE, CICATRIZAÇÃO, TUMORIGÊNESE E SCREENING DE BIOATIVOS MARINHOS

In vitro three-dimensional skin development for radiodermatitis, healing, tumorigenesis, and marine bioproduct screening

Giselle Pinto de Faria Lopes^{1*} , Isabel Virgínia Gomes e Silva^{2*} ,
Angelica Maria Schettino³, Angélica Ribeiro Soares⁴ ,
Maria Alice Fusco de Souza⁵ , Ricardo Coutinho⁶ 

Resumo: Dentre os processos do mapa estratégico da Marinha (PEM2040), nosso estudo de P&D na área das ciências da saúde e ciências navais contempla modernizar a força naval e obter a capacidade operacional plena, contribuindo relevantemente com o desenvolvimento nacional. O ineditismo e o potencial de aplicabilidade da inovação tecnológica proposta são consolidados nesse estudo pelo desenvolvimento de um modelo de pele tridimensional *in vitro* como ferramenta para o acompanhamento de patologias, como a radiodermite e o câncer de pele mostrados nesse trabalho, além de ser validado para testes de novas estratégias terapêuticas de uso tópico, exemplificado pelo emprego de um bioativo marinho extraído de algas verdes como candidato a biofármaco. Esse estudo multidisciplinar agrega diferentes áreas temáticas de estratégia de ciência, tecnologia e inovação da Marinha do Brasil por ajustar as demandas de Pesquisa Básica e Aplicada de modo a permitir a obtenção das capacidades operacionais da Marinha do Amanhã e do Futuro.

Palavras-chave: Pele *in vitro*, Radiodermite, Tumorigênese, Cicatrização, Bioativo marinho.

Abstract: Among the processes of the Navy's strategic map (PEM2040), our R&D study in health and naval sciences contemplates the modernization of the naval force and achieving full operational capacity, significantly contributing to national development, as a result for society by the map from 2020 to 2040. The novelty and applicability potential of the technological innovation proposed with the development of this *in vitro* three-dimensional skin model, seeking to mimic the microenvironment and validate this tool with treatment effects, such as the induction of radiodermatitis and melanoma. This multidisciplinary study brings together different thematic areas of the Brazilian Navy's science, technology, and innovation strategy, as it adjusts the demands of Basic and Applied Research to obtain the operational capabilities of the Navy of Tomorrow and of the Future.

Keywords: *In vitro* skin, Radiodermatitis, Tumorigenesis, Healing, Marine bioproduct.

1. Servidora civil nível superior, pesquisadora associada, encarregada da Divisão de Bioprodutos, do Departamento de Biotecnologia Marinha, da Superintendência de Pesquisa do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira - Arraial do Cabo, RJ - Brasil. E-mail: giselle.lopes@marinha.mil.br

2. Doutoranda do Programa Associado de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira/Universidade Federal Fluminense - Arraial do Cabo, RJ - Brasil. E-mail: isabel.virginia.1995@gmail.com

3. Capitão de fragata (médica), assistente da Clínica de Cirurgia Plástica do Hospital Naval Marcílio Dias - Rio de Janeiro, RJ - Brasil. E-mail: angelica.schettino@marinha.mil.br

4. Professora associada do Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Socioambiental de Macaé, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro, RJ - Brasil. E-mail: angelica.r.soares@gmail.com

5. Capitão-Tenente (RM2-médica veterinária), encarregada da Divisão de Cirurgia Experimental do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital Naval Marcílio Dias - Rio de Janeiro, RJ - Brasil. E-mail: alice.fusco@marinha.mil.br

6. Servidor civil nível superior, pesquisador titular, chefe do Departamento de Biotecnologia Marinha e coordenador do Programa Associado de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira/Universidade Federal Fluminense - Arraial do Cabo, RJ - Brasil. E-mail: ricardo.coutinho@marinha.mil.br

*Igual contribuição.

1. INTRODUÇÃO

O Plano Estratégico da Marinha 2040 (PEM2040) é consolidado por diferentes ações estratégicas navais. Entre elas, destacam-se a contribuição do ambiente marítimo e fluvial para a sobrevivência e prosperidade do Brasil e sua evolução e busca pela independência científica e tecnológica do país. A inovação na atividade científica que envolve a biodiversidade da Amazônia Azul é necessária para sensibilizar a sociedade para a importância do mar e das águas interiores, por constituírem uma imensa fonte de recursos naturais. Tal produção de conhecimento, de caráter científico-tecnológico, nos espaços marítimos e fluviais pode resultar em futuros aproveitamentos econômicos em prol do desenvolvimento nacional. Em uma visão prospectiva do poder marítimo, a plataforma continental brasileira representa um patrimônio a ser estudado e aproveitado, o que torna importante sua adequada proteção.

Entre os processos do mapa estratégico da Marinha (PEM2040), nosso estudo de pesquisa e desenvolvimento na área das ciências da saúde e ciências navais contempla modernizar a força naval (OBNAV6) e obter a capacidade operacional plena (OBNAV7), contribuindo relevantemente com o desenvolvimento nacional, como resultado para a sociedade previsto pelo mapa de 2020 a 2040. Este estudo multidisciplinar agrega diferentes áreas temáticas de estratégia de ciência, tecnologia e inovação da Marinha do Brasil por ajustar as demandas de pesquisa básica e aplicada, de modo a permitir a obtenção das capacidades operacionais da Marinha do Amanhã e do Futuro. A identificação e a obtenção das tecnologias necessárias ao combatente do futuro e aos meios navais, aeronavais e de fuzileiros navais das Marinhas do Amanhã e do Futuro só se materializarão com o desenvolvimento de novas tecnologias. Fruto de partes de duas teses de doutorado, abordando aspectos que influenciam diretamente na área temática de ciência e tecnologia, temos a nuclear e energia, considerando radiações ionizantes na saúde e bancos de tecidos biológicos; a saúde do combatente e da família naval, no desempenho humano e saúde, bioengenharia; e como aspectos do meio ambiente operacional questões de bioprospecção da biodiversidade marinha.

A radiodermite (ou radiodermatite) é resultado da exposição da pele à radiação ionizante, forma de energia que atua removendo elétrons de átomos ou moléculas de materiais, incluindo tecidos vivos. A radiodermite pode ocorrer como

resultado de um ataque ou desastre nuclear, mas também pode ser observada no tecido saudável de pacientes expostos ao tratamento do câncer por radioterapia (SINGH et al., 2016; CDC, 2021).

Na história da humanidade, o uso de energia ionizante em guerras mostrou ao mundo a severidade dos seus efeitos. Os eventos ocorridos na Segunda Guerra Mundial nas cidades de Hiroshima e Nagasaki iniciaram o conhecimento, na prática e da pior maneira, do potencial de dano e morte das radiações, deixando à mostra a gama de possibilidades de lesões cutâneas induzidas pela radiação e seu poder de cronificação. Outros eventos se sucederam às explosões nas cidades japonesas, como acidentes em usinas nucleares — Chernobil, em 1986, e Fukushima, em 2011 — e, nacionalmente, o evento trágico de Goiânia (GO), onde uma fonte radioativa de céσιο foi descartada de modo errôneo. Todos esses incidentes descortinaram inúmeros sintomas da síndrome da radiação aguda e das lesões térmicas causadas pela exposição inadvertida à radiação e, da mesma forma, expuseram as dificuldades do tratamento dessas lesões, cuja evolução é lenta, dolorosa e mutilante.

A radiação ionizante não deve ser apenas uma preocupação relativa aos efeitos adversos da terapia oncológica, mas também uma preocupação de saúde pública, por causa do potencial e real evento radiológico/nuclear, como por exemplo o bioterrorismo (RYAN, 2012). Com isso, expõe-se a importância das pesquisas para um melhor entendimento sobre a fisiopatologia da radiodermite (que ainda não foi totalmente esclarecida) e, assim, obtenção da melhor forma de tratamento (WILLIAMS; MCBRIDE, 2011).

Independentemente da causa da radiodermite, acidental ou decorrente de terapia, o Hospital Naval Marcílio Dias está apto para atender e tratar os pacientes, sendo até mesmo considerado o centro de referência para assistência às vítimas da radiação ionizante. A especialização dessa organização militar no atendimento a pacientes radioacidentados remonta o ano de 1972, com a ativação do Serviço de Medicina Nuclear, e desde então o adestramento e o preparo da tripulação proporcionaram a indicação do hospital naval a centro de referência para assistência a radioacidentados pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (REVISTA NAVIGATOR, 2008).

Do ponto de vista da clínica médica, as repercussões cutâneas da exposição à radiação ionizante variam em

gravidade, curso e prognóstico, sendo classificadas como agudas ou crônicas. As lesões agudas podem variar de eritema simples à ulceração, tendo início de uma a quatro semanas do começo da exposição à radiação. As lesões crônicas são caracterizadas por fibrose, atrofia, hipo ou hiperpigmentação e desenvolvimento de malignidades cutâneas, podendo ocorrer após meses ou anos da exposição à radiação (BRAY et al., 2016).

Na medicina nuclear, a radiação ionizante é utilizada para destruir as células tumorais ou impedir que elas se multipliquem (INCA, 2021). Infelizmente, os pacientes oncológicos submetidos à radioterapia apresentam incidência de até 95% de radiodermite, em diferentes graus de severidade, de acordo com dados norte-americanos (SINGH et al., 2016). No Brasil, um estudo realizado com 112 pacientes oncológicos no Ambulatório de Radioterapia da Unidade de Alta Complexidade em Oncologia da Universidade de Brasília (UnB) mostrou incidência de radiodermite entre 48 e 100%, dependendo da região onde se encontrava o tumor (BONTEMPO et al., 2021). Um total de nove estudos que descrevem a incidência de câncer de pele nas Forças Armadas dos Estados Unidos foi identificado, com quatro estudos específicos para melanoma, o câncer de pele mais agressivo. Os resultados do estudo revelaram risco aumentado de melanoma associado ao serviço militar ou ao *status* de prisioneiro de guerra. O serviço em ambientes tropicais foi relacionado ao aumento da incidência de câncer de pele melanoma e não melanoma entre os soldados da Segunda Guerra Mundial. Vários dos estudos revisados implicaram o aumento da exposição ao sol durante o serviço militar e a falta de proteção solar suficiente como as causas das taxas mais altas de câncer de pele entre as populações militares e veteranas dos Estados Unidos em comparação com a população não militar do país.

Diante disso, esperamos com este estudo evidenciar o ineditismo e o potencial de aplicabilidade da inovação tecnológica proposta com o desenvolvimento desse modelo de pele tridimensional *in vitro* buscando mimetizar o microambiente e validar essa ferramenta com efeitos de tratamento, como a indução da radiodermite e do melanoma, seguindo o princípio da substituição, um dos três princípios dos 3R de Russell e Burch (1959), cujo compromisso com a substituição, redução e refinamento do uso de animais caracteriza a base da regulação da utilização dos animais em ensino e pesquisa em todo o mundo, incluindo o Brasil, por meio

das regulamentações emanadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações.

2. OBJETIVO

Desenvolver e caracterizar pele tridimensional *in vitro* com células saudáveis, além de validá-la como ferramenta biotecnológica mediante a indução das patologias radiodermite e câncer de pele.

3. METODOLOGIA

3.1. LINHAGENS CELULARES E MODELO TRIDIMENSIONAL

Os experimentos foram realizados com linhagens de células saudáveis Hacat (queratinócitos), NIH-3T3 (fibroblastos) e B16F10 (melanoma) provenientes do banco de células do Rio de Janeiro (Figura 1).

As células foram cultivadas em monocamada na presença e na ausência de um bioativo marinho isolado de algas verdes em doses crescentes: 1, 5, 25, 125 e 625 µg/mL. A atividade mitocondrial, por sua vez, foi quantificada pelo teste de viabilidade por MTT por meio de espectrofotometria a 570 nm.

Realizaram-se três experimentos independentes em quintuplicata para o cálculo da IC50. As três linhagens foram cultivadas por 72 h com meio DMEM/F12 suplementado com glicose (33 mM), glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (3 mM), penicilina (0,5 U/mL), estreptomicina e 10% de soro fetal bovino.

Após determinar o IC50 do melanoma, primeiramente, as células 3T3 foram cultivadas sob arcabouço de agarose (1%) na presença e na ausência das células de melanoma B16F10, compondo a derme *like*. No dia seguinte, foram semeados os queratinócitos, e esperaram-se três dias para que se formassem camadas da epiderme *like*. Depois, os esferoides foram tratados ou com irradiação (4Gy por 5 min) ou com um composto bioativo e cultivados por 72 h com meio DMEM/F12 suplementado com glicose (33 mM), glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (3 mM), penicilina (0,5 U/mL), estreptomicina e 10% de soro fetal bovino, para possibilitar a formação completa dos esferoides. Após o tratamento, os esferoides foram

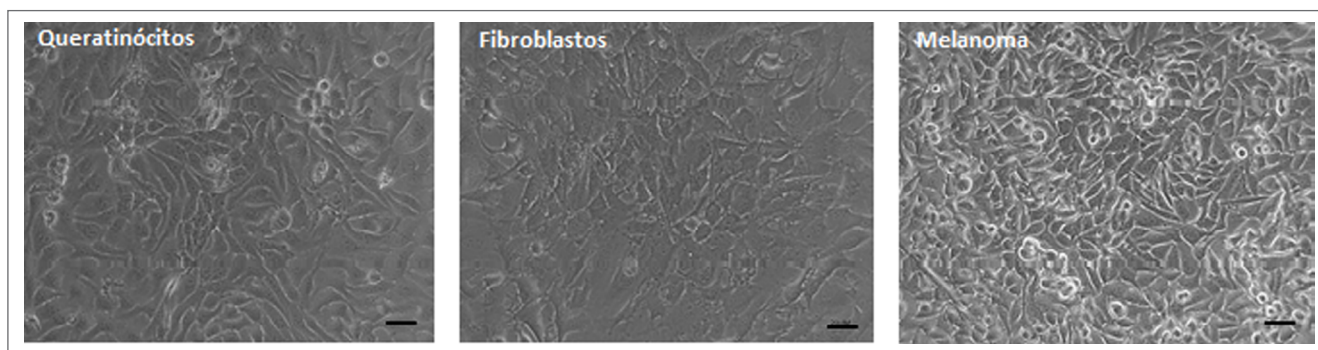


Figura 1. Linhagens celulares sadias e tumoral para o desenvolvimento do modelo tridimensional de pele.

transferidos para um molde *array* com 2% de agarose para inclusão dos esferoides em parafina. Ocorreram dois experimentos independentes e pelo menos 30 esferoides foram incluídos em cada um.

3.2. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os esferoides apontados em todas as condições experimentais descritas foram corados com azul de toluidina (1%), fixados com formaldeído (10%), desidratados com bateria de álcool (50, 70, 90, 100%)-xilol e incluídos em parafina para a realização de cortes (4 μm) no micrótomo e coloração. As lâminas contendo *array* de 60 esferoides sofreram a desparafinização e a reidratação e, em seguida, foram imersas por 1 minuto na hematoxilina de Harris. Foi feita a clarificação com água corrente. Posteriormente, os esferoides foram imersos em eosina amarelada por 1 minuto, e, em seguida, lavou-se e montou-se a lâmina com lamínula para a observação pelo microscópio Zeiss acoplado a um computador com o *software* Image-Pro Express.

4. RESULTADOS

4.1. POTENCIAL CITOTÓXICO DO BIOATIVO MARINHO EXTRAÍDO DE ALGA VERDE

Para a determinação da IC50 do bioativo em questão, as células de melanoma foram cultivadas em monocamada com crescentes concentrações, obtendo-se IC50 de 42,7 μm . É possível observar alterações na morfologia das células entre

25 e 125 μm , bem como a diminuição da atividade mitocondrial a partir de 25 μm comparado ao controle (Figura 2). Para verificar a especificidade do efeito citotóxico, utilizaram-se o valor próximo a IC50 e a concentração máxima para o tratamento das células sadias.

Foi demonstrado que o bioativo também foi consideravelmente citotóxico para queratinócitos e fibroblastos a partir de 125 μm , evidenciado pelas fotomicrografias em contraste de fase (Figura 2), entretanto os fibroblastos demonstraram maior resistência, e foi calculado o índice de seletividade entre as linhagens, chegando a 3,78 a razão entre IC50 do melanoma e IC50 dos fibroblastos, sendo significativamente seletivo acima de 2.

4.2. MODELO TRIDIMENSIONAL DE PELE *IN VITRO*

Após determinar o IC50 do melanoma, primeiramente, as células 3T3 foram cultivadas sob arcabouço de agarose na presença e na ausência das células de melanoma B16F10, compondo a *derme like*. No dia seguinte, foram semeados os queratinócitos, e esperaram-se três dias para que se formassem camadas da epiderme *like*.

Para testar o modelo para radiodermite, o esferoide de pele sadia foi irradiado, enquanto os esferoides em cocultura com o melanoma foram tratados com a IC50 do bioativo marinho por 72 h. Os esferoides com o melanoma apresentaram maior variação na morfologia em relação aos de pele sadia (Figura 3), entretanto foi quantificado o volume dos esferoides após os tratamentos, e não houve variação significativa (dados não mostrados).

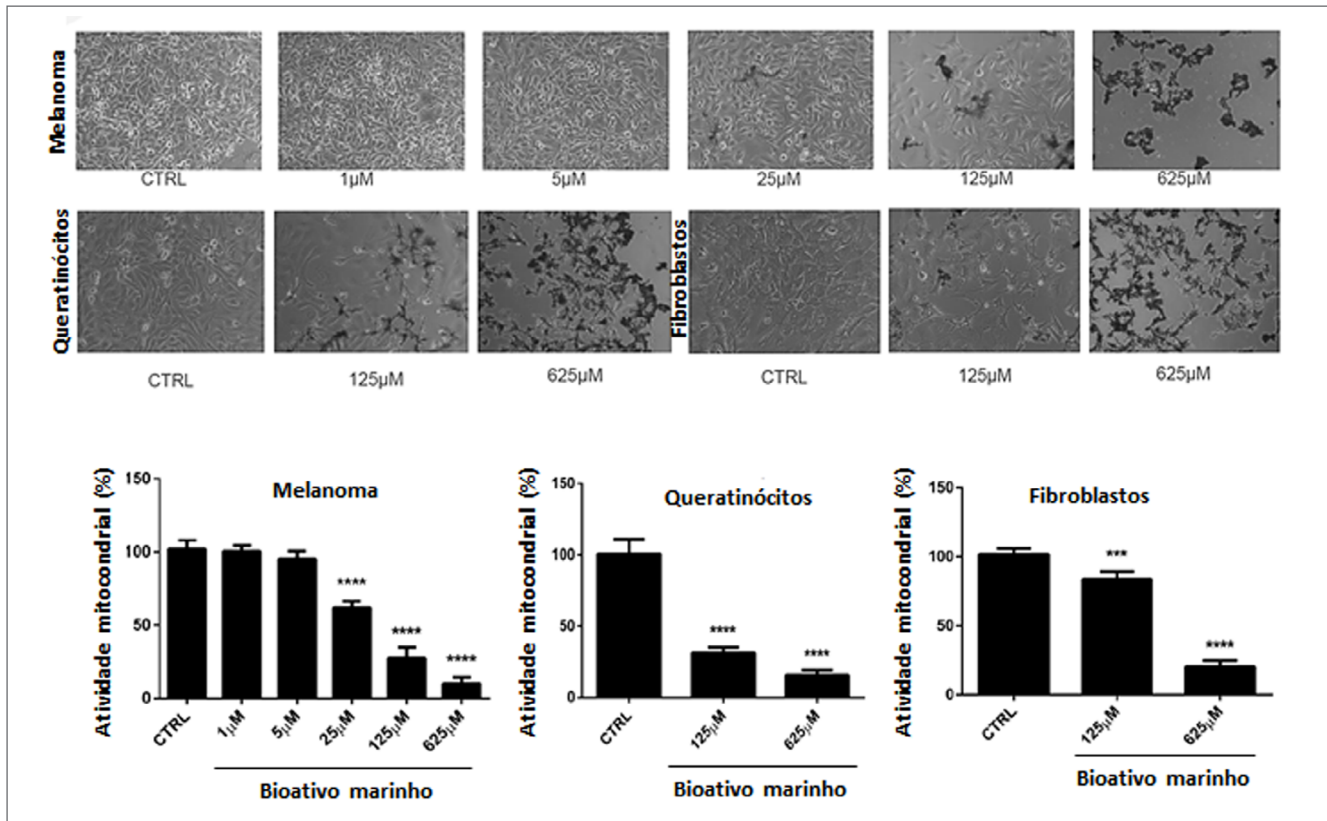


Figura 2. Cultura em monocamada com células saudáveis e tumorais na ausência e na presença do bioativo marinho extraído de alga verde.

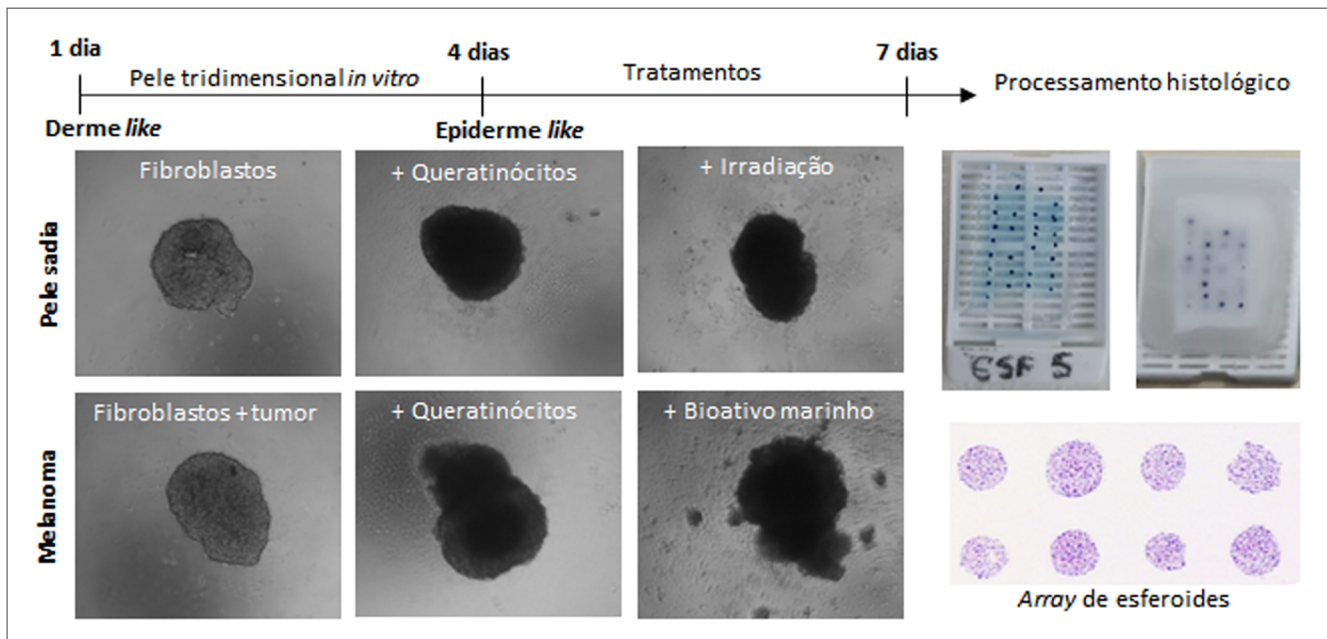


Figura 3. Modelo tridimensional de pele *in vitro*, desenvolvimento da derme e epiderme *like* e sua validação por histologia.

Em ambos os tipos de esferoide, notou-se um escurecimento após o cocultivo com os queratinócitos em contraste de fase (Figura 3). Em comparação ao modelo de radiodermite, o esferoide com melanoma tratado com a IC50 do bioativo marinho mostrou desfazimento após todo o período de tratamento, evidenciando o potencial citotóxico nesse modelo *in vitro* mais complexo que a monocamada.

Em seguida foi feita uma histologia para verificar microscopicamente a resposta celular e validar nosso modelo como uma pele artificial inovadora, simples e acessível que poderá ser utilizada para diferentes questões em dermatologia.

4.3. CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DO MODELO TRIDIMENSIONAL DE PELE

Ao observarmos o meio do esferoide em corte transversal, foi possível reconhecer as diferentes camadas celulares de epiderme e derme *like* no esferoide de pele sadia. Os esferoides irradiados exibiram características clássicas de radiodermite, como a produção em excesso de melanina e o afrouxamento da derme por causa da perda de matriz extracelular. Alguns esferoides também apresentaram células em migração para a epiderme *like*, com perfil de cicatrização diante do dano da radiação (Figura 4). Já o esferoide com o melanoma

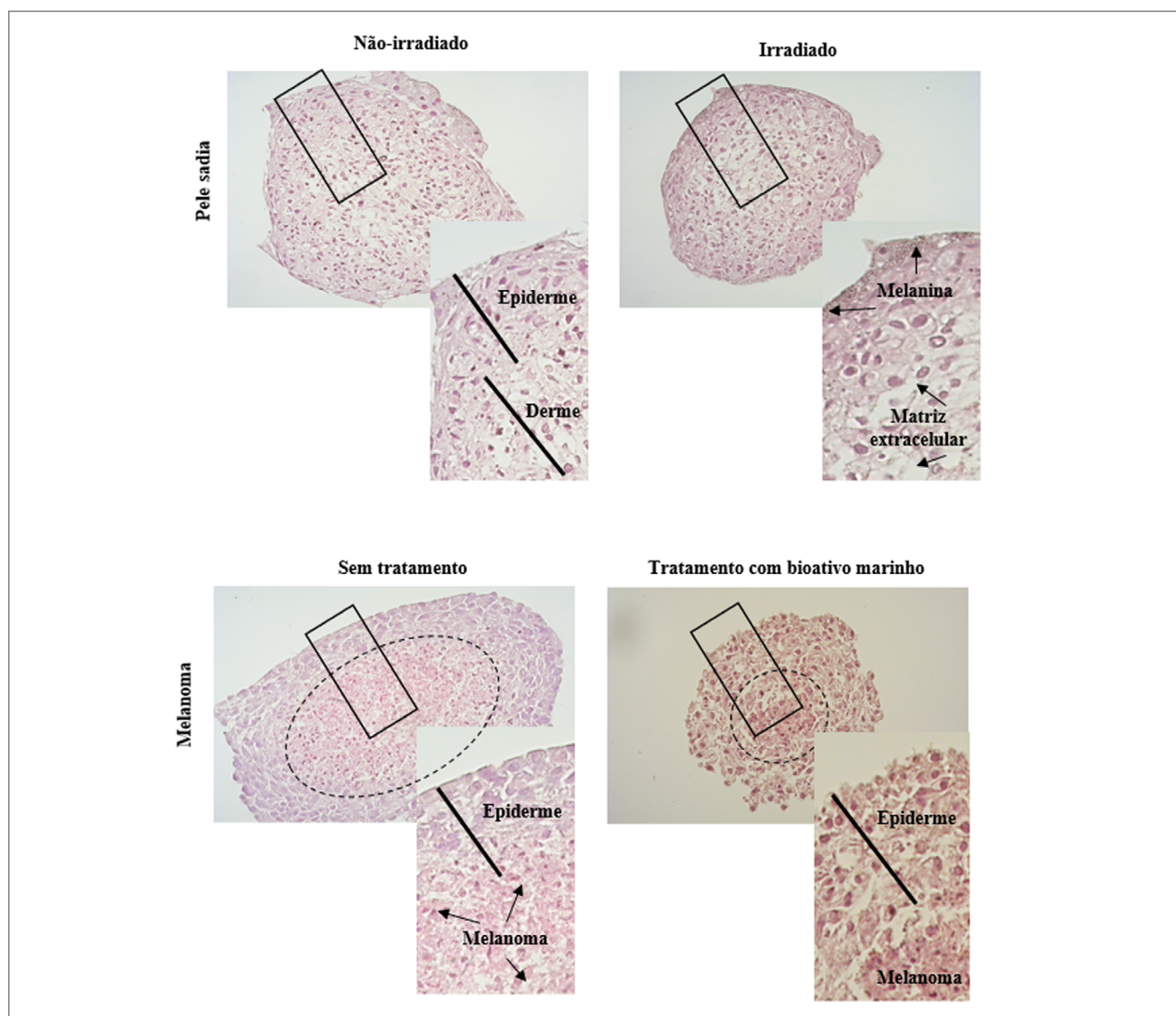


Figura 4. Caracterização histológica do modelo tridimensional de pele *in vitro*, desenvolvimento da derme e epiderme *like*, cicatrização, hiperpigmentação, tumorigênese e *screening* de bioprodutos marinhos.

demonstrou um perfil de invasividade em direção à camada da epiderme *like* e predominou na camada da derme *like*, mimetizando o comportamento da tumorigênese desse tipo de tumor (Figura 4). O tratamento com o bioativo marinho não somente indicou o desfazimento visto no contraste de fase; o corte histológico da maioria dos esferoides também evidenciou redução da massa tumoral localizada na derme. Além disso, em razão da sua citotoxicidade, constatamos desorganização dos queratinócitos, o que reflete o resultado em monocamada (Figura 4).

CONCLUSÃO

O modelo tridimensional de pele *in vitro* apresentado concretiza um potencial de evolução e de busca pela independência científica e tecnológica do país, bem como das atividades relacionadas à inovação, unindo áreas multidisciplinares que necessitam dessa ferramenta em comum e que estão alinhadas aos objetivos do PEM2040, o qual estabelece a atividade científica como uma das vertentes estratégicas para o fortalecimento do conceito político-estratégico da Amazônia Azul.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Defesa. Marinha do Brasil. PEM2040. Brasil: Marinha do Brasil. Disponível em: <https://www.marinha.mil.br/pem2040>. Acesso em: 29 set. 2021.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Radiation studies: ionizing radiation*. Estados Unidos: CDC. Disponível em: https://www.cdc.gov/nceh/radiation/ionizing_radiation.html. Acesso em: 28 set. 2021.

BONTEMPO, P.S.M.; CIOL, M.A.; MENÊSES, A.G.; SIMINO, G.P.R.; FERREIRA, E.B.; REIS, P.E.D. Acute radiodermatitis in cancer patients: incidence and severity estimates. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 55, e03676, 2021. <https://doi.org/10.1590/S1980-220X2019021703676>

BRAY, F.N.; SIMMONS, B.J.; WOLFSON, A.H.; NOURI, K. Acute and chronic cutaneous reactions to ionizing radiation therapy. *Dermatology Therapy (Heidelberg)*, v. 6, n. 2, p. 185-206, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13555-016-0120-y>

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). *Cartilha: radioterapia*. Brasil: INCA. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tratamento/radioterapia>. Acesso em: 29 set. 2021.

REVISTA NAVIGATOR. O Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD) – referência no tratamento de vítimas de acidentes radioativos. *Revista Navigator*. Disponível em: revistanavigator.com.br/navig8/cap/N8_cap5.pdf. Acesso em: 29 set. 2021.

RUSSELL, W.M.S.; BURCH, R.L. *The principles of humane experimental technique*. 1959. Disponível em: <https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>. Acesso em: 27 ago. 2021.

RYAN, J.L. Ionizing radiation: the good, the bad, and the ugly. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 132, n. 3, p. 985-993, 2012. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.411>

SINGH, M.; ALAVI, A.; WONG, R.; AKITA, S. Radiodermatitis: a review of our current understanding. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 17, n. 3, p. 277-292, 2016. <https://doi.org/10.1007/s40257-016-0186-4>

WILLIAMS, J.P.; MCBRIDE, W.H. After the bomb drops: a new look at radiation-induced multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *International Journal of Radiation Biology*, v. 87, n. 8, p. 851-868, 2011. <https://doi.org/10.3109/09553002.2011.560996>