

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

Instituto de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Avaliação dos efeitos de extrato da própolis vermelha na proteção de células epiteliais e mesenquimais humanas induzidas com irradiação UVA

Dissertação de Mestrado

ALLANA THAIS CAUDURO

Orientadora: Prof^ª Dra. Mariana Roesch Ely

Co-orientadora: Dra. Daniela Steffens Vergani

Caxias do Sul, 2023

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

Instituto de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Avaliação dos efeitos de extrato da própolis vermelha na proteção de células epiteliais e mesenquimais humanas induzidas com irradiação UVA

Dissertação de Mestrado

ALLANA THAIS CAUDURO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Mariana Roesch Ely

Co-orientadora: Dra. Daniela Steffens

Vergani

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

C371a Cauduro, Allana Thais

Avaliação dos efeitos do extrato da própolis vermelha na proteção de células epiteliais e mesenquimais humanas induzidas com irradiação UVA [recurso eletrônico] / Allana Thais Cauduro. – 2023.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2023.

Orientação: Mariana Roesch Ely.

Coorientação: Daniela Steffens Vergani.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Pele - Cuidado e higiene. 2. Própolis. 3. Irradiação. 4. Radiação ultravioleta. 5. Células-tronco. I. Ely, Mariana Roesch, orient. II. Vergani, Daniela Steffens, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 687.552.2

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE EXTRATOS DA
PRÓPOLIS VERMELHA NA PROTEÇÃO DE CÉLULAS
EPITELIAIS E MESENQUIMAIS HUMANAS INDUZIDAS
COM IRRADIAÇÃO UVA”**

Allana Thais Cauduro

Dissertação de mestrado submetido à Banca Examinadora designada pela Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Mestrado da Universidade de Caxias do Sul, como requisito parcial necessário para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Caxias do Sul, 15 de dezembro de 2021.

Prof^ª Dr^a Mariana Roesch Ely (Orientadora)

Universidade de Caxias do Sul

Prof^ª. Dr^a. Catia Santos Branco

Universidade de Caxias do Sul

Prof^ª. Dr^a. Juliana da Silva

Universidade Luterana do Brasil

Prof. Dr. Rafael Fernandes Zanin

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Aos meus pais, Irene e Valter, meu irmão Allan e amigos, por todo apoio, suporte e incentivo à pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me permitir vivenciar tantas experiências incríveis e inovadoras, reforçando minhas escolhas profissionais e pessoais.

Agradeço também a todos que de alguma forma, contribuíram com a realização desta incrível etapa da minha vida:

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Mariana Roesch Ely, por todos esses anos me proporcionando novos conhecimentos, oportunidades e responsabilidades. És um exemplo de dedicação e perseverança no que acreditas. Deixo o meu muito obrigada pelo acolhimento no laboratório e orientação dessa pesquisa.

À minha co-orientadora, Dra. Daniela Steffens Vergani, por ter me introduzido à cultura das células-tronco! Agradeço pela acolhida e pelas sempre valiosas discussões científicas. Obrigada pela paciência e por todos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques, por todo o conhecimento, pelas aulas e suporte científico e financeiro ao laboratório

Ao prof. Dr. Sidnei Moura, Prof. Dr. Sérgio Laguna Echeverrigaray e ao colega Fernando Scariot, pelo suporte em seus laboratórios.

Aos colegas de laboratório, bancada e iniciação científica pelas trocas, suporte e conhecimento, sempre presentes, tornando os dias mais divertidos e construtivos. Vocês foram certamente as pessoas que acompanharam mais “de perto” todo o desenvolvimento dessa dissertação.

À Bianca Canci pela amizade sem igual, pelas inúmeras mensagens diárias, em qualquer horário do dia e da noite, que de alguma forma sempre alegam o meu dia-a-dia. Pela troca de

experiências e conhecimentos compartilhados, pelas risadas, por
toda ajuda, minha profunda gratidão.

Aos colegas do Instituto de Biotecnologia, que de alguma
maneira estiveram comigo em alguma etapa deste trabalho.

Aos meus amigos e amigas que estiveram comigo, me
apoiando sempre com palavras incentivadoras. Sou muito grata por
ter vocês na minha vida.

Ao Gustavo Perondi, por toda a paciência comigo durante
todo o período, por todas as mensagens, apoio e carinho.

À minha família... pai, mãe, Valter e Irene, e meu irmão Allan, em
minha cachorrinha Tuca Luiza, por sempre torcerem e acreditarem
em mim. Por não deixarem desanimar quando o peso da “sem fim”
jornada me abatia, por serem meu ponto de paz quando tudo parecia
ser só caos. Vocês são as minhas maiores referências profissionais e
pessoais, sempre me orientando a agir com ética e responsabilidade.

...

À UCS e ao PPGBIO, pelo ensino e pesquisa de excelência,
proporcionando experiências e docentes únicos e de muito prestígio.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

Ao Instituto de Pesquisa com Células-tronco da UFRGS, pelo apoio
na realização de etapas deste trabalho, em especial à Dra. Patricia
Pranke.

Ao Dr. Bruno José da Costa Alcantara por todas as coletas no bloco
cirúrgico e toda paciência.

A Deus, por tudo.

E aos demais que contribuíram de alguma maneira com este
trabalho, obrigada!

RESUMO

A pele é um tecido exposto diretamente a fatores externos químicos e físicos que levam ao desenvolvimento de diferentes lesões cutâneas. A proteção deste tecido contra a radiação mais penetrante e deletéria, como o caso da irradiação ultravioleta do tipo A (UVA), tem sido bastante explorada na pesquisa. Além de estudos voltados a aplicações terapêuticas por meio de regeneração tecidual, formulações alternativas a base de extratos de produtos naturais surgem para auxiliar de forma preventiva o desenvolvimento de lesões de pele. A própolis vermelha é um exemplo dentre vários produtos que tem sido utilizado devido a suas propriedades biológicas antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, angiogênicas e proliferativas. Neste contexto, é importante que os modelos de estudo que mimetizam a organização tecidual do tegumento *in vitro* se aproximem cada vez mais das condições *in vivo*. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos na viabilidade de células e morte celular programada em modelos de cultura 2D e 3D de linhagens de queratinócitos de pele (HaCat) e células-tronco mesenquimais (CTMs) previamente tratadas, após exposição a extratos da própolis vermelha e à irradiação ultravioleta tipo A. Foi avaliado o efeito protetor de extratos da própolis vermelha brasileira contra a irradiação UVA (3,4Jcm³) bem como a sua fototoxicidade em concentrações de 10, 25 e 100µg/mL durante 2 horas de tratamento. Os resultados evidenciaram que somente a concentração 100µg/mL testada apresentou efeito citotóxico para as células HaCats e CTMs. A viabilidade celular se manteve acima de 80% nas concentrações mais baixas (até 25 µg/mL) para as células testadas, em todos os períodos (24h, 72h e 168h) de análise. As culturas 3D de ambas as linhagens apresentaram uma resistência maior à morte celular em todas as condições testadas quando comparadas com as culturas 2D e aos controles. Os resultados fornecem evidências de que o uso dos extratos da própolis vermelha favorece as linhagens e modelos testados. É possível que o aumento da porcentagem de células que sobrevivem após a exposição à irradiação UVA neste estudo se reflète a indução da proliferação celular, já que o número de células apoptóticas mostrou-se muito pequena e sua diminuição não causaria alteração significativa o suficiente para ser detectado por ensaio de indução apoptótica. Os ensaios evidenciaram uma resposta adaptativa dessas células quando expostas às dosagens baixas (até 25 µg/mL) de irradiação UVA, além de demonstrar o efeito protetivo da própolis quando irradiadas. Esses resultados corroboram com análises anteriores que já vem sendo avaliadas por nosso grupo de pesquisa, os quais sugerem que a utilização de extratos da própolis vermelha em baixas

concentrações ($< 25 \mu\text{g/mL}$) é segura para ser aplicada em diferentes linhagens celulares. Estudos *in vitro* com modelos tridimensionais pré-tratados buscam um melhor entendimento das relações celulares e uma perspectiva de apoio à medicina reparadora/reconstrutiva, visando a recuperação de pacientes que sofreram lesões de pele ou queimaduras.

Palavras-chave: Esferóides, feridas de pele, própolis vermelha, irradiação ultravioleta, queratinócitos, células-tronco, apoptose, fototoxicidade.

ABSTRACT

The skin is a tissue directly exposed to external chemical and physical factors that lead to the development of different skin lesions. The protection of this tissue against the most penetrating and harmful radiation, such as type A ultraviolet radiation (UVA), has been extensively explored in research. In addition to studies focused on therapeutic applications through tissue regeneration, alternative formulations based on extracts of natural products have emerged to prevent the development of skin lesions. Red propolis is an example of several products that have been used due to their antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, angiogenic and proliferative biological properties. In this context, it is important that study models that mimic the tissue organization of the in vitro tegument increasingly come closer to in vivo conditions. The objective of this study was to evaluate the effects on cell viability and programmed cell death in 2D and 3D culture models of previously treated skin keratinocyte lines (HaCat) and mesenchymal stem cells (MSCs), after exposure to red propolis extracts, and type A ultraviolet irradiation. The protective effect of Brazilian red propolis extracts against UVA irradiation (3.4Jcm^2) was evaluated, as well as their phototoxicity at concentrations of 10, 25 and $100\mu\text{g/mL}$ during 2 hours of treatment. The results showed that only the $100\mu\text{g/mL}$ concentration tested had a cytotoxic effect on HaCats and MSC cells. Cell viability remained above 80% at the lowest concentrations (up to $25\mu\text{g/mL}$) for the cells tested, in all periods (24h, 72h and 168h) of analysis. 3D cultures of both strains showed greater resistance to cell death in all conditions tested when compared to 2D cultures and controls. The results provide evidence that the use of red propolis extracts favors the strains and models tested. It is possible that the increase in the percentage of cells that survive after exposure to UVA irradiation in this study reflects the induction of cell proliferation, as the number of apoptotic cells was shown to be very small and its decrease would not cause a change significant enough to be detected by apoptotic induction assay. The tests showed an adaptive response of these cells when exposed to low doses (up to $25\mu\text{g/mL}$) of UVA irradiation, in addition to demonstrating the protective effect of propolis when irradiated. These results corroborate previous analyzes that have already been evaluated by our research group, which suggest that the use of red propolis extracts in low concentrations ($< 25\mu\text{g/mL}$) is safe to be applied to different cell lines. In vitro studies with pre-treated three-dimensional models seek a better understanding of cellular relationships and a perspective to support

reparative/reconstructive medicine, aiming at the recovery of patients who have suffered skin injuries or burns.

Keywords: Spheroids, skin wounds, red propolis, ultraviolet irradiation, keratinocytes, stem cells, apoptosis, phototoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
7AAD	7-Aminoactinomicina D
ANOVA	Análise de variância
APC	Allophycocyanin
ATCC	American Type Culture Collection
ADSC	Adipose Derived Stem Cells (Células-tronco derivadas de adipócitos)
Bax/Bcl-2	Proteína X associada à Bcl-2
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CD	Cluster Designation
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPD	Dímeros de Ciclobutano Pirimidina
CTDA	Células Tronco Derivadas de tecido Adiposo
CTM	Células Tronco Mesenquimais
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Meio de <i>Eagle</i> Modificado por Dulbecco)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate
GvHD	<i>Graft versus Host Disease</i> (doença do enxerto contra o hospedeiro)

H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HaCat	Queratinócitos Humanos Imortalizados
ICH	International Council for Harmonisation
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Irr	Irradiação
LN	Laminina
MEC	Matriz Extracelular
MHCII	<i>Major Histocompatibility Complex class II</i> (Complexo principal de Histocompatibilidade classe II)
MMP	Metaloproteinase de Matriz
NF-κB	Fator nuclear kappa B
O ₂ •	Ânion Superóxido
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
OH•	Radical Hidroxila
PBS	Phosphate-buffered saline (Tampão fosfato-salino)
PE	Phycoerythrin
PS	Penicilin/Streptomycin (Penicilina / Estreptomicina)
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF-β	Transforming growth factor-β (fator de crescimento transformador-β)
UV/ UVA-B	Ultravioleta/ Ultravioleta Tipo A/ Ultravioleta Tipo B
VN	Vitronectina
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfohenyl)-2 <i>H</i> -Tetrazolium-5-Carboxanilide

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Espectro solar e irradiância em um dia claro.
- Figura 2 Representação esquemática do espectro eletromagnético da luz, enfatizando as frequências da radiação ultravioleta (UVR) e seus efeitos na pele humana. Quanto menor o comprimento de onda da radiação, maior o potencial de danos biológicos. Nota: UVA = ultravioleta A, UVB = ultravioleta B, UVC = ultravioleta C. Os filtros solares são ativos contra a radiação UVA e UVB.
- Figura 3 Representação esquemática da estrutura da pele humana. Profundidades típicas de penetração óptica para comprimentos de onda específicos nas bandas UVA e UVB. Adaptado de: Delgado *et al.* 2006.
- Figura 4 Danos às células da pele causados pela radiação UV.
- Figura 5 Esquema de reação fototóxica de produtos químicos ativados por luzes UV
- Figura 6 Produção de agarose micromoldada
- Figura 7 Esquema representando a etapa de semeadura das células ao micromolde.
- Figura 8 Morfologia celular das CTDAs.
- Figura 9 Análise por citometria de fluxo de células-tronco derivadas do tecido adiposo de 2 pacientes
- Figura 10 Diferenciação das células tronco derivadas do tecido adiposo (CTDA) – Linhagem 1
- Figura 11 Diferenciação das células tronco derivadas do tecido adiposo (CTDA) - Linhagem 2
- Figura 12 Imagens microscópicas da produção de esferoides onde: (A) Agarose micromoldada antes do plaqueamento e (B) moldes de agarose recém semeados com células.

- Figura 13 Análise morfológica dos esferoides após 24 horas (A), 48 horas (B) e, 72 horas (C) do plaqueamento das células nos moldes de microagarose.
- Figura 14 Esferoides já formados após 72 horas de cultivo. A- esferoides em suspensão prontos para serem visualizados; B- microscopia de fluorescência marcado com Hoescht 33342.
- Figura 15 Esferoides formados por células HaCat. A- microfotografia do esferoide sem o uso de corantes. B- microfotografia após coloração por DAPI.
- Figura 16 A sensibilidade de células HaCat e células tronco mesenquimais à irradiação utilizada no ensaio de validação do Teste de Fototoxicidade.
- Figura 17 Efeitos de extrato de própolis na linhagem Hacat.
- Figura 18 Efeitos de extrato de própolis na linhagem CTDA.
- Figura 19 Imagens representativas das análises de apoptose e necrose feitas utilizando Anexina V e Iodeto de Propídeo em citometria de fluxo com as linhagens Hacat e CTDA.
- Figura 20 Efeitos de extrato de própolis na linhagem Hacat com indução de apoptose e necrose celular.
- Figura 21 Efeitos de extrato de própolis na linhagem CTDA com indução de apoptose e necrose celular.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Dados obtidos por ESI(+)-MS/MS dos principais compostos encontrados na própolis vermelha de Sergipe.
- Tabela 2 Porcentagens de marcação de antígenos com valores positivos de linhagens de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo analisadas por citometria de fluxo.
- Tabela 3 Critério de classificação de fototoxicidade proposta pela OECD.
- Tabela 4 Valores da Clorpromazina testadas nas linhagens de CTDA e HaCat.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJTIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E SEUS EFEITOS SOBRE A PELE	22
3.2	EFEITOS DA FOTOTOXICIDADE E MECANISMOS DE PROTEÇÃO	28
3.3	PRÓPOLIS VERMELHA	32
3.4	MODELO CELULAR <i>IN VITRO</i> 3D A PARTIR DE ESFEROIDES	36
3.4.1	CELULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E REGENERAÇÃO TECIDUAL	39
3.4.2	CULTIVO DE QUERATINOCITOS DA PELE E INTERAÇÃO COM RADIAÇÃO UV	42
4	METODOLOGIA	45
4.1	PROCESSAMENTO DA PRÓPOLIS VERMELHA	45
4.2	OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	45
4.2.1	Obtenção de células-tronco de tecido adiposo	45
4.3	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	45
4.3.1	Análise morfológica das culturas celulares	45
4.3.2	Análise imunofenotípica das células cultivadas	45
4.3.3	Diferenciação celular <i>in vitro</i>	46
4.3.3.1	<i>Diferenciação osteogênica</i>	46

4.3.3.2	<i>Diferenciação adipogênica</i>	46
4.3.3.3	<i>Diferenciação condrogênica</i>	46
4.4	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS MODELOS 2D E 3D.....	47
4.4.1	Cultura das células e produção dos esferoides	47
4.4.1.1	<i>Cultura 2D</i>	47
4.4.1.2	<i>Cultura 3D</i>	47
4.4.2	Irradiação UVA <i>in vitro</i>	48
4.4.3	Teste de fototoxicidade da própolis vermelha <i>in vitro</i>	49
4.4.4	Ensaio de viabilidade/proliferação celular.....	49
4.4.5	Ensaio de avaliação de apoptose celular	49
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5	RESULTADOS	50
5.1	ANÁLISE MORFOLÓGICA	50
5.2.	ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA.....	51
5.3	DIFERENCIAÇÃO CELULAR IN VITRO	53
5.4	CULTIVO 3D	56
5.5	FOTOTOXICIDADE IN VITRO.....	58
5.6	IRRADIAÇÃO UV E VIABILIDADE CELULAR	60
5.7	AVALIAÇÃO DE APOPTOSE CELULAR.....	64
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÃO	75
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	77
9	REFERÊNCIAS	78

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo que serve como uma importante interface ambiental, fornecendo uma proteção que é crucial para a homeostase. Este tecido é um dos principais alvos de agressão tóxica por um amplo espectro de agentes físicos como a radiação ultravioleta UV, e químicos, que são capazes de alterar sua estrutura e função. Devido ao aumento da incidência da radiação ultravioleta na superfície da Terra causada pelo esgotamento do ozônio estratosférico, a pele humana se torna mais suscetível à danos, portanto, a exposição aos raios UV danifica o estrato córneo da pele, reduz sua capacidade protetora e leva à perda de água tecidual. Grandes doses de radiação UV podem penetrar profundamente na derme, contribuindo para a degeneração do colágeno, promovendo o envelhecimento prematuro da pele, que é denominado como “fotoenvelhecimento”, bem como acelera a formação de rugas, apresentando alterações teciduais como eritema, queimaduras solares e até mesmo lesões pré-cancerosas e cancerígenas. A radiação UVB afeta principalmente a epiderme; quando é excessiva a exposição, causa vermelhidão e redução da elasticidade da pele, além de promover a formação de rugas. A radiação UVA pode penetrar profundamente na derme e danificar o DNA, causando o fotoenvelhecimento. Estudos *in vitro* mostraram que o fotoenvelhecimento da pele é caracterizado tanto por alterações epidérmicas mínimas quanto por alterações dérmicas importantes, indicando que o UVA desempenha um papel fundamental no fotoenvelhecimento (He et al., 2008; Quan et al., 2009; Scharffetter-Kochanek et al., 2000; Kwon et al., 2008).

Muitos poluentes ambientais são oxidantes ou catalisam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), direta ou indiretamente. Acredita-se que as EROs ativem a sinalização proliferativa e de sobrevivência celular que podem alterar as vias apoptóticas e estar envolvidos na patogênese de vários distúrbios da pele, incluindo doenças de fotossensibilidade e alguns tipos de malignidade cutânea.

A atividade *in vitro* de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTDAs) contra os efeitos do fotoenvelhecimento tem sido bastante abordada na literatura, graças à sua atividade migratória e ações parácrinas. Estas atuam contra o fotoenvelhecimento da pele *in vitro* via ativação da proliferação de fibroblastos dérmicos, efeito antioxidante e redução de metaloproteinases de matriz (MMPs). CTDAs melhoram a adipogênese, vascularização e produção de fatores de crescimento,

sendo utilizadas para tratamento de cicatrizes e feridas (Gentile e Garcovich, 2021; Han et al., 2015; Spiekman et al., 2017; Wang et al., 2019).

Acredita-se que produtos naturais possuem diversas ações terapêuticas que podem ser utilizadas como tratamentos e proteção da pele contra fatores estressantes, dentre eles a irradiação ultravioleta que está constantemente em contato com a pele. A fim de melhorar o entendimento das interações e alterações celulares e moleculares que ocorrem na epiderme e derme, a biotecnologia visa desenvolver substitutos e/ou soluções para diversos problemas e doenças que acometem a pele.

Os produtos de origem natural são bastante explorados por diferentes culturas para diversas finalidades, incluindo a proteção da pele contra a radiação solar (Bickers e Athar, 2006; Chiari-Andréo, 2020). As propriedades da própolis têm sido usadas para prevenção e terapia de distintas patologias, sendo a aplicação tópica uma alternativa bastante explorada (Faria et al., 2022). O tipo de própolis mais comercializado atualmente é conhecido como própolis verde e tem sido amplamente estudado e utilizado em diversos alimentos e bebidas. Entretanto, a própolis vermelha mostrou-se uma importante fonte de investigação por grupos de pesquisa nacionais e internacionais por apresentar diversas ações biológicas e terapêuticas. A própolis vermelha encontrada no nordeste brasileiro é promissora para aplicação tópica quando associada a curativos e tem sido reportada como um composto com propriedades regeneradoras a ser explorado (Garcia et al., 2021; Picolotto et al., 2019).

Outro gargalo a ser investigado pela biotecnologia são os sistemas e modelos para testagem de produtos naturais e sintéticos. A área cosmética apresenta seu portfólio regulamentado em testes *in vitro*, porém a farmacologia ainda mantém modelos *in vivo* para diversas aplicações. O cultivo 3D é uma das metodologias promissoras para preencher uma lacuna entre o cultivo *in vitro* e o uso de animais para determinados testes (Rimann e Graf-Hausner, 2012; Kunz-schughart. et al., 2004). Em culturas de células 2D, as interações célula-célula e célula-matriz extracelular são reduzidas e o nível de capacidade de resposta celular é limitado (Do Amaral e Machado-Santelli., 2011; Lee et al., 2009). Além disso, o ambiente de cultura celular pode afetar o fenótipo das células e, portanto, afetar a resposta celular a substâncias adicionadas, por exemplo, medicamentos (Goodman, Ng e Pun, 2008). Todas as células do corpo vivem em ambiente 3D, o que é crucial para o seu metabolismo e crescimento. O fenótipo e as

funções de cada célula são altamente dependentes de interações elaboradas com células vizinhas, a matriz extracelular (MEC) e proteínas (Lee et al., 2009). Essas interações célula-célula e célula-ECM diferem de culturas 2D para 3D e também entre camadas celulares em estruturas esferóides, e isso pode afetar os resultados de citotoxicidade (Moshksayan et al., 2018). Por estas razões, testar a toxicidade de materiais e substâncias em culturas de células 2D não é exatamente preditivo do que se poderia esperar no corpo (Lee et al., 2009; Edmondson et al., 2014). As culturas de células 3D mimetizam com mais precisão o microambiente celular natural. A morfologia e a fisiologia das células em culturas 3D são diferentes das células em culturas 2D, mostrando respostas que correspondem, em alguns aspectos, mais ao comportamento *in vivo* (Edmondson et al., 2014). Acredita-se que a formação dos esferóides mimetize o comportamento dos órgãos de forma mais eficaz que a cultura bidimensional convencional. Esferóides contêm células expostas à superfície e células profundamente infiltradas na formação das estruturas 3D; células proliferando e células não proliferativas; e células bem oxigenadas e hipóxicas (Frieboes et al., 2006).

Estratégias regenerativas e protetivas contra o fotoenvelhecimento da pele são o objetivo para o desenvolvimento de novas biotecnologias autólogas que envolvam produtos naturais com propriedades antioxidativas em cultivos *in vitro* ou por regeneração *in vivo* e bioestimulação. Assim, o presente estudo buscou testar e avaliar os efeitos da viabilidade celular e morte celular programada após exposição a extratos de própolis vermelha e irradiação ultravioleta tipo A em modelos de cultura 2D e 3D em linhagens humanas de queratinócitos de pele (HaCats) e células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTDAs).

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos na viabilidade de células e morte celular programada em modelos de cultura 2D e 3D de linhagens de queratinócitos de pele (HaCat) e células-tronco mesenquimais (CTDA) pré-tratados com extratos da própolis vermelha e posterior irradiação ultravioleta tipo A (UVA) de baixa dosagem.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar culturas primárias de células-tronco mesenquimais a partir de material obtido de cirurgias de lipoaspiração;
- Caracterizar e confirmar o potencial de diferenciação das linhagens de células tronco coletadas;
- Avaliar a viabilidade celular de culturas 2D e 3D de células HaCat e CTDA após exposição a extrato da própolis vermelha;
- Avaliar a morte celular programada em culturas 2D e 3D de células HaCat e CTDA após exposição a extrato da própolis vermelha;
- Testar a fototoxicidade em modelos *in vitro* 2D e 3D nas linhagens HaCat e CTDA na presença e ausência de luz UVA após pré-tratamento com extratos de própolis vermelha.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E SEUS EFEITOS SOBRE A PELE

A descoberta da radiação ultravioleta ocorreu em 1801 por Ritter (Ritter, 1801) e sete anos mais tarde, Willan descreveu a sensibilidade à luz aos tecidos sob o termo *eczema solare* (Willan, 1808). A observação experimental de que algum componente além do calor da luz solar afeta a pele foi feita pela primeira vez em 1820 por um médico inglês, Sir Everard Home (Home, 1820). Quando a queimadura solar da pele normal mostrou ser induzida pela radiação ultravioleta (UV), os pesquisadores tenderam a atribuir todos os efeitos anormais à radiação 'química' (ou seja, UV) (Charcot, 1858; Hammer, 1891; Widmark, 1889).

Os estilos de vida mudaram nas últimas décadas e a busca por um bronzeado saudável tem sido associado a beleza, seja por exposição solar natural ou lâmpadas artificiais. Com isso, percebe-se um aumento do tempo de exposição ao sol durante diversos períodos do dia. Embora a radiação UV ambiental seja altamente variável e difícil de medir, uma redução sistemática do ozônio foi registrada em muitas partes do mundo. Estima-se, por exemplo, que a radiação UV no final da década de 1990 em relação à década de 1970 aumentou 7%, sendo que 4% nas latitudes médias do Hemisfério Norte, e em 130% e 22 % na Antártida e no Ártico (Mandronich et al., 1998).

A luz do sol que chega à superfície terrestre é composto de um espectro de luzes do visível (400 - 700 nm de comprimento de onda) às regiões ultravioletas (290 - 400 nm) juntamente com ondas de energia na região do infravermelho (700 - 2.400 nm). A luz solar real não é composta por uma intensidade consistente, mas variável de ondas de energia (6-7% de luz ultravioleta; cerca de 42% de luz visível e 51% próximo ao infravermelho) sendo que a irradiância solar total é de 1 quilowatt/m², como pode ser mostrado abaixo (Figura 1) (Kim et al., 2015).

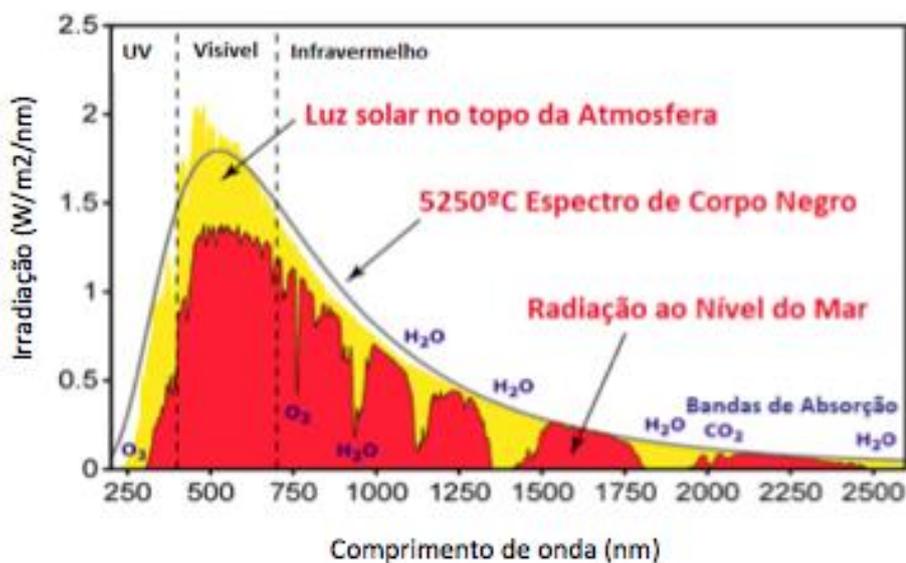


Figura 1: Espectro solar e irradiância em um dia claro. Adaptado de: site de Newport, <http://www.newport.com>. Fonte: Kim et al. 2015.

A energia e a extensão da penetração na pele deste espectro eletromagnético também variam dependendo do comprimento de onda da luz recebida. Quanto menor o comprimento de onda, mais forte se torna a energia da luz incidente. Por outro lado, quanto maior o comprimento de onda, mais profundamente a luz penetra na pele. Assim, UVA e UVB, luzes de menor comprimento de onda na luz solar incidente são as principais responsáveis pela manifestação da fototoxicidade. Embora sejam menos implicados em danos agudos à pele (como eritema induzido por UVB), os raios UVA penetram mais profundamente na matriz dérmica dos tecidos da pele, enquanto a irradiação UVB só atinge a camada epidérmica (Figura 2). Os raios UVA são, portanto, a fonte de efeitos deletérios crônicos na pele. Além disso, o UVB perde sua energia durante a viagem pela atmosfera e ao nível do mar é 100 vezes menor que o do UVA (Gonçalo, 2011; Urbach, 1992).

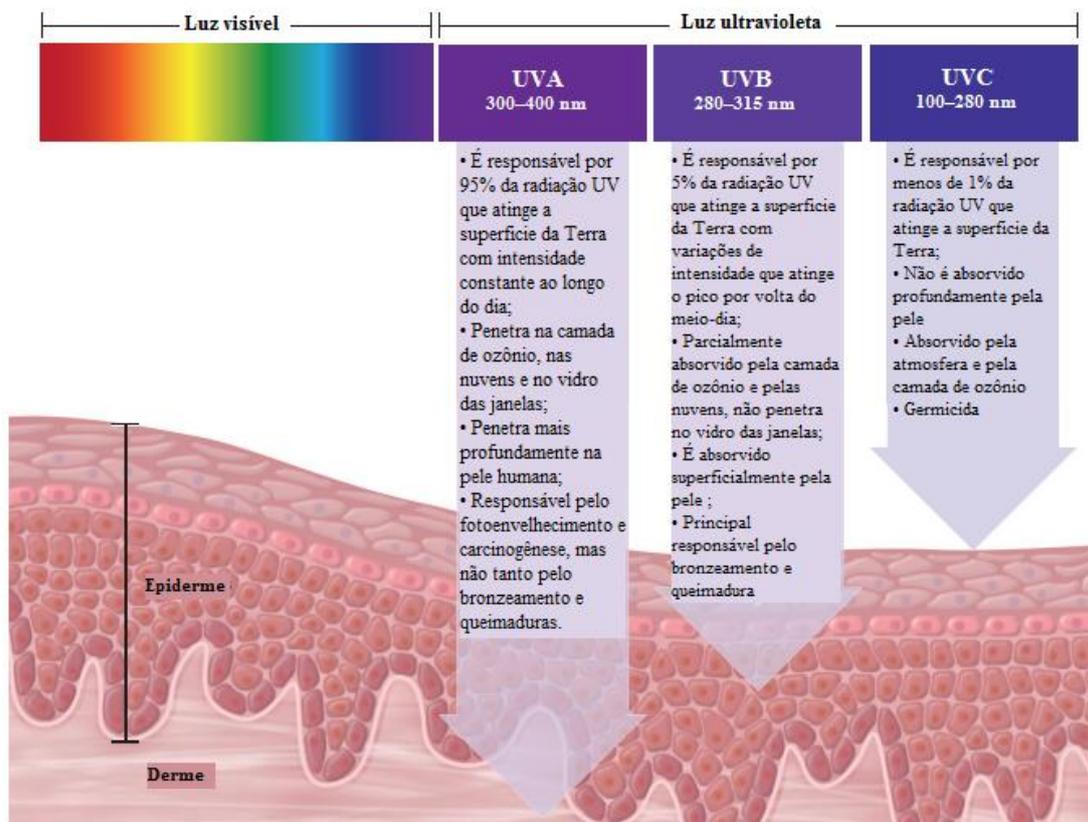


Figura 2: Representação esquemática do espectro eletromagnético da luz, enfatizando as frequências da radiação ultravioleta (UVR) e seus efeitos na pele humana. Quanto menor o comprimento de onda da radiação, maior o potencial de danos biológicos. Nota: UVA = ultravioleta A, UVB = ultravioleta B, UVC = ultravioleta C. Os filtros solares são ativos contra a radiação UVA e UVB. Adaptado de: Sander *et al.*, 2020.

A radiação ultravioleta (UV) da luz solar está associada à patogênese das células da queimadura solar, fotoenvelhecimento e inflamação aguda no tecido da pele (Serafini *et al.*, 2014). No entanto, o restante da radiação UV, parte da UVB e toda a UVA, é responsável por múltiplas doenças de pele (Kimura, 2014). A radiação UV é um agente oxidante que causa danos significativos aos componentes celulares e que leva ao fotoenvelhecimento (Narayanapillai *et al.*, 2012). Além disso, pode causar queimaduras solares, envelhecimento da pele, supressão imunológica local e sistêmica, muitos distúrbios inflamatórios cutâneos e fotocarcinogênese (Li *et al.*, 2007; Shindo *et al.*, 1993). Estudos apontam a indução de vias de transdução de sinal que levam à transativação de metaloproteinases de matriz (MMPs), que são enzimas responsáveis pela degradação de proteínas de matriz extracelular (Fisher *et al.*, 2002). A MMP-1, em particular, é conhecida por contribuir principalmente no processo de degradação do

colágeno mediado por UV, causando a formação de rugas na pele e envelhecimento da mesma (Lahmann et al. 2001; Talwar et al., 1995; Fisher et al., 1997).

A pele e os olhos são os órgãos mais expostos à radiação UV e, portanto, os mais lesados. A pele consiste em três camadas principais: epiderme, derme e tecido subcutâneo. Uma representação da pele humana, suas diferentes camadas e suas correspondentes espessuras são apresentadas na figura 3 (Delgado et al. 2006).

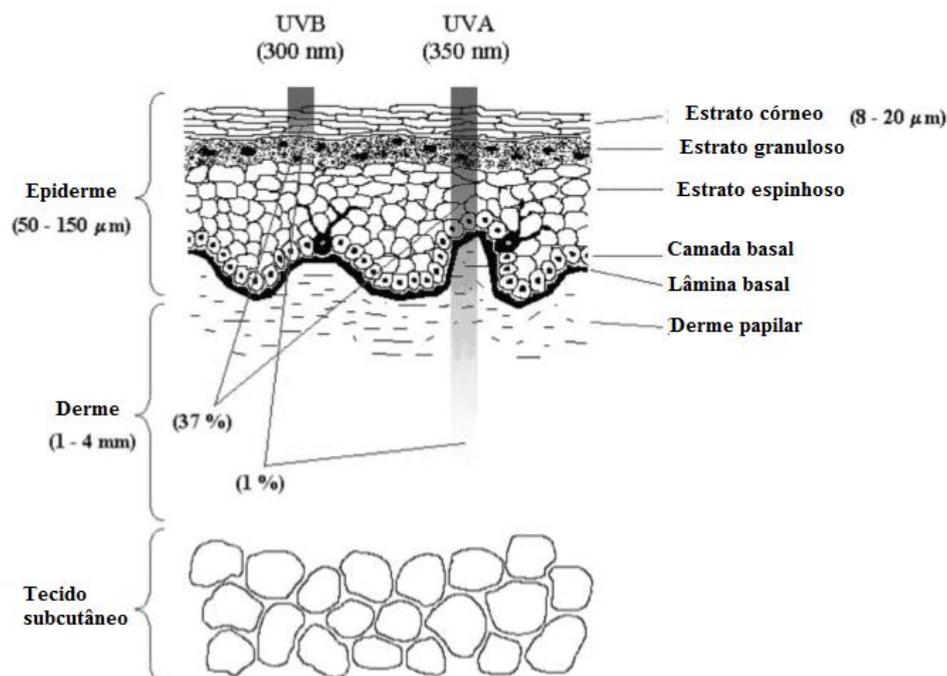


Figura 3: Representação esquemática da estrutura da pele humana. Profundidades típicas de penetração óptica para comprimentos de onda específicos nas bandas UVA e UVB. Adaptado de: Delgado *et al.* 2006.

A radiação UVA, causa danos às moléculas de DNA pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo radicais de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete. Ao ser absorvido diretamente pelo DNA, gerando fotoprodutos de DNA (Vile e Tyrrell 1995; Fisher et al. 2002), resulta em quebras de fita simples e subsequente formação de pirimidinas oxidadas, purinas e dímeros de ciclobutano pirimidina que são consideradas a ameaça mais perigosa para a célula. Se não for reparado ou mal reparado, pode levar a mutações ou rearranjos cromossômicos e, eventualmente, morte celular. A radiação UVA também induz respostas inflamatórias através da ativação do fator pró-inflamatório NF-κB (factor nuclear kappa B) e danifica seriamente os queratinócitos (Kvam e Tyrrell 1997; Douki et al. 2003;

Ikehata et al, 2007; Pierce et al., 2001; Sander et al. 2004; Nash et al. 2006; Li et al., 2007; Krutmann et al., 2021; Shindo et al., 1993). Esses processos fotossensibilizados por UVA têm sido associados à apoptose e ao dano de proteínas celulares, lipídios e polissacarídeos, etambém pode indiretamente causar danos estruturais ao DNA (Syed et al., 2006; Andreassi e Andreassi, 2004; Pillai et al., 2005).

A radiação UVB, variando de 280 a 320 nm (Helbling et al. 1992), atua diretamente no DNA, induzindo danos por reações de dimerização entre bases de pirimidina adjacentes, resultando na formação de Dímeros de Ciclobutano Pirimidina (CPDs) e (6-4) fotoprodutos (Berneburg e Krutmann 2000; Fisher et al. 2002; Douki et al. 2003; Jans et al. 2005). A radiação UVB também oxida os resíduos de guanina, resultando na formação de 8-oxo-7,8-dihidro20-desoxiguanosina no DNA, uma molécula envolvida na carcinogênese (Cooke et al. 2010; Afaq 2011).

A radiação UVA e UVB induzem danos à pele por mecanismos diferentes (Setlow et al. 1993; Arthey e Clarke 1995; Ezzedine et al. 2007; Neale et al. 2007; Brenner e Hearing 2008; Rigel 2008). Dependendo da faixa de comprimento de onda da luz que incide sobre a pele, os danos podem atingir profundidades diferentes, mais superficiais sobre a epiderme ou mais profundas sobre a derme (Figura 4).

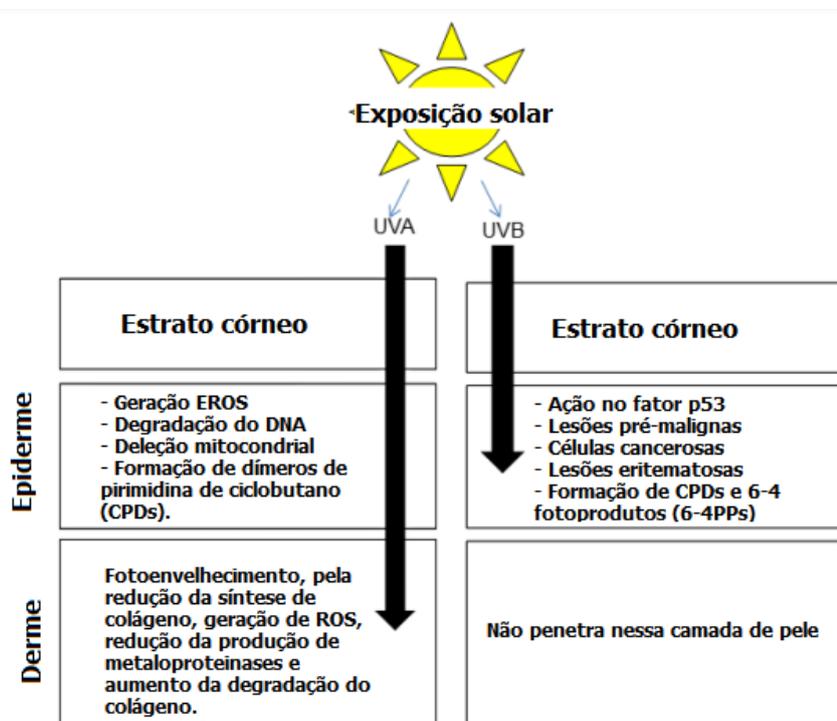


Figura 4: Danos às células da pele causados pela radiação UV. Adaptado de: Chiari-Andréo et al., 2020

A apoptose é uma forma fisiológica regulada de morte celular, que ocorre sob uma variedade de condições fisiológicas e de desenvolvimento e em resposta a muitos agentes citotóxicos (Pustisek e Situm, 2011). A irradiação UV demonstrou ser um indutor particularmente potente de apoptose. A apoptose dos queratinócitos na epiderme manifesta-se na forma de inflamações de queimadura solar (Danno e Horio, 1987; Ziegler et al., 1994). Embora a apoptose seja um processo complexo, este tipo de morte celular é desencadeada por uma série de características bem definidas, incluindo alterações morfológicas celulares, condensação da cromatina, clivagem do DNA internucleossomal, ativação de uma família de proteases aspárticas de cisteína (caspases) e desregulação Bax/Bcl-2 (Roberston and Orrenius, 2000).

Devido aos efeitos deletérios das EROs na pele, muitos pesquisadores têm se esforçado para identificar e avaliar antioxidantes, como a própolis, para enriquecer o sistema de proteção cutâneo endógeno a fim de prevenir e/ou tratar os danos cutâneos induzidos pela irradiação UV. A inibição do estresse oxidativo induzido por UVA pode contribuir para a prevenção de doenças de pele. Nos últimos anos, muita atenção se concentrou em antioxidantes de fontes naturais, especialmente flavonoides e outros compostos fenólicos e polifenóis dietéticos na tentativa de reparar a pele foto-danificada como forma de prevenir a degeneração em doenças de pele induzidas pelo sol (Bonina et al., 1996; Syed et al., 2006; Atoui et al., 2005). Entre a radiação UV irradiada para a superfície terrestre, o UVB representa apenas 5%, mas o UVB causa 800 a 1000 vezes mais danos à pele do que a mesma dose de UVA. Os queratinócitos, como células-alvo UVB, podem receber 95% da radiação e assim induzir o fotoenvelhecimento (Krutmann et al., 2021).

A pele é rotineiramente e patologicamente exposta a estresse oxidativo e inflamação necessitando de mecanismos de reparo e proteção. A pele é equipada com um elaborado sistema de substâncias antioxidantes e enzimas, que mantém o equilíbrio entre o estresse oxidativo e a defesa antioxidante e mantém as células afastadas dos danos causados pelo estresse oxidativo. Os queratinócitos desempenham um papel importante na resposta inflamatória à irradiação UV da pele (Narayanapillai et al., 2012; Martinez et al., 2015; Svobodova et al., 2007; Li et al., 2007; He et al., 2016).

No Brasil, embora os casos de câncer de pele não melanoma representem 31,3% de todos os tumores malignos notificados, o melanoma representa apenas 3% das

neoplasias malignas, sendo o tipo mais grave, devido à sua alta taxa metastática. Em 2022, foram considerados cerca de 625.000 novos casos de câncer, incluindo 175.000 casos de câncer de pele não melanoma (INCA 2022).

3.2 EFEITOS DA FOTOTOXICIDADE E MECANISMOS DE PROTEÇÃO

O ecossistema terrestre está constantemente exposto à irradiação da luz solar. Assim, estruturas como a pele dos animais, que delimita o interior ao exterior do corpo, é a mais afetada pela exposição a luz solar. O envelhecimento da pele é um bioprocessos complicado que ocorre ao longo do tempo como resultado do envelhecimento intrínseco ou geneticamente programado, bem como do envelhecimento externo induzido por aspectos ambientais. Exceto pelo processo de envelhecimento interno, a superfície corporal exposta ao sol, incluindo o dorso das mãos, pescoço, antebraços e rosto, apresenta efeitos destrutivos adicionais, principalmente devido à exposição à luz ultravioleta. O fotoenvelhecimento sobrepõe-se ao envelhecimento intrínseco e é definido como as influências da radiação UV prolongada e das lesões causadas pela luz solar sobrepostas à pele inerentemente envelhecida. A radiação UV é um acelerador do envelhecimento cutâneo e o fotodano é cumulativo ao longo de toda a vida de um indivíduo, pois danos causados na adolescência se acumulam e se manifestam no futuro (Cabral et al., 2013; McCullough e Kelly, 2006; Rabe et al., 2006; Nichols e Katiyar, 2010). De fato, inúmeras alterações podem se desenvolver na superfície da pele induzidas pela luz solar, como erupção cutânea, hiperpigmentação, fotoenvelhecimento, queimaduras e câncer de pele, que são os problemas mais comumente observados associados ao tegumento (Freeman e Gordon, 2006).

Muitos tipos de drogas foram relatados por induzir fototoxicidade da pele, incluindo antipsicóticos, psoraleno usado para fototerapia, tranquilizantes e agentes antimicrobianos. Os medicamentos dermatológicos também têm uma preocupação com a fototoxicidade, mas uma certa classe de medicamentos aumenta as respostas fototóxicas como seu modo de ação farmacológica, como pode ser exemplificado pela terapia fotodinâmica, como o ácido 5-aminolevulínico e o 8-metoxipsoraleno (Shimoda et al., 1993; Gonçalo 2011). Além das drogas, agentes químicos endógenos (protoporfirina), protetores solares (ácido 4-aminobenzóico e seus ésteres) ou agentes

ambientais (antraceno em alcatrão de carvão) possuem potencial fototóxico (Chignell et al., 1985).

A irradiação UV ou fontes de luz artificial pode resultar na fotodecomposição de muitos medicamentos e a fotoestabilidade representa um grande obstáculo para garantir a vida útil adequada dos medicamentos. Durante a fotodecomposição, as moléculas de drogas fotoexcitadas podem se transformar em compostos tóxicos ou produzir EROs que podem, em última análise, gerar toxicidade às células da pele (Tønnesen, 2011).

A fototoxicidade se desenvolve quando os produtos químicos fotoativos ou fotorreativos entram em contato com o organismo ativados por luzes UV, são absorvidos pela pele e ativados pela luz solar, cujos produtos têm potencial citotóxico contra o tecido cutâneo (Figura 5). A fotorreatividade é exemplificada pela foto-adição e produção de EROs. Em consequência final, as reações derivadas da irradiação solar UV causam citotoxicidade contra as células da pele (Kim et al., 2015). A fototoxicidade também pode ser manifestada por substâncias químicas absorvidas sistemicamente que chegam à pele e são ativadas pela luz solar incidente, como pode ser evidentemente exemplificado por antibióticos de fluoroquinolona administrados sistemicamente (Boudon et al, 2014).

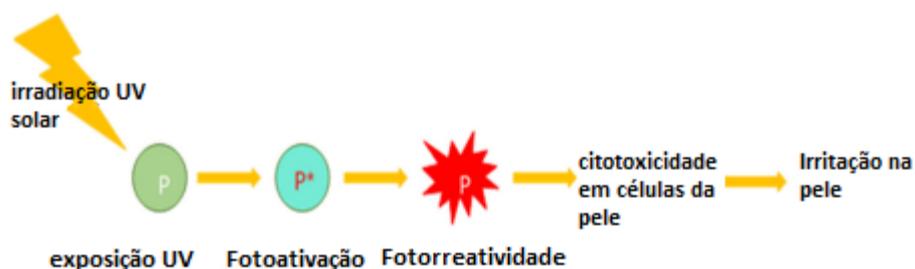


Figura 5: Esquema de reação fototóxica de produtos químicos ativados por luzes UV. Adaptado de Kim et al, 2015.

A reação fototóxica está ligada a queimaduras solares exageradas. Acredita-se que o espectro de ação da toxicidade esteja incluído na faixa de comprimento de onda do UVA (Christ e Lehnert, 1990). Como a absorção de UV é um pré-requisito para a reação fotoquímica e, portanto, para a manifestação de fototoxicidade, os produtos químicos que não absorvem UV dentro da faixa de luz solar incidente natural (280~700 nm) não causam fototoxicidade (ICH, 2014; OECD, 1981). Produtos químicos

fotoativos absorvem fótons e a energia absorvida resulta em alterações moleculares do próprio produto químico ou gera EROs que podem causar toxicidade aos tecidos-alvo (Chignell et al., 1985).

A consciência dos efeitos nocivos da exposição ao sol resultou no aumento do uso de protetores solares, uma vez que esses produtos têm sido amplamente recomendados como protetores contra queimaduras solares, fotoenvelhecimento e câncer de pele (Gustavsson Gonzalez et al. 2002; Hughes & Stone 2007, Iannacone, Hughes e Green, 2014).

Os filtros solares e os fotoprotetores utilizados são classificados conforme o tipo de proteção que oferecem, com bloqueio físico ou absorção química da radiação UV. Assim, pode-se definir os fotoprotetores como agentes que atenuam o efeito deletério por mecanismo de absorção, reflexão ou dispersão da radiação e, possivelmente, prevenção do fotoenvelhecimento da pele exposta. São considerados fenômenos físicos, aqueles que não promovem reação química durante os processos de absorção e reflexão de radiação (Cabral et al., 2013).

Os filtros UV químicos são incorporados aos protetores solares para reduzir o fotoenvelhecimento da pele e prevenir o desenvolvimento de câncer na região (Foley et al. 1993; Marto et al. 2016). Os principais filtros químicos incluem ácido paraminobenzóico, benzofenonas, cinamatos e ácidos benzimidazólicos sulfônicos. (Figura 5). Um exemplo de uma molécula desenvolvida mais recentemente para esta finalidade é bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina (Chatelain & Gabard 2001; Hüglin 2016).

Filtros químicos, como oxibenzona, avobenzona, octocrileno e ecamsule, são compostos aromáticos que absorvem radiação ultravioleta de alta intensidade, resultando em excitação para estados de energia mais elevados. Quando essas moléculas retornam aos seus estados fundamentais, o resultado é a conversão da energia absorvida em comprimentos de onda de energia mais baixa, como a radiação infravermelha, isto é, calor (Gasparro, Mitchnick e Nash, 1998). Os filtros solares físicos, como o dióxido de titânio e o óxido de zinco, refletem ou refratam a radiação ultravioleta para longe da pele; entretanto, estudos experimentais demonstraram que quando o tamanho das partículas é muito pequeno, como nos filtros solares micronizados, o mecanismo de ação é semelhante ao dos filtros químicos. Mais

especificamente, o óxido de zinco micronizado e o dióxido de titânio comportam-se como metais semicondutores, que absorvem a luz ultravioleta na maior parte do espectro eletromagnético (Geoffrey, Mwangi e Maru, 2019).

A utilização de produtos naturais na prevenção e proteção dos danos cutâneos causados pela luz ultravioleta tem ganhado destaque, principalmente no caso de fitoquímicos que apresentam atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, anticancerígena e imunomoduladora, e podem atuar em diferentes processos celulares e mecanismos moleculares (Afaq 2011).

O interesse no uso de metabólitos secundários encontrados em plantas para desenvolver protetores solares é baseado no aumento da resistência à radiação UV das plantas em comparação com células e micro-organismos de mamíferos, sugerindo o efeito fotoprotetor de fitoquímicos. Existem várias classes de metabólitos secundários incluindo alcaloides, flavonoides, carotenóides, isotiocianatos, lignanas, taninos, quinonas, saponinas e metilxantinas, por exemplo, que são produzidos pelas plantas de acordo com sua necessidade, com o estímulo recebido e com as condições de estresse a que são submetidas (Caldwell et al. 1983; Dinkova-Kostova, 2008; Gobbo-Neto & Lopes 2007; Dinkova-Kostova 2008; Solovchenko & Merzlyak 2008; Simões et al. 2017).

O uso de agentes antioxidantes naturais como compostos fenólicos presentes no reino vegetal pode ser uma estratégia eficaz para minimizar os efeitos deletérios das espécies reativas induzidas por UV. Esses compostos têm sido utilizados em formulações cosméticas tópicas pela indústria farmacêutica (Oliveira-Junior et al., 2013), pois os flavonoides são estruturalmente semelhantes aos filtros químicos, o que os torna suscetíveis à absorção de irradiação UV. A associação de produtos naturais com protetores solares pode ampliar os benefícios da proteção solar, oferecendo recursos adicionais que minimizam os danos nos tecidos expostos cronicamente à UV (González et al., 2008).

O teste de fototoxicidade *in vitro* é baseado na comparação da citotoxicidade de um produto químico quando testado na presença e na ausência de exposição a uma dose não citotóxica de luz solar simulada. A citotoxicidade neste teste é expressa como uma redução dependente da concentração da absorção espectrofotométrica quando medida 18-24 horas após o tratamento com o produto químico em estudo e irradiação. É possível que as substâncias identificadas por este teste sejam fototóxicas *in vivo*, após

aplicação sistêmica e distribuição na pele, ou após aplicação tópica (OECD, 2004; Borenfreund e Puerner, 1985).

3.3 PRÓPOLIS VERMELHA

O uso de produtos naturais na prevenção e terapia de diversas condições patológicas tem sido muito explorado como alternativa a medicina alopática. A própolis vermelha é um alvo de diversos estudos no que concerne aos aspectos químicos e biológicos, a fim de comprovar sua eficácia terapêutica. Trata-se de um produto resinoso produzido pelas abelhas do gênero *Apis mellifera*, sendo constituída de exsudados de brotos e botões florais de diversas plantas, principalmente da seiva de uma planta oriunda do nordeste brasileiro, conhecida como *Dalbergia ecastaphyllum*, popularmente conhecida como rabo-de-bugio (Mata, 2015). Na natureza, a própolis é responsável pela proteção da colmeia contra micro-organismos. Ensaio com cultura celular demonstram que são raros os incidentes de alergia e toxicidade às células humanas (Lopez *et al.*, 2015). A própolis possui uma infinidade de mecanismos biológicos e terapêuticos, tais como imunomodulador, antitumoral (Sforcin e Bankova, 2011), antimicrobiana (Ruffato *et al.*, 2018), anti-inflamatório (McLennan *et al.*, 2008), antioxidante (Frezza *et al.*, 2013). Além disso, estudos mostram a capacidade em acelerar a cicatrização de feridas, reepitelização de lesões dérmicas como queimaduras, feridas e úlceras, entre outras (Lopez, 2015; Da Silva *et al.*, 2002; Salatino *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2018).

Park e colaboradores (2000) classificaram a própolis brasileira em 12 grupos com base em suas características físico-químicas, separando-as pela região que foram encontradas. O tipo de própolis mais comercializado atualmente é conhecido como “própolis verde” e tem sido amplamente estudado e utilizado em diversos alimentos e bebidas (Moraes *et al.*, 2010). Posteriormente, foi descoberto o 13º tipo que foi denominado “própolis vermelha”, que tem sido uma importante fonte de investigação por grupos de pesquisa nacionais e internacionais. Além das diferenças na composição química, Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa apresentaram a composição química da própolis vermelha brasileira, encontrada em Brejo Grande - Sergipe (tabela 1) (Frezza *et al.*, 2013; dos Santos *et al.*, 2019; Ruffato *et al.*, 2017; Ruffato *et al.*, 2018).

A própolis começou a ser apreciada como meio para tratamento de problemas de saúde nos anos de 1950 e 1960 na ex-União Soviética e em países do leste da Europa, como Bulgária, República Tcheca e Polônia. Nos países do oeste europeu, na América do Sul e do Norte e no Japão, a própolis não adquiriu popularidade até 1980. Na metade dos anos 80, a própolis tornou-se um importante produto na medicina alternativa e complementar. O Japão é o principal importador de própolis, com preferência pela própolis brasileira, absorvendo cerca de 80% da produção e países como os Estados Unidos, Alemanha e China são fortes compradores da matéria prima (Salatino *et al.*, 2005; Mariano, 2014).

Tabela 1: Principais compostos encontrados na própolis vermelha de Sergipe Dados obtidos por ESI(+)-MS/MS dos. Adaptado de: Frozza *et al.*, 2013.

Íon precursor m/z (%)	Comp. Ident.	Elem. Comp. (+H)	Diff. (ppm)	Íon Fragm. MS/MS (%) [MS-MS]	Ref.
221.1204 (25)	-Acetyl-2,2-dimethyl-3-hydroxychroma	C13H17O3	2.392	206.0969(100) [196.5332(100); 137.1431(80)]	Valcic <i>et al.</i> (1999)
255.1022 (8)	2-Hidroxi-4-methoxychalcon	C16H15O3	0.316		Righi <i>et al.</i> (2011)
257.0811(9)	Liquiritigenina	C15H13O4	1.068	242.0582(20); 239.0700(100) [211.0755(100) {(196.5468(80); 183.0809(15); 137.177(100)); 196.5520(20); 137.1649(20)}; 229.0868(25); 211.0755(30); 178.9466(15); 163.0888(7); 147.0441(100); 137.0236(100)	Piccinelli <i>et al.</i> (2011)
269.0820 (100)	Formononetina	C16H13O4	0.265	254.0575(100) [237.0552(100); 226.0624(30); 136.0155(10)]; 241.0865(15); 237.0552(60) [209.0604(100)]; 213.0917(100) [198.0680(10); 195.0810(70); 182.0725(20)]; 107.0492(15); 253.0858(30) [225.0909(100); 196.5134(20); 137.1273(20)]; 239.0700(5); 229.0868(5);	Piccinelli <i>et al.</i> (2011)
271.0975 (16)	Medicarpina	C16H15O4	0.125	177.0546(7); 163.0388(7); 151.0394(100) [137.0600(10); 131.0494(100)]; 137.0600(5); 131.0494(30);	Piccinelli <i>et al.</i> (2011)
285.0765 (44)	Biochanina A	C16H13O5	0.707	270.0534(100) [253.0493(60); 242.0582(20); 214.0621(30); 137.0236(100)]; 257.0811(25); 253.0493(60) [225.0552(100) {197.0599(100) 137.1576(100)}; 229.0868(30) [211.0755(90); 197.0599(100); 183.0809(20)]; 225.0552(20); 152.0104(7); 137.0236(25).	Piccinelli <i>et al.</i> (2011)
523.1751 (8)	Retusapurpurina B	C32H27O7	0	399.1220(50) [387.1244(100); 373.1066(20)]; 387.1244(100) [371.0919(100); 355.0979(30); 279.0645(30); 196.5436(5)]; 386.1164(30); 371.0919(15).	Piccinelli <i>et al.</i> (2011)
611.1965 (10)	Hesperetina 7-rhamnoglucoside	C28H35O15	1.792		Sulaiman <i>et al.</i> (2011)

Vários estudos identificaram os constituintes da própolis, que pertencem a diversos grupos de compostos, sendo identificados mais de 300 compostos químicos,

sendo eles: flavonóides, ésteres, diterpenos, sesquiterpenos, aldeídos aromáticos, álcoois, ácidos graxos, terpenóides, fenilpropanóides, estilbenos, lignanas, açúcares, vitaminas e aminoácidos (Wagh, 2013; Huang et al., 2014; Bankova, 2005; Funari; Ferro, 2006; Rufatto et al., 2017; dos Santos et al., 2019; Rufatto et al., 2018). Os flavonoides são os principais compostos com atividade farmacológica encontrados na própolis. Atuam no processo de reparo tecidual, agem como antioxidantes, combatendo os radicais livres, possuem atividade antimicrobiana e moduladora do sistema imune, apresentam ação anti-inflamatória, analgésica e vasodilatadora (Menezes, 2005; Vieira et al., 2008). No tratamento de feridas, a própolis tem sido atribuída como agente cicatrizador, diminuindo o tempo de cicatrização de feridas, acelerando o processo de contração e a reparação tecidual. Os produtos ativos agem na formação do tecido de granulação, induzindo a reepitelização e estimulando a migração de queratinócitos (Barbosa et al., 2009; Batista et al., 2015).

Os antioxidantes são conhecidos por proteger contra o estresse oxidativo, que está envolvido no desenvolvimento de várias doenças crônicas. Eles podem prevenir a formação de EROs, além de inibir reações oxidativas em cadeia, quelar metais reativos e reparar danos em moléculas biológicas (Da Costa et al., 2012). Tem sido relatado que antioxidantes naturais administrados por via oral e topicamente, como flavonoides, carotenoides, ácido ferúlico e superóxido dismutase, fornecem proteção contra eritema e citotoxicidade induzidos por irradiação UV (Bonina et al. 1996; Montenegro et al., 1995). Muitos dos agentes que induzem a apoptose são oxidantes ou estimuladores do metabolismo oxidativo celular, enquanto muitos inibidores de apoptose têm atividade antioxidante (Meng e Bai, 2005; Freeman and Grapo, 1982).

Como o dano celular induzido por UV é atribuído principalmente aos efeitos nocivos dos radicais livres, moléculas com propriedades de eliminação de radicais são particularmente promissoras como radioprotetores. Efeitos protetores de compostos antioxidantes presentes na própolis já foram reportados (Uma Devi et al., 1999; Arora et al., 2005; Benkovic et al., 2007; Benkovic et al., 2008). Além de usar protetores solares químicos e/ou físicos para diminuir a intensidade da radiação UV que atinge a pele, a adição de antioxidantes na pele para fortalecer seu potencial protetivo, é uma abordagem emergente para limitar os danos à pele induzidos por EROs causados pela irradiação UV (Fuchs et al., 1989; Shindo et al., 1993).

Danos na pele induzidos por UV e/ou desenvolvimento de câncer podem ser processos lentos e insidiosos; portanto, a fotoquimioprevenção é obrigatória na vida diária para evitar danos graves (Wu et al., 2011). Quatro possíveis mecanismos de fitofotoproteção foram estabelecidos em literatura: a capacidade da molécula de absorver os raios UVA e UVB; o efeito antioxidante da molécula, a atividade quelante de metais de transição e/ou eliminação de EROs por meio da formação de estruturas menos reativas (aplicadas a polifenóis); inibição das MMPs, que poderiam danificar ou destruir o colágeno e as fibras elásticas que constituem a derme; e modulação da sinalização dependente do estresse e/ou supressão de respostas celulares e teciduais, como inflamação (Pillai et al. 2005; Hinneburg et al. 2006; Russo et al. 2006; Stahl & Sies 2007; Dinkova-Kostova 2008 ; Mudit & Katiyar 2010; Nichols & Katiyar 2010; Oresajo et al. 2010; Staniforth et al. 2012). Os últimos três mecanismos previnem danos que poderiam ter sido causados por radiação ultravioleta excessiva na pele (Chiari-Andréo, 2020).

Segundo De Moura *et al.* (2011), o tratamento com própolis estimula aumentos significativos nos componentes da matriz extracelular durante as fases iniciais da reparação de feridas (hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação), seguido por uma redução nas moléculas de matriz extracelular. Além disso, estudos sugeriram que a própolis é capaz de extinguir os radicais livres da pele, além de acelerar a modificação da estrutura de sulfato de dermatan, responsável pela ligação dos fatores de crescimento, promovendo a reparação tecidual. Este resultado é a fonte de segurança de sua aplicação em feridas como, por exemplo, queimaduras (Olczyk *et al.*, 2013; Olczyk *et al.*, 2012).

Embora a própolis e seus compostos ativos possam induzir a apoptose em várias linhagens celulares de câncer, estudos mostram que concentrações menores ($\leq 10\mu\text{g/mL}$) de própolis podem proteger as células HaCat (queratinócitos humanos) contra a apoptose induzida por irradiação ultravioleta. Esses resultados foram coincidentes com o efeito protetor da própolis contra a irradiação UVA em células HaCat em monocamada (Moon, 2012; Kim e Yoo 2016).

Análises experimentais feitas por Olczyk e colaboradores, (2012) permitiram identificar o aumento da glicoproteína multiadesiva vitronectina (VN) no decorrer do processo de reparação de queimaduras em pele de porco, particularmente visível após a aplicação de própolis; seguido pela redução na quantidade de vitronectina após o 3º

dia do experimento. Por outro lado, na fase final da cicatrização da queimadura, a própolis estimulou o maior grau de redução do nível de vitronectina para os níveis semelhantes aos da pele saudável.

É concebível que esse efeito biológico da própolis esteja associado à sua capacidade de estimular a expressão do fator de crescimento transformador- β (TGF- β) (Ansorge et al., 2003; Moura et al., 2011) que por sua vez induz a síntese de vitronectina (Olczyk et al., 2012). O TGF- β é responsável pela deposição aumentada de vitronectina que participa das fases iniciais do reparo da ferida, como hemostasia e inflamação, além de estimular a migração de queratinócitos, a proliferação, bem como a síntese de proteínas (Koli et al., 1991; Ekmekçi e Ek mekçi, 2006; Bernards e Jiang, 2008; Hyde et al. 2004).

Olczyk e colaboradores, (2012) demonstraram que com a pré aplicação da própolis em lesões de queimaduras, ocorreram os primeiros sintomas de granulação em 5 dias pós-queimadura, seguidos de granulação aumentada e os primeiros sinais de reepitelização após 10 dias da lesão. No dia 15, a extensa reepitelização foi visível tanto na borda quanto na parte central do dano tecidual e foi acompanhada pelo acúmulo inicial de colágeno. Durante os dias finais do estudo, 21 dias pós-queimadura, o novo epitélio cobriu as feridas tratadas com própolis com deposição simultânea de colágeno abundante no tecido queimado.

3.4 MODELO CELULAR *IN VITRO* 3D A PARTIR DE ESFEROIDES

A maior parte dos estudos em biologia celular é realizada cultivando as células de interesse em substratos de poliestireno em monocamada (2D) (Alves e Guimarães, 2010; Molinaro et al., 2010; Fennema et al., 2013). Neste sentido, os modelos 2D *in vitro* mais conhecidos são de células primárias e secundárias. As culturas secundárias são modelos de células imortalizadas que são encontradas em bancos de células e comercializadas. Já a cultura primária é estabelecida a partir do crescimento de células oriundas de um fragmento de tecido obtido por desagregação mecânica ou enzimática. As células que sobrevivem ao processo de desagregação e aderirem à garrafa formarão a primeira monocamada de células daquele tecido. Essas células possuem as características do tecido de origem, podem crescer em cultura por um determinado período e são denominadas células primárias devido à presença de suas

características genótípicas e fenotípica. As células primárias que conseguem manter suas características originais possuem um tempo de vida bastante curto quando comparadas as secundárias.

No organismo, a morte celular é um mecanismo para renovação tecidual. Essa morte é programada e não causa danos, um processo denominado de apoptose. A célula não é rompida, ela simplesmente se “autodigere”, formando botões ou corpos apoptóticos que são degradados. À medida que a cultura é repicada, as células com uma maior capacidade de proliferação irão predominar na garrafa de cultivo em detrimento das células que não se adaptaram bem ao cultivo, ou que, devido a traumas do processo de desagregação, não possuem uma taxa normal de proliferação (Alves e Guimarães, 2010).

No corpo humano, as células são rodeadas por matriz extracelular (MEC) estando em contato com moléculas que a constitui, ou em contato físico direto com células do mesmo tipo, ou ainda com células de tipos diferentes em um arranjo tri-dimensional (3D) (Rimann e Graf-hausner, 2012). A transição entre o 2D e o 3D está acontecendo em larga escala na indústria de cosméticos e como o cultivo 3D possui vantagens como a alta densidade celular, automação, baixos custos, reprodução em grande escala e aplicabilidade, a indústria farmacêutica tende a seguir o mesmo caminho (Rimann e Graf-Hausner, 2012; Moura, 2015). A hipótese de que diferenças no ambiente da cultura celular podem afetar a forma como as células respondem ao tratamento medicamentoso é apoiada por descobertas de que as células cultivadas em arquitetura 3D mostraram diferenças na resistência à apoptose e quimioterápicos quando comparados às culturas em 2D (Bissell et al., 2002). O cultivo 2D ainda é utilizado para estudos *in vitro* de drogas, no entanto, suas deficiências foram claramente reconhecidas pela indústria farmacêutica.

A formação de esferoides ocorre a partir de células em suspensão que vão espontaneamente agregar-se e formar um esferoide. A produção de esferoides se dá a partir de moldes de agarose micromoldada, feitas através da adição da agarose em moldes pré-fabricados (Svoronos et al., 2014; Tejavibulya et al., 2011). Um tipo de formação de esferoides ocorre em um sistema de agarose contendo microressecções (Figura 6). A montagem é feita após plaqueamento e solidificação da agarose ultrapura, que é micromoldada e solta do molde de silicone para fixação na placa.

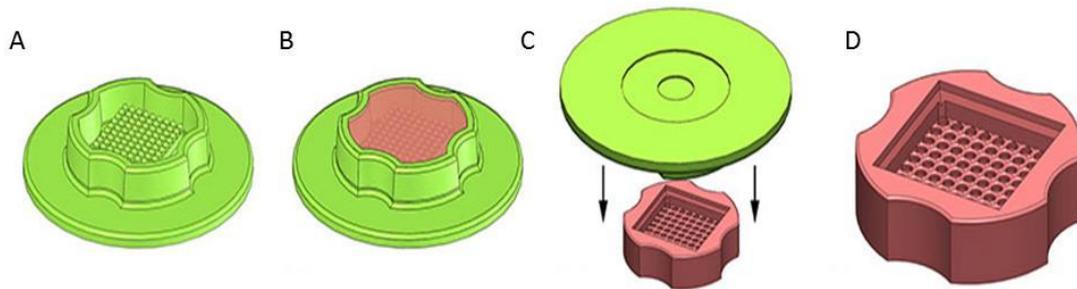


Figura 6. Produção de agarose micromoldada. (A) Molde de silicone, (B) após plaqueamento e solidificação da agarose ultrapura, (C) retirada da agarose solidificada posicionada em direção ao poço da placa de 12 poços, (D) a agarose micromoldada solta do molde de silicone para fixação na placa. Adaptado de Microtissues natural 3D®. [Homepage da internet] <<http://www.microtissues.com/>>. Fonte: Moura, 2015.

Napolitano e colaboradores (2007) desenvolveram um modelo baseado em um gel não adesivo que limita as interações células-substrato e assim incentiva a interação célula-célula favorecendo a formação de agregados celulares (Figura 7). Do mesmo modo, a semeadura de células nesse sistema permite a formação de agregados celulares através da decantação. De acordo com a teoria de automontagem, os esferoides assumem a geometria esférica minimizando a energia e maximizando a adesão intercelular (Napolitano et al. 2007).

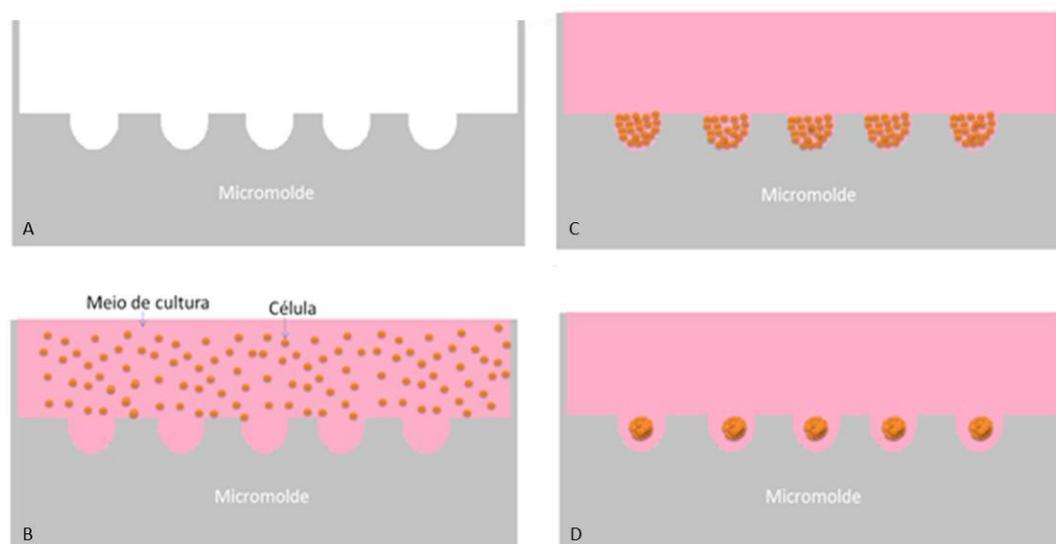


Figura 7. Esquema representando a etapa de semeadura das células ao micromolde. (A) micromolde de hidrogel, (B) plaqueamento da suspensão de células no micromolde, (C) células dentro das microrressecções permanecem sem adesão à superfície circundante, (D) esferas formadas dentro das microrressecções em uma estrutura de esferoide. Adaptação de Santos, 2014. Fonte: Moura, 2015.

Esferoides de diversos tipos celulares já foram produzidos, como de câncer de mama, cólon, próstata, entre outros, com o objetivo de se tornarem um modelo mais fiel às doenças que representam. Modelos 3D de co-cultura de linhagens tumorais e outras células como fibroblastos, macrófagos e células endoteliais também já foram estabelecidos com o objetivo de mimetizar os componentes pertencentes ao microambiente tumoral (Calcagno et al., 2010; Ponti et al., 2005; KunzSchughart et al., 2004; Wenzel et al., 2014; Devi et al., 2015; Dwyer et al., 2016; Noel et al., 2017; Rebelo et al., 2018).

O modelo 3D a partir de esferoides tem sido aceito e até mesmo requisitado pelas indústrias, principalmente farmacêuticas, pois mimetizam o mais próximo do ambiente *in vivo*, com menor custo e menor tempo, além de contribuir para o conhecimento da resposta celular a tratamentos. Tais companhias observaram que o custo com o cultivo em monocamada eram altos e quando os fármacos passavam para o teste em animais, as respostas não eram coerentes (Rimann e Graf-Hausner, 2012; Kunz-Schughart et al., 2004).

3.5 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E REGENERAÇÃO TECIDUAL

As células tronco mesenquimais (CTMs) estão presentes em diversos tecidos do organismo, sendo a medula óssea um dos mais ricos ambientes. No entanto, estas células já foram encontradas e isoladas de outros órgãos e tecidos, tais como sangue periférico, sangue de cordão umbilical e placentário, tecido muscular e esquelético, derme e tecido adiposo (Prata, 2006). Estas vêm substituindo as células-tronco embrionárias e células-tronco pluripotentes recentemente usadas nas terapias. Isso se deve em grande parte às suas amplas capacidades de diferenciação e à ausência de formação de teratomas, além da facilidade de isolamento, sua capacidade de propagação em cultura, e de não serem imunogênicas, podendo ser teoricamente empregadas em transplantes alogênicos (Jiang *et al.*, 2002; Bobis, Jarocho e Majka, 2006).

Células-tronco são células indiferenciadas, que apresentam como características a capacidade de autorrenovação, ou seja, são capazes de se multiplicar mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua

população de maneira constante nos tecidos. As CTMs possuem potencial de se diferenciar em diversos tipos celulares. Desta forma, acredita-se que células-tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo quando estes sofrem uma lesão ou injúria (Lemischka, 2005; Blau et al., 2001; Fodor, 2003).

As células isoladas são cultivadas com meio contendo soro fetal, sendo que as CTMs aderem ao plástico. Algumas células da linhagem hematopoiética também podem aderir, mas, com o tempo, com as várias trocas do meio de cultura, são removidas. Portanto, enquanto este procedimento elimina a maior parte das células contaminantes, a heterogeneidade remanescente da cultura diminui progressivamente com as diversas passagens e, após determinado número delas, a cultura torna-se enriquecida pela fração que se autorrenova, as CTMs. Elas são descritas como células morfológicamente indistinguíveis de fibroblastos, com formato fusiforme, aderentes a plástico, com potencial de diferenciação (Senesi et al., 2019; Busser et al., 2014; Bourin et al., 2013; Bydlowski et al., 2009; Soundararajan e Kannan, 2018).

A identificação exata das células-tronco é possível quando utilizando marcadores de superfície que refletem as características biológicas e funcionais destas de forma a permitir também a individualização de um determinado tipo celular. As células tronco mesenquimais apresentam vários marcadores imunofenotípicos, embora estes marcadores não sejam específicos, ocorrendo em outros tipos celulares (De bari et Al. 2001).

O termo CD (Cluster Designation: denominação de grupamento) é utilizado para descrever anticorpos monoclonais criados em diferentes laboratórios de todo o mundo contra os antígenos leucocitários humanos (Roitt, 1999). Segundo De Ugarte e colaboradores (2003) e Kern e colaboradores (2006), as CTMs devem expressar em sua superfície os marcadores CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 e CD166 e não devem expressar os marcadores de linhagem hematopoiética CD11c, CD11b, CD79 α , CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD56, CD133, CD144, CD117 e MHCII. Outro critério mínimo criado posteriormente para a caracterização da célula-tronco mesenquimal humana propõe que as células devem aderir ao plástico quando mantida em condições de cultura; também possuir a capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica (Dominici et al., 2006).

Atualmente, a medicina regenerativa tem sido um dos principais focos de pesquisa não apenas para encontrar terapias, mas também para entender a biologia básica e a patogênese da doença (Chien, 2008; Inoue e Yamanaka, 2011; Fahey e Wallace, 2011). Embora uma série de questões éticas tenham surgido na pesquisa com células-tronco (McCormick e Huso, 2010), avanços recentes no isolamento e desenvolvimento de estas ajudaram os cientistas a identificar e cultivar tipos específicos de células para regeneração de tecidos em vários distúrbios, como Parkinson (Xi e Zhang, 2008), Alzheimer (Magga et al., 2012), doenças do coração (Perin et al., 2012), músculos (Cerletti et al., 2008), pulmão (Tzouveleki et al., 2011; Weiss et al., 2011), fígado (Rashid et al., 2010) e outros órgãos (Lodi et al., 2011), além de uma série de terapias para tratar doenças como acidente vascular cerebral, enxerto/transplante, GvHD (doença do enxerto contra hospedeiro), distúrbios neurodegenerativos, doenças auto-imunes, como a esclerose múltipla, e distúrbios psiquiátricos, como o autismo (Lee et al., 2010; Chung et al., 2004; Pollock et al., 2016; Zappia et al., 2005; Bradstreet et al., 2014; Dawson et al., 2017; Lv et al., 2013).

Na dermatologia, as células-tronco têm sido avaliadas na reposição epitelial de áreas de queimadura, na cicatrização de feridas crônicas e no tratamento do vitiligo, entre outras condições (Falanga et al., 2007; Nie et al., 2007). A cicatrização de feridas é um processo complexo que requer migração celular, inflamação, angiogênese, formação de tecido de granulação, reepitelização e remodelação da matriz extracelular. As CTMs têm um papel ativo nesse processo, e a aplicação terapêutica das CTMs demonstrou melhorar os resultados de cicatrização de feridas (Lee et al., 2016).

A grande capacidade de potencial de diferenciação das CTMs, a possibilidade de enxerto, seus efeitos imunossupressores e sua expansão em cultura levaram ao aumento do interesse clínico relativo ao uso destas células, através de infusão intravenosa ou administração dirigida ao local de interesse, em numerosas situações patológicas. No caso de estudos utilizando CTMs em ensaios clínicos, bilhões de CTMs isoladas ou ligadas a biomateriais, são necessárias. A produção de CTMs para este propósito necessita da observação e aderência às boas práticas de manufatura, para assegurar a liberação do ativo de modo seguro, reprodutível e eficiente (Sensebé, 2009).

A principal vantagem do uso de células-tronco como uso terapêutico como substitutos de pele é que essas células podem ser amplificadas e diferenciadas *ad infinitum*. Uma linhagem celular a partir de células-tronco poderia ser desenvolvida a

partir de doadores específicos ou poderia ser manipulada geneticamente para esquivar do sistema imunológico a fim de obter peles compostas projetadas “enxertáveis universais”, evitando a rejeição de tecidos (Domingues et al., 2022).

3.6 CULTIVO DE QUERATINÓCITOS DA PELE E INTERAÇÃO COM RADIAÇÃO UV

A pele é o maior e mais extenso órgão do corpo humano. Ela está em constante contato com o meio externo, que a torna um tecido propenso a sofrer lesões que possam ou não comprometer a qualidade de vida das pessoas. A pele constitui cerca de 16% do peso corporal dos animais. Ela possui diversas funções, como a proteção contra a perda de água, atrito, armazenamento de gordura, carboidratos e proteínas. Além disso, também participa ativamente nos processos de termorregulação corporal, formação de vitamina D3, resposta imunológica e como receptor sensorial (Fernandes, Oliveira e Machado, 2011; Gonzalez, 2010).

Por constituir a principal interface entre o ambiente e o organismo, a pele é considerada uma barreira efetiva contra diversos tipos de estresse, destacando-se sua ação na proteção contra a radiação ultravioleta, desidratação, forças mecânicas, alterações na temperatura e inflamação, esta última promovida por fatores endógenos liberados pelas células. Assim, pode-se dizer que a pele é uma linha de defesa eficiente contra diversas condições que afetam principalmente a epiderme (Gonzales, 2010).

A camada basal do tecido epitelial é formada por células-tronco e queratinócitos. Os queratinócitos são o principal tipo celular da pele e, portanto, o principal alvo das alterações mediadas pelos diferentes tipos de estresse, modulando vias de sinalização que podem levar a apoptose, sobrevivência, senescência ou diferenciação celular. Este tipo celular apresenta, como característica principal, uma constituição proteica baseada principalmente na síntese de queratina. De fato, em queratinócitos, o conteúdo de queratina representa mais de 50% da massa proteica total (Raj, Brasj e Grossman, 2006; Silva et al, 2013).

Os queratinócitos migram da camada basal para camadas estratificadas do epitélio, em que formam uma rede celular muito dinâmica e que fisicamente confere força e rigidez ao epitélio. O processo de migração dos queratinócitos é acompanhado

pela gradual diferenciação celular associada à produção crescente de queratina. Ao final desse processo, que culmina na diferenciação terminal dos queratinócitos seguida por morte celular e esfoliação, os filamentos de actina permanecem intactos, formando o centro estrutural da camada morta da pele queratinizada, eficaz na proteção contra a abrasão, agressões químicas e físicas, dessecação, penetração de patógenos e proteção geral contra intempéries do ambiente (Gonzalez, 2010; Denning, 2004).

Entre os tipos de estresse aos quais os queratinócitos são submetidos, o mais estudado, e talvez o de maior relevância fisiológica, é o estresse causado pela radiação ultravioleta. A geração de espécies reativas de oxigênio, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH\bullet$) e ânion superóxido ($O_2\bullet$), possuem papel central em iniciar e dirigir muitos dos eventos de sinalização que medeiam a resposta celular à irradiação UVA e UVB (Krutmann, 2006).

Em doses fisiologicamente relevantes de irradiação UV, a geração de EROs ativa inúmeras vias de sinalização, causa peroxidação lipídica e induz dano oxidativo ao DNA e proteínas celulares. Queratinócitos que forem severamente danificados e impossibilitados de reparar o DNA induzem apoptose como um mecanismo de escape, causando sua própria eliminação em benefício do organismo. Neste processo, uma proteína supressora de tumor, p53, possui um importante papel, induzindo a parada do ciclo celular na fase G1 (Campbell et al, 1993; Boukamp et al. 1988; Silva, 2013).

A exposição de queratinócitos ao estresse oxidativo e EROs também pode ser usada como mecanismo terapêutico. A alta reatividade química das EROs e sua capacidade de reagir com diferentes moléculas de maneira destrutiva tem sido explorada em diferentes terapias, tendo como objetivo a eliminação de queratinócitos que tenham acumulado mutações ou outros danos genéticos (Takahashi et al., 2004). Em adição, as EROs são formadas fotoquimicamente e servem como mediadores de respostas celulares durante a irradiação UVA, utilizadas para fins cosméticos e terapêuticos como, por exemplo, a terapia fotodinâmica (Krutmann, 2006).

Um dos elementos fisiopatológicos importantes de lesões que se estabelecem na pele é o desenvolvimento do estresse oxidativo. Um exemplo para a queimadura mostra que a perfusão de tecidos isquêmicos após um trauma térmico resulta em um desequilíbrio entre as EROs e o sistema de defesa antioxidante devido à produção excessiva de radicais livres (Bonucci et al., 2018). Portanto, o estresse oxidativo é um

estado de desequilíbrio entre a ação das EROs e a capacidade biológica de desintoxicar rapidamente intermediários reativos e reparar o dano ocorrido (Nwosu et al., 2020). Nos estudos de Foldi et al. (2009), também foi apontado que as queimaduras podem promover a peroxidação lipídica, ou seja, uma reação autocatalítica, iniciando o metabolismo tóxico e a apoptose celular (Qin et al., 2019). Pesquisa realizada por Qin et al., (2019) voltadas para melhorar a eficácia do tratamento e prevenir lesões, recomendam que pacientes com queimaduras utilizem antioxidantes o mais precocemente possível, devido à sua atividade protetora contra danos teciduais oxidativos (Valachova et al., 2020).

O processo de cicatrização é um mecanismo complexo de longa duração que envolve alguns processos de reparo dependentes do sistema imunológico, bem como a reconstrução da continuidade do tecido resultante da injúria. A cicatrização de feridas ocorre em vários estágios ao longo de dias e envolve o aumento da migração e proliferação celular (inflamação e formação de tecido de granulação), bem como a síntese *de novo* do tecido conjuntivo, um processo de remodelação (Chen et al., 2005; El Kahi et al., 2009; Puculek et al., 2020; Kocik, 1996).

É geralmente aceito que os fibroblastos, queratinócitos e células epidérmicas são estruturas fundamentais durante todo o processo de cicatrização de feridas (El Kahi et al., 2009; Räsänen e Vaheri, 2010). Durante a regeneração tecidual, a interação de queratinócitos e fibroblastos determina a conversão do microambiente da ferida de um tecido inflamatório para um tecido de granulação dirigido por síntese (Werner et al., 2007). As células epidérmicas exibem funções imunorreguladoras quando a homeostase da pele é interrompida por dano ou inflamação (Havran e Jameson, 2010).

Os queratinócitos que estão envolvidos na reepitelização da ferida são formados como consequência da diferenciação das células-tronco epidérmicas localizadas na epiderme interfolicular e nas protuberâncias do folículo piloso (Coalson et al., 2019). No entanto, queratinócitos e células epidérmicas são incapazes de cumprir seus papéis especiais durante a regeneração tecidual sem o acúmulo simultâneo de glicoproteínas multiadesivas como a vitronectina e laminina no leito da ferida. Sabe-se que a vitronectina, na presença de fatores de crescimento, estimula a migração de queratinócitos, proliferação, bem como a síntese de proteínas (Hyde et al., 2004).

4 - METODOLOGIA

4.1 PROCESSAMENTO DA PRÓPOLIS VERMELHA:

Para extração hidroalcoólica, a própolis foi coletada em Brejo Grande – Sergipe, no ano de 2010. Esta foi triturada e suspensa em etanol 70 % (v/v) durante 24 horas com agitação constante. Em seguida, a solução foi filtrada a vácuo. Após a extração, o solvente foi evaporado em rotaevaporador e então ressuspensão em etanol P.A e aguardou-se a total evaporação do etanol. Posteriormente, o extrato foi congelado e liofilizado para a obtenção do pó da extração de própolis vermelha, o qual foi mantido congelado a -20°C . O pó liofilizado foi então ressuspensão em solvente hidroalcoólico nas concentrações 10, 25 e $100\mu\text{g/mL}$ já pré-determinadas por nosso grupo em estudos prévios, para aplicação nos ensaios *in vitro*.

4.2 - OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS:

Amostras de tecido adiposo foram obtidos de 2 pacientes entre 18 e 45 anos, sem comorbidades, submetidos à lipoaspiração, os quais assinaram o TCLE protocolado no CEP sob número CAAE: 46226721.0.0000.5341. O produto do lipoaspirado foi processado em até 24 horas após a coleta. Este foi lavado com tampão PBS 1x e submetido a tratamento enzimático com colagenase do tipo I na concentração 0,075%, por 30 minutos. Após, a colagenase foi neutralizada com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de Penicilina/Estreptomicina (PS). A suspensão obtida foi então centrifugada. O pellet celular foi ressuspensão em meio DMEM suplementado e plaqueado em garrafas de cultura, sendo mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO_2

4.3 - CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS:

4.3.1 - Análise morfológica das culturas celulares:

A presença das células aderentes e a sua confluência foram rotineiramente observadas em microscópio invertido de contraste de fase (Nikon, Eclipse Ts2, Japão), durante as culturas de células-tronco.

4.3.2 - Análise imunofenotípica das células cultivadas:

As CTMs foram caracterizadas imunofenotipicamente utilizando os anticorpos monoclonais anti-humanos específicos para identificar os marcadores de CTMs, tais como CD90, CD29 e CD73, e para a confirmação da ausência de marcadores de células-tronco hematopoéticas, como CD45 e CD34 (PharMingen, Becton Dickinson, San Jose, CA). O 7AAD foi utilizado para permitir a avaliação apenas de células vivas (7-Amino Actinomycin D) (Invitroge®, eBioscience™, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). Os anticorpos foram incubados durante 30 minutos. Posteriormente, as células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACSCalibur BD, Becton Dickinson), equipado com laser de argônio para 488 nm e laser hélio-neônio para 633 nm. O ajuste de fluorescência foi realizado com auxílio dos controles isotípicos PE, FITC e APC. A análise dos dados foi realizada com auxílio do software FlowJo versão 10.8.1 (BD Biosciences).

4.3.3 - Diferenciação celular *in vitro*:

Ensaio de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica foram realizados usando kits de diferenciação (StemPro™ Chondrogenesis - Osteogenesis - Adipogenesis Differentiation Kit, Gibco™), seguindo protocolos sugeridos pelo fabricante. As células foram mantidas em incubadora com atmosfera umedecida a 37°C, com 5% de CO₂ durante a diferenciação.

4.3.3.1 - Diferenciação osteogênica:

Foi realizado cultivo de 8×10^4 células/poço por 2 a 3 semanas, utilizando o kit de diferenciação para células-tronco. O meio foi trocado a cada 2-3 dias e as células foram fixadas no dia 10, com 4% paraformaldeído. A deposição de matriz mineralizada foi observada por coloração com Alizarin Red S em pH 4,2.

4.3.3.2 - Diferenciação adipogênica:

Foi realizado cultivo de 8×10^4 células/poço por 1 a 2 semanas, utilizando o kit de diferenciação para células-tronco. O meio foi trocado a cada 2-3 dias e as células foram fixadas no dia 16, com 4% paraformaldeído. Os adipócitos foram discernidos por observação ao microscópio com contraste de fase e/ou por coloração com o corante Oil Red O.

4.3.3.3 - Diferenciação condrogênica:

Foi realizado o cultivo de 8×10^4 células/poço por 3 a 4 semanas, utilizando o kit de diferenciação para células-tronco. O meio foi trocado a cada 2-3 dias e as células foram fixadas no dia 24, com 4% paraformaldeído. A condrogênese foi demonstrada pela coloração com Alcian Blue 1%.

4.4 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS MODELOS 2D E 3D:

4.4.1 – *Cultura das células e produção dos esferoides*

4.4.1.1 - Cultura 2D

As células de queratinócitos (HaCat) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro em 2022 e cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com 10% de soro fetal bovino inativado e 1% de Penicilina/Estreptomicina. As células foram mantidas em garrafas para cultura de 75cm² em estufa a 37°C e atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Quando as células apresentaram uma confluência de 80%, estas foram plaqueadas para a realização dos testes.

Células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo foram isoladas de 2 pacientes, com aprovação pelo Comitê de Ética (CAAE: 46226721.0.0000.5341). As células foram cultivadas com meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com 10% soro fetal bovino e 1% Penicilina/Estreptomicina. As células foram igualmente mantidas em garrafas para cultura de 75cm² em estufa a 37°C e atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Quando as células apresentaram uma confluência de 90%, as células foram plaqueadas e então foram submetidas aos demais testes.

4.4.1.2 - Cultura 3D

A produção dos moldes para a cultura dos esferoides foi feita através de uma automontagem celular guiada por agarose micromoldada. Utilizou-se um modelo de silicone estéril (MicroTissues® 3D Dish®, Sigma) para fabricar a agarose micromoldada projetada para cultivo em placas de cultura de 12 poços. Através deste, foi realizada a moldagem de microinserções no hidrogel. Esse processo resultou em um total de 81 microinserções aptas para produção de esferoides.

Para a produção do hidrogel de agarose utilizada na produção dos moldes, utilizou-se uma solução de agarose 2% em salina. Essa solução foi adicionada nos moldes de silicone até total preenchimento dos mesmos até a polimerização do gel. A agarose micromoldada foi desenformada em placas de 12 poços. Após a total polimerização e o molde incluso na placa, foi adicionado meio DMEM para o equilíbrio do hidrogel de agarose. Os micromoldes foram incubados durante 24 horas em estufa com atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Esse processo foi repetido antes do plaqueamento com o meio de cultura utilizado para o cultivo dos esferoides.

As células HaCat e CTM foram isoladamente semeadas em placas de 12 poços devidamente preparadas com os hidrogéis micromoldados para esferoides na concentração de 2×10^6 células por poço. As células foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

Após 72 horas de incubação, os esferoides foram tratados com diferentes concentrações de extratos de própolis vermelha (10, 25 e 100µg/mL) durante 24 horas, 72 horas e 168 horas, e então foram submetidas aos testes subsequentes.

4.4.2 – Irradiação UVA *in vitro*

Após confluência de 70% para as culturas 2D ou formação dos esferoides para as culturas 3D, as células foram irradiadas utilizando lâmpada UVA (BLB-T5, LUCMAT) para calcular a curva de sensibilidade das duas linhagens celulares, para determinação do tempo de exposição dessas células e a dosagem final. Com isso, as duas linhagens de células foram irradiadas durante 120 minutos, com uma distância de 20 cm entre a fonte de luz e a amostra biológica em placas de cultura, que emitiu radiação na faixa de 365 nm em uma dosagem final de 3,4J/cm². As células foram tratadas com as diferentes concentrações de extratos da própolis vermelha, levando em consideração relações de tempo e concentrações pré-estabelecidas pelo nosso grupo em testes anteriores, (10, 25 e 100 µg/mL durante 24, 72 horas e 7 dias), antes da exposição à irradiação. Após a irradiação, o meio de cultura foi trocado e então as células permaneceram mais 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Passado esse período, as análises foram realizadas.

4.4.3 – Teste in vitro de fototoxicidade da própolis vermelha

Esse teste foi realizado seguindo uma metodologia já descrita (OECD, 2004). Para cada teste, as células foram semeadas de forma idêntica em duas placas separadas que foram então cultivadas simultaneamente ao longo de todo o procedimento de ensaio em condições de cultura idênticas, exceto no período em que uma das placas é irradiada (+ Irr) e a outra é mantida no escuro (-Irr). A intensidade da radiação UV (irradiância) foi verificada antes de cada teste de fototoxicidade, utilizando um luxímetro digital na faixa de UVA. As células foram verificadas quanto a sensibilidade à fonte de UVA, avaliando sua viabilidade após a exposição a doses crescentes de irradiação. A viabilidade celular foi então determinada após 24 horas usando o teste de absorção do XTT em espectrofotômetro.

4.4.4 - Ensaio de viabilidade/proliferação celular

O *cell proliferation kit II* (XTT, Sigma Aldrich, US) foi usado para a quantificação espectrofotométrica não radioativa da proliferação celular e viabilidade na população de células. Resumidamente, as células e esferoides foram cultivados durante 24, 72 e 168h, respectivamente, e a solução de XTT foi adicionada. Após, as placas foram incubadas por 4h. A absorbância do corante formado a partir da conversão do sal de tetrazólio XTT por células metabolicamente ativas, foi lida em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 450 nm (usando 650 nm como referência). A viabilidade é calculada usando a seguinte fórmula: $(A_{450}-A_{650})$ das células testadas $\times 100 / (A_{450}-A_{650})$ das células do controle.

4.4.5 – Ensaio de avaliação de apoptose celular

A detecção de eventos apoptóticos foi avaliada pela detecção direta de imunofluorescência por citometria de fluxo. Após as células serem semeadas e tratadas conforme os testes anteriores, as células foram coradas com iodeto de propídio utilizando o Annexin V FITC Apoptosis Detection Kits (Invitroge®, eBioscience™, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os grupos de controle positivo foram tratados com DMSO 10%. O controle negativo foi tratado com meio de cultivo. As células foram então incubadas com o kit e em seguida

analisadas por citometria de fluxo usando um citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton Dickinson) e então calculada sua porcentagem de corpos apoptóticos. Os dados foram coletados pelo CellQuest Pro Software (BD Biosciences) e analisados usando FlowJo (TreeStar, Inc). Todos os procedimentos experimentais foram realizados em triplicata.

4.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada grupo de resultados, testes estatísticos apropriados foram empregados para avaliar o nível de significância alcançado, de acordo com a metodologia empregada, utilizando o programa estatístico Prism GraphPad (versão 5 – San Diego, CA, USA). Os valores foram expressos como média, desvio padrão, valores máximo e mínimo. A comparação das médias foi realizada por análise de (ANOVA). O nível de significância adotado no estudo foi de 5% ($p < 0.05$).

5. RESULTADOS

5.1 Análise morfológica

No período inicial do cultivo das células-tronco, estas apresentaram-se com morfologia heterogênea com vários formatos distintos, dentre eles planas, estreladas, triangulares e alongadas. Após 16 dias de cultivo, as células mostraram morfologia relativamente homogênea, com citoplasma amplo e núcleos grandes contendo vários nucléolos. Seu fenótipo era semelhante a fibroblastos. As células foram observadas e fotografadas usando microscopia invertida (Figura 8).

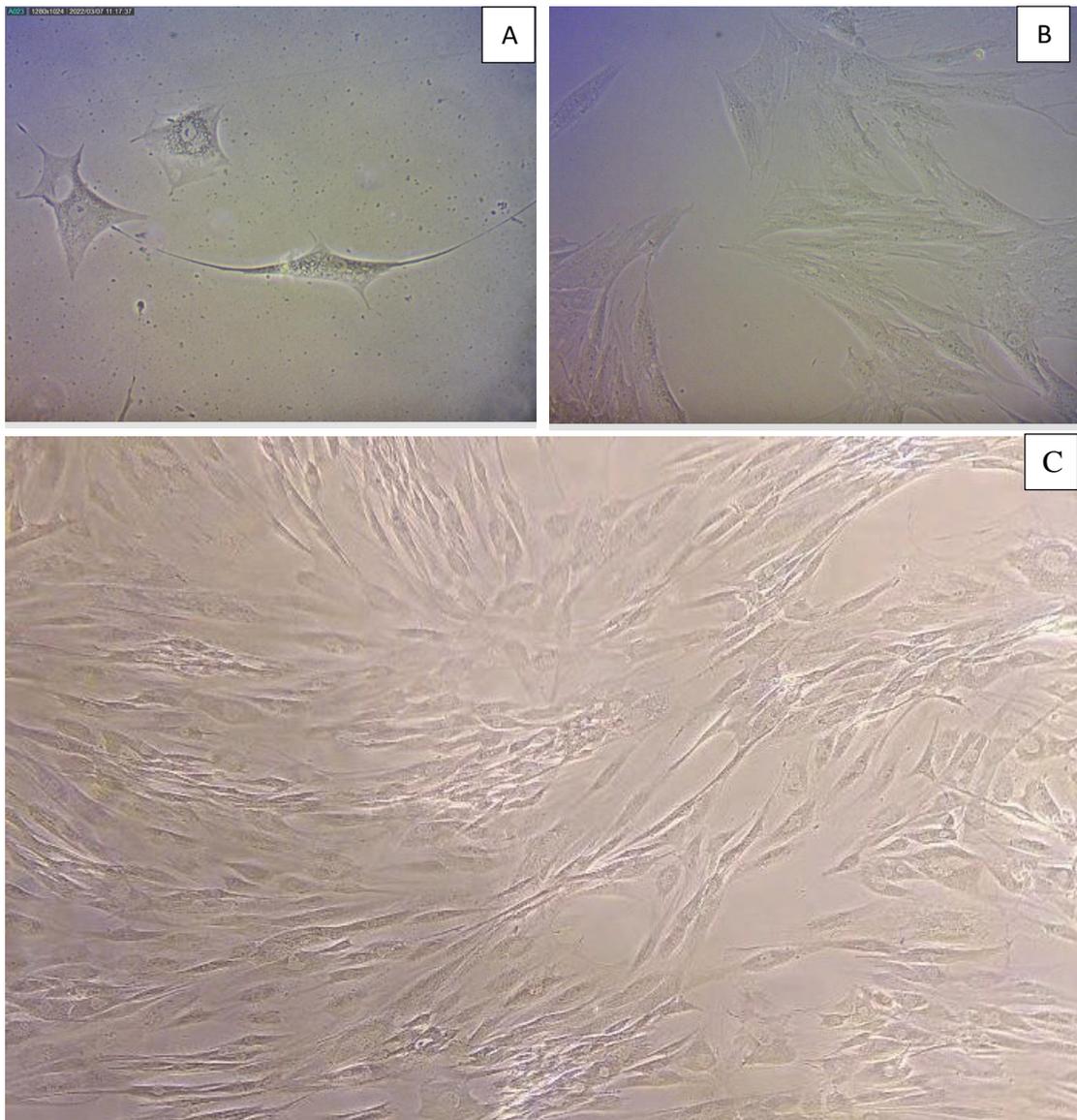


Figura 8: Morfologia celular das CTDAs após 8 dias de incubação em cultivo (A) e após 16 dias de incubação (B) e após 22 dias (C).

5.2 Análise imunofenotípica

A análise com citometria de fluxo de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos foi realizada para caracterizar o fenótipo das CTMs. A análise de classificação de células ativadas por fluorescência (FACS) foi realizada em 2 culturas primárias de células, adquiridas de 2 pacientes diferentes, conforme os critérios de inclusão para coleta do material biológico.

Os marcadores de superfície celular que foram usados para confirmar as CTDAs foram CD90, CD73 e CD29 como marcadores positivos e CD45, CD34 como marcadores negativos. O pico singlete e nítido nos gráficos mostra que havia uma única

população de células. Os marcadores positivos e negativos apresentaram singlete e pico agudo. No entanto, a amostra e o pico isotópico de alguns marcadores se sobrepueram, diminuindo a porcentagem (%). As células mortas foram excluídas da análise por meio da marcação com 7AAD (Figura 9).

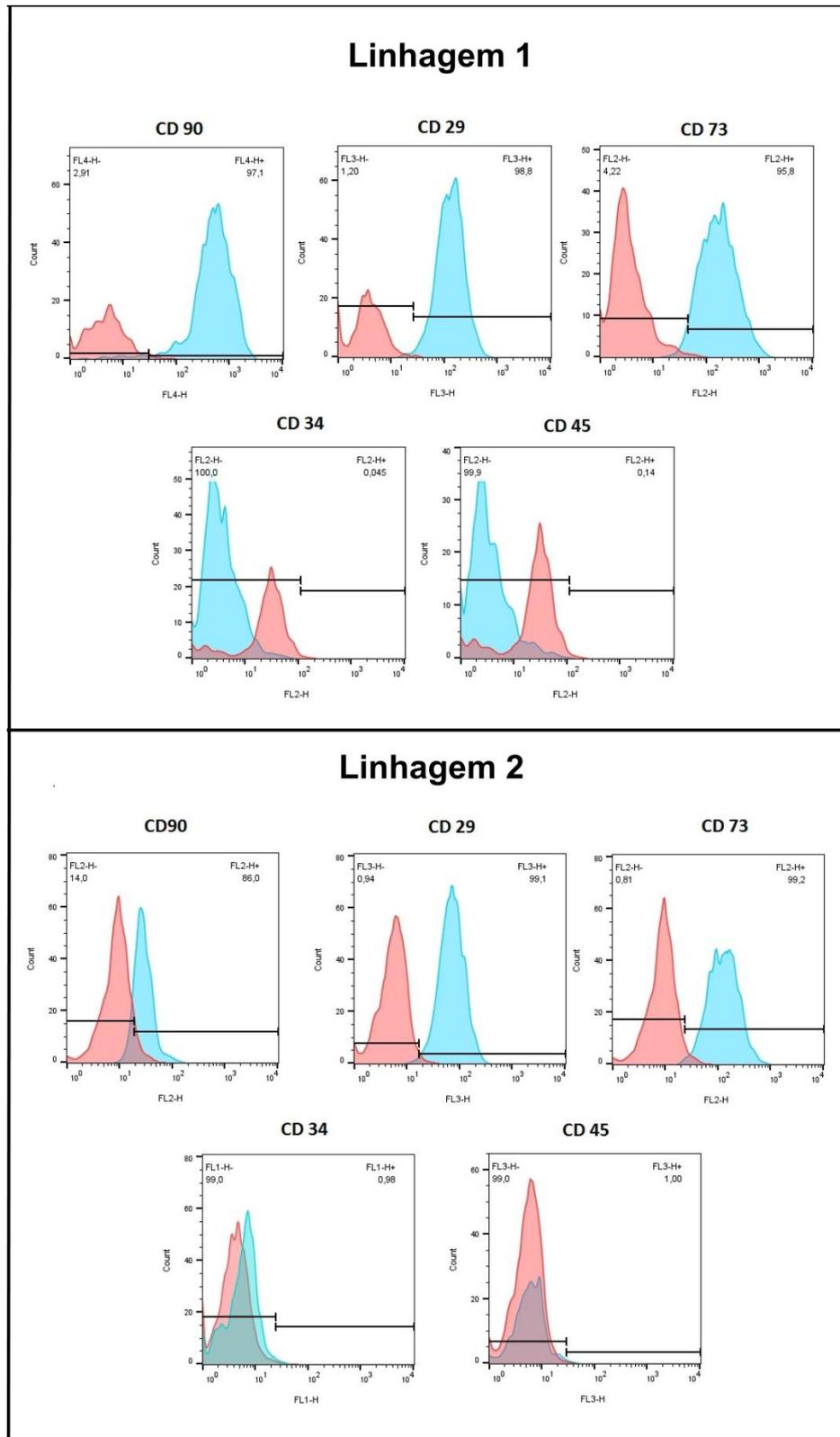


Figura 9: Análise por citometria de fluxo de células-tronco derivadas do tecido adiposo de 2 pacientes. Os gráficos mostram a sobreposição do controle isotópico e marcador, em que o controle está representado em vermelho e as células marcadas com anticorpos estão representadas em azul. A barra representa a percentagem de células positivas para cada marcador pesquisado. A análise FACS foi realizada para marcadores mesenquimais CD29, CD90, CD73 e marcadores hematopoiético CD45, CD34.

As células-tronco derivadas de tecido adiposo apresentaram característica morfológica fibroblastoide e imunofenotípica de células-tronco mesenquimais e foram positivas para CD90, CD73 e CD29 e negativos para marcadores hematopoiéticos CD45 e CD34. Usando este conjunto definido de marcadores de superfície celular, as CTDA de pacientes eram fenotipicamente similares nas duas linhagens saudáveis testadas conforme percentagens apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Porcentagens de marcação de antígenos com valores positivos de linhagens de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo analisadas por citometria de fluxo. Dados expressos em MD e DP em duplicatas.

Marcadores CD	Resultado (%)
Positivos	
CD29	98,8±0,2
CD73	97,5±2,3
CD90	91,6±7,8
Negativos	
CD 34	0,5±0,66
CD 45	0,1±0,03

5.3 Diferenciação celular *in vitro*

As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo foram avaliadas quanto sua capacidade de diferenciação em distintos tipos de linhagens mesenquimais. Três linhagens de CTDA foram cultivadas em monocamadas por 7 dias em meio adipogênico, 14 dias em meio osteogênico e 21 dias em meio condrogênico.

Ao aplicar os kit de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica (StemPro™ Chondrogenesis - Osteogenesis - Adipogenesis Differentiation Kit,

Gibco™), as células apresentaram gotículas lipídicas intracelulares acumuladas e vacúolos de gordura, conforme revelado pela coloração Oil Red O, características da diferenciação adipogênica. Também apresentaram precipitados de cálcio na matriz extracelular, que foram identificados pela coloração com Alizarin Red, característica da diferenciação osteogênica. No processo de diferenciação condrogênica a matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos e a síntese de proteoglicanos foi visualizada por coloração com Alcian Blue. Os resultados encontrados indicam que essas células podem se diferenciar em adipócitos, osteoblastos e condroblastos como mostram as figuras 10 e 11. As CTMs são capazes de se diferenciar em células de linhagem mesodérmica como adipócitos, osteoblastos e condrócitos *in vitro* e *in vivo*.

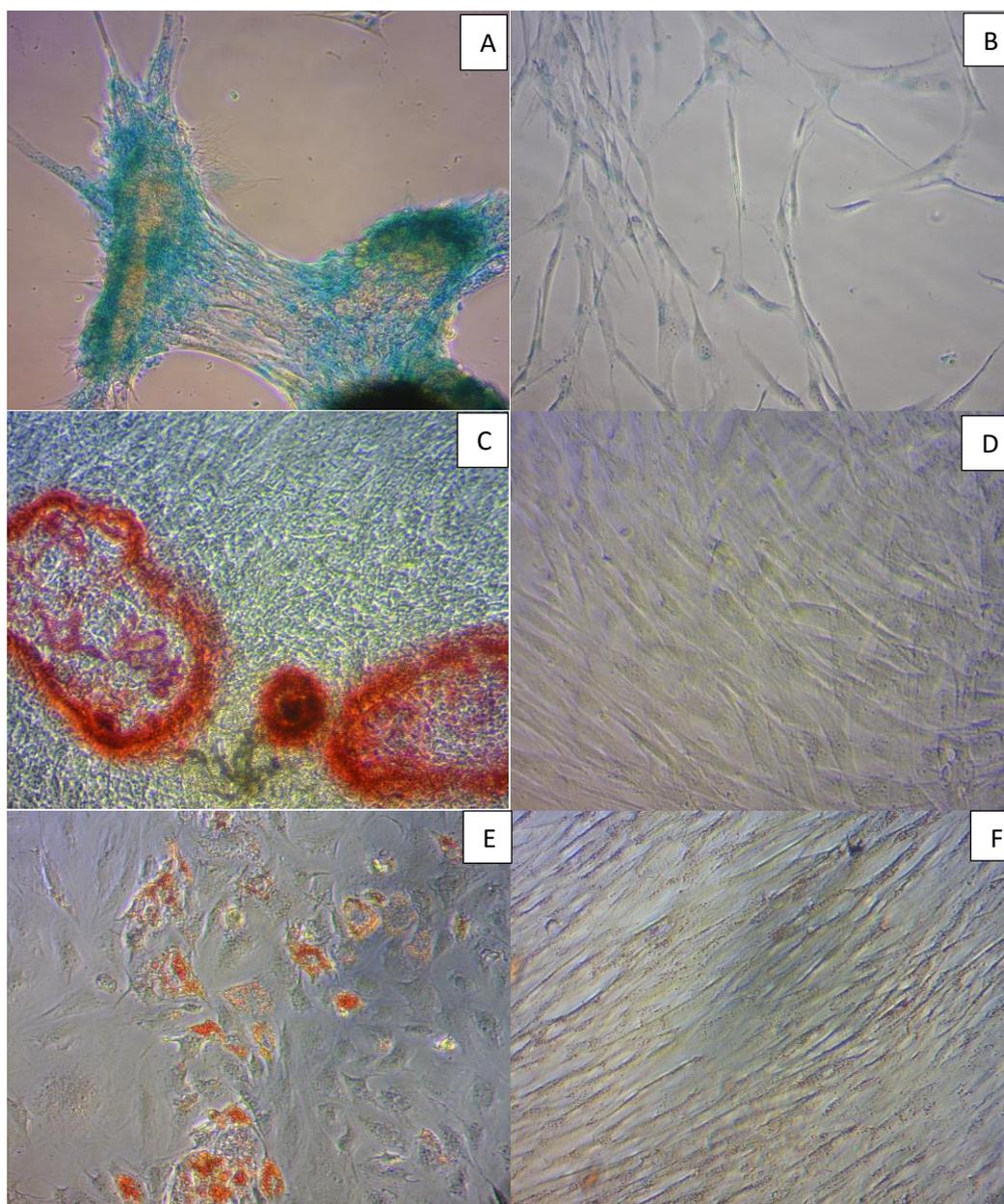


Figura 10: Diferenciação das células tronco derivadas do tecido adiposo (CTDA) - Linhagem 1. A - CTDA diferenciadas em tecido condrogênico e coloração Alcian Blue, aumento 100x. B- Controle negativo CTDA. C- CTDA diferenciadas em tecido ósseo e coloração Alizarin Red S, aumento 100x. D- Controle negativo CTDA. E- CTDA diferenciadas em tecido adiposo, presença de gotículas lipídicas em seu citoplasma, aumento 100x. F- Controle negativo.

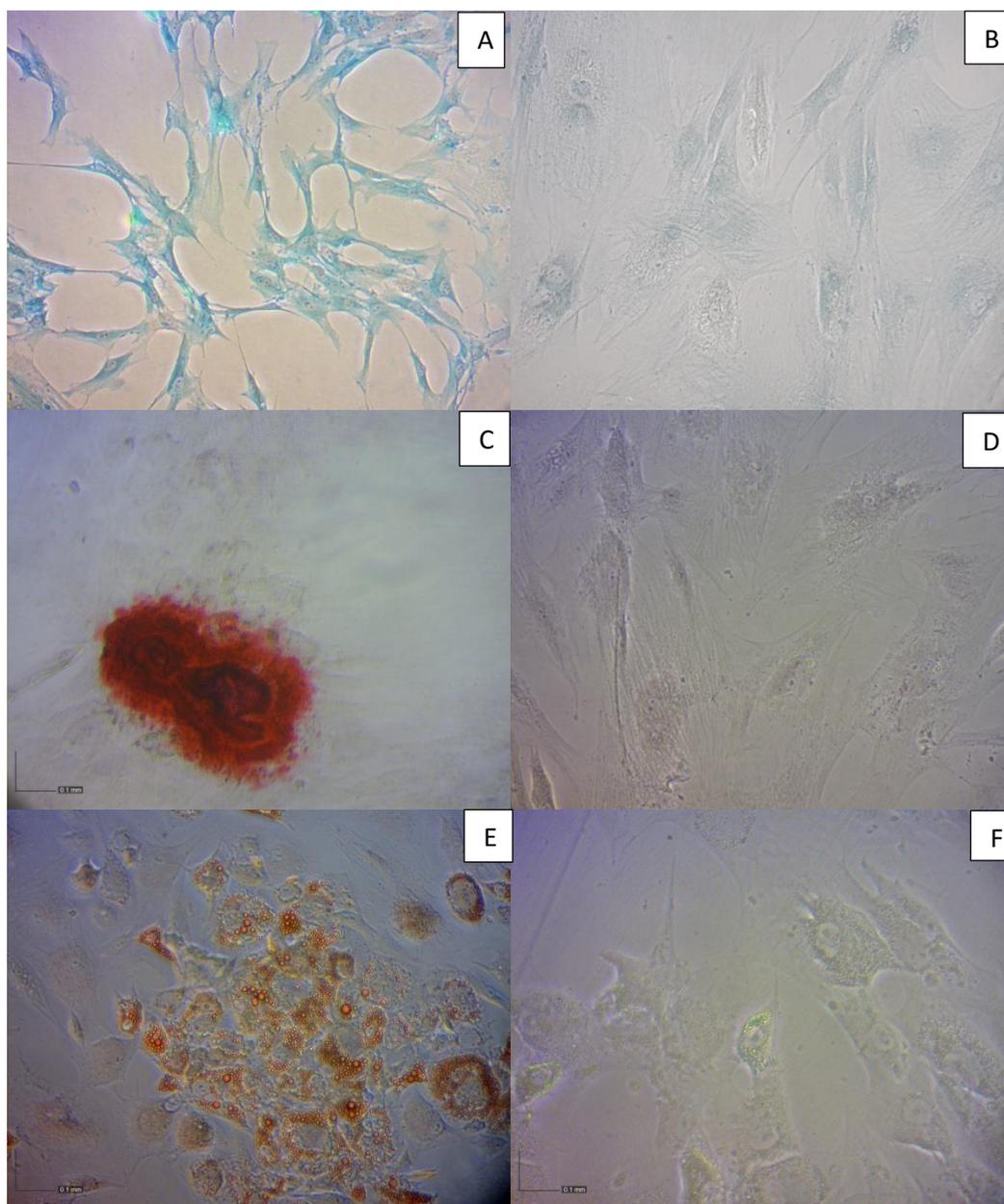


Figura 11: Diferenciação das células tronco derivadas do tecido adiposo (CTDA) - Linhagem 2. A- CTDA diferenciadas em tecido condrogênico e coloração Alcian Blue, aumento 100x. B- Controle negativo CTDA. C- CTDA diferenciadas em tecido ósseo e coloração Alizarin Red S, aumento 200x. D- Controle negativo CTDA. E- CTDA diferenciadas em tecido adiposo, presença de gotículas lipídicas em seu citoplasma, aumento 200x. F- Controle negativo.

5.4 Cultivo 3D

O cultivo celular tridimensional foi realizado com ambas linhagens celulares utilizando o molde MicroTissues® 3D Petri Dish® micro-mold spheroids size L, 9x9 array, no qual foi plaqueado um inóculo de 2×10^6 células por molde, totalizando, após 3 dias de crescimento, 81 esferoides. No primeiro dia de plaqueamento as células se agruparam nos micropoços, e após 24 horas a junção celular se tornou mais evidente, o que provocou a formação de um halo vazio ao redor do esferoide e a presença de uma fina demarcação circundando a massa celular.

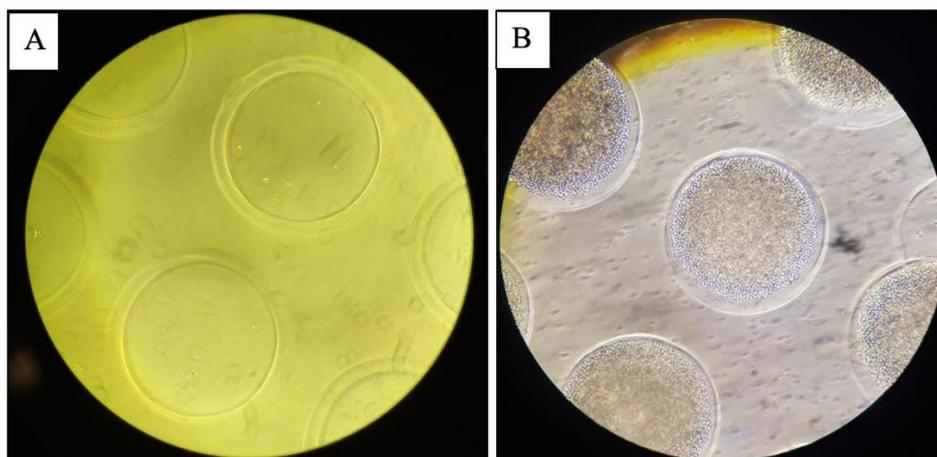


Figura 12: Imagens microscópicas da produção de esferoides onde: (A) Agarose micromoldada antes do plaqueamento e (B) moldes de agarose recém semeados com células.

Os esferoides de CTMs foram produzidos com êxito. Percebe-se que 24 horas após a semeadura das células nos micromoldes de agarose já é possível visualizar os esferoides bem formados, os quais permanecem dessa forma por até 72 horas, como pode ser visualizado na Figura 13.



Figura 13: Análise morfológica dos esferoides após 24 horas (A), 48 horas (B) e, 72 horas (C) do plaqueamento das células nos moldes de microagarose.

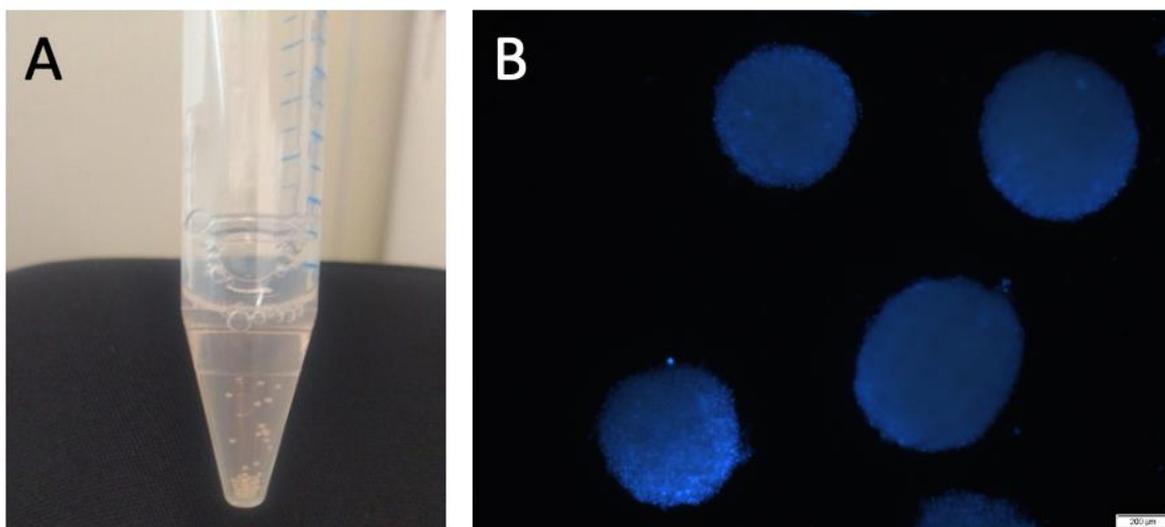


Figura 14: Esferoides já formados após 72 horas de cultivo. A- esferoides em suspensão prontos para serem visualizados; B- microscopia de fluorescência marcado com Hoescht 33342.

Na Figura 14B, os núcleos celulares de CTMs marcados com o corante fluorescente Hoescht 33342 são facilmente visualizados, demonstrando a grande quantidade de células presentes no esferoide.

Os esferoides de HaCat foram formados a partir do inóculo de 2×10^6 células plaqueadas no micromolde de agarose previamente moldado. A figura 15 evidencia esferoides de células com e sem coloração de DAPI.

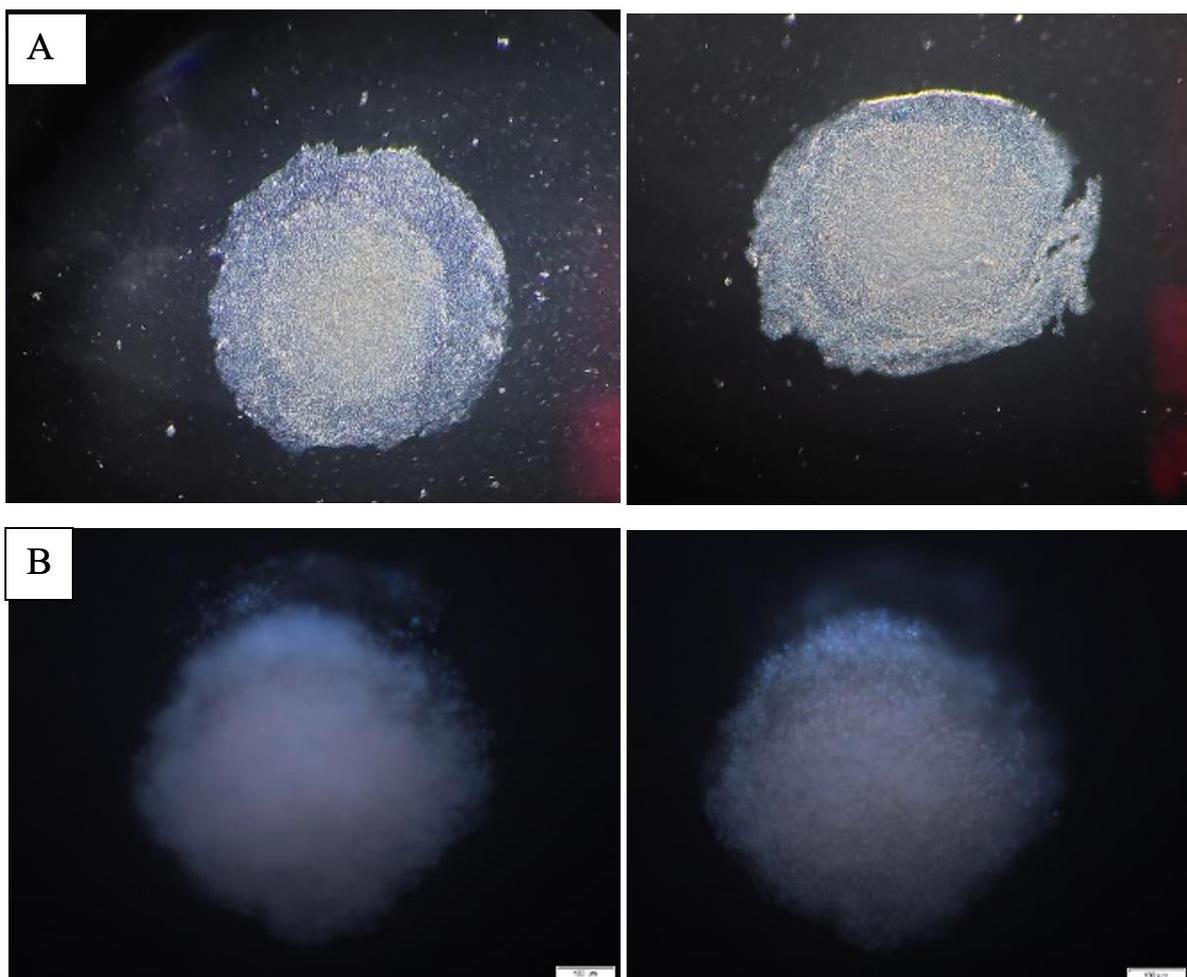


Figura 15: Esferoides formados por células HaCat. A- microfotografia do esferoide sem o uso de corantes. B- microfotografia após coloração por DAPI.

5.5 Fototoxicidade in vitro

A figura 16 mostra os resultados obtidos em 2 linhagens diferentes no estudo de pré-validação de sensibilidade das linhagens celulares HaCat e CTDA à irradiação medida na faixa UVA. As células foram irradiadas em diferentes tempos e as curvas do gráfico mostram as células com tolerância de irradiação aceitável. A partir dos parâmetros da figura 17, foi definida a maior dose de irradiação não citotóxica de 3,4 J/cm² (linha vertical), considerando a viabilidade celular observada das linhagens após 2h de exposição a radiação. A viabilidade celular foi mensurada pela absorbância do sal tetrazólio (XTT) que se correlaciona diretamente com o número de células viáveis, que está representada na figura em porcentagem (%) acima de 90%.

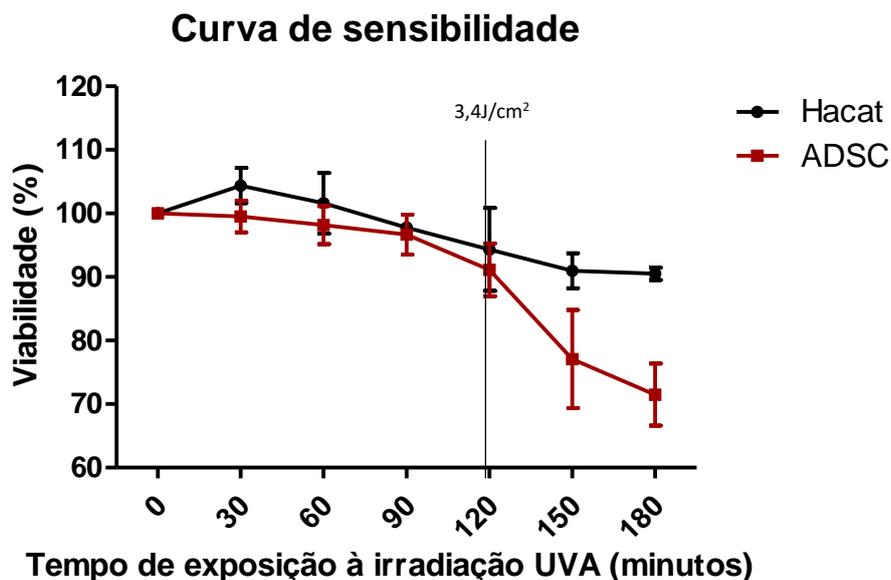


Figura 16: A sensibilidade de células HaCat (preto) e células tronco mesenquimais (vermelho) à irradiação utilizada no ensaio de validação do Teste de Fototoxicidade. Os valores aceitáveis em percentual foram estabelecidos para ambas as linhagens em acima de 90% após 2h de exposição a UVA.

Para esse ensaio, o teste atende aos critérios de qualidade se os controles de tratamento irradiado mostrarem uma viabilidade celular de mais de 80% quando comparados com o controle não irradiado. Um produto químico fototóxico conhecido padrão deve ser testado com cada teste de fototoxicidade *in vitro*. A clorpromazina (CPZ) é recomendada como controle positivo. A CPZ foi testada com o protocolo padrão adaptado para as linhagens HaCat e CTM no teste de fototoxicidade *in vitro* e foram definidos os seguintes critérios de aceitação do teste: CPZ irradiado (+ Irr): $IC_{50} = 0,1$ a $2,0$ g/mL; CPZ não irradiado (-Irr): $IC_{50} = 7,0$ a $90,0$ g/mL, segundo metodologias propostas pela Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 2004).

Foi testada e calculada a concentração na qual a viabilidade celular foi reduzida em 50% (IC_{50}). Um fator fotoirritante (Photo-Irritant Factor - PIF; IC_{50}) de 5,0 ou mais é indicativo de um composto com potencial fototóxico; um PIF menor que 5,0 e maior que 2,0 é indicativo de um composto com provável potencial fototóxico; e um PIF

inferior a 2,0 é indicativo de um composto sem potencial fototóxico. Os critérios de potencial fototóxico são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Critério de classificação de fototoxicidade proposta pela OECD 432 Guidelines, 2004 (Organisation for Economic Co-operation and Development) segundo um fator fotoirritante (Photo-Irritant Factor – PIF)

Variação PIF	Classificação
PIF < 2	Potencial não fototóxico
2 < PIF < 5	Provável potencial fototóxico
PIF > 5	Potencial fototóxico

PIF = Photo-Irritant Factor

Para cada ensaio de fototoxicidade, a absorção do XTT das células após o tratamento com o controle positivo de clorpromazina foi determinada na presença (+Irr) e ausência (-Irr) de irradiação. Os critérios de aceitação para o controle positivo clorpromazina e controle negativo são mostrados na Tabela 4. Os resultados obtidos estão dentro dos valores estabelecidos para controle positivo.

Tabela 4: Valores da Clorpromazina testadas nas linhagens de CTDA e HaCat.

Célula-tronco				
Controle	Métrica	Valor de Referência	Composto	Valor Mensurado
	Valor não-irradiado (IC50)	7,0 - 90,0µg/mL		7,305µg/mL
Controle Positivo	Valor irradiado (IC50)	0,1 - 2,0µg/mL	Clorpromazina	0,206µg/mL
	PIF (IC50 -Irr/ IC50 +Irr)	≥6		36,46
HaCat				
Controle	Métrica	Valor de Referência	Composto	Valor Mensurado
	Valor não-irradiado (IC50)	7,0 - 90,0µg/mL		12,57µg/mL
Controle Positivo	Valor irradiado (IC50)	0,1 - 2,0µg/mL	Clorpromazina	0,270µg/mL
	PIF (IC50 -Irr/ IC50 +Irr)	≥6		46,55

De acordo com as diretrizes da OECD, as concentrações de extrato de própolis vermelha testadas não apresentaram potencial fototóxico quando comparadas com o controle positivo (CPZ).

5.6 Irradiação UV e viabilidade celular

As duas linhagens de células foram tratadas por 24, 72 e 168 horas com concentrações crescentes de extratos de própolis vermelha e então foram expostas à

radiação UVA por 120 minutos. Após um período de 24 horas de recuperação, realizou-se a análise de XTT a fim de verificar a viabilidade das células. Os tempos determinados para os testes foram estabelecidos a partir de ensaios já realizados e amplamente estudado por nosso grupo de pesquisa utilizando extrato da própolis vermelha. Segundo a ISO 10993-5, um material desencadeia efeitos citotóxicos quando provoca uma redução da viabilidade celular superior a 30% no período de 24 horas. Ao comparar os resultados de viabilidade celular das concentrações testadas com a classificação dos padrões internacionais de avaliação para dispositivos médicos, foi possível observar que somente a concentração de 100µg/mL apresentou efeito citotóxico para as células HaCats e CTDA's em ensaios 2D, enquanto o ensaio 3D apresentou baixa ou nenhuma citotoxicidade durante as primeiras 24 horas, mostrando uma redução da viabilidade celular somente nos tempos de 72 e 168 horas de tratamento (Figuras 17 e 18). Nos diferentes tempos avaliados, observou-se que a viabilidade se manteve acima de 80% nas concentrações mais baixas (até 25 µg/mL) para as células testadas, em todos os períodos de análise.

Hacat

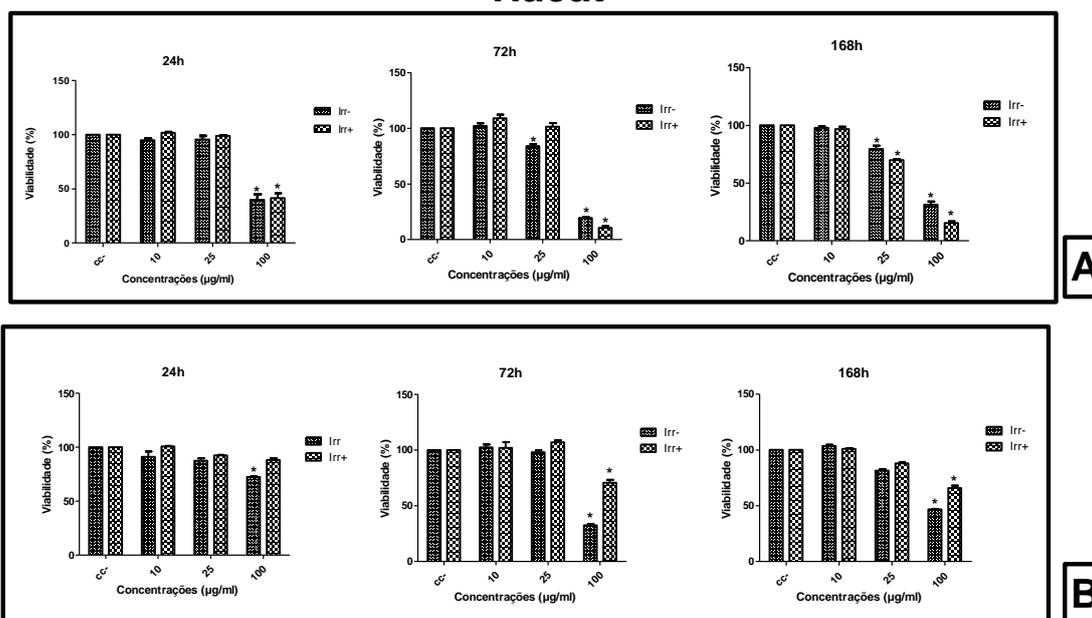


Figura 17: Efeitos de extrato da própolis vermelha sobre células HaCat. Comparação entre concentrações com irradiação UVA positiva (Irr+) e irradiação negativa (Irr-) e controles sem tratamento (cc-). As células foram irradiadas por 2 horas com $3,4J/cm^3$. A- Comparação dos efeitos de extratos da própolis vermelha na linhagem HaCat no ensaio 2D nos 3 tempos testados. B- Comparação dos efeitos de extratos da própolis vermelha na linhagem HaCat no ensaio 3D nos 3 tempos testados. Observa-se uma maior resistência do modelo 3D. Teste ANOVA seguido do teste de Tukey expressa valores como médias \pm DP e análise estatística (* $p < 0,05$ quando comparado ao controle da análise no tempo correspondente).

CTDA

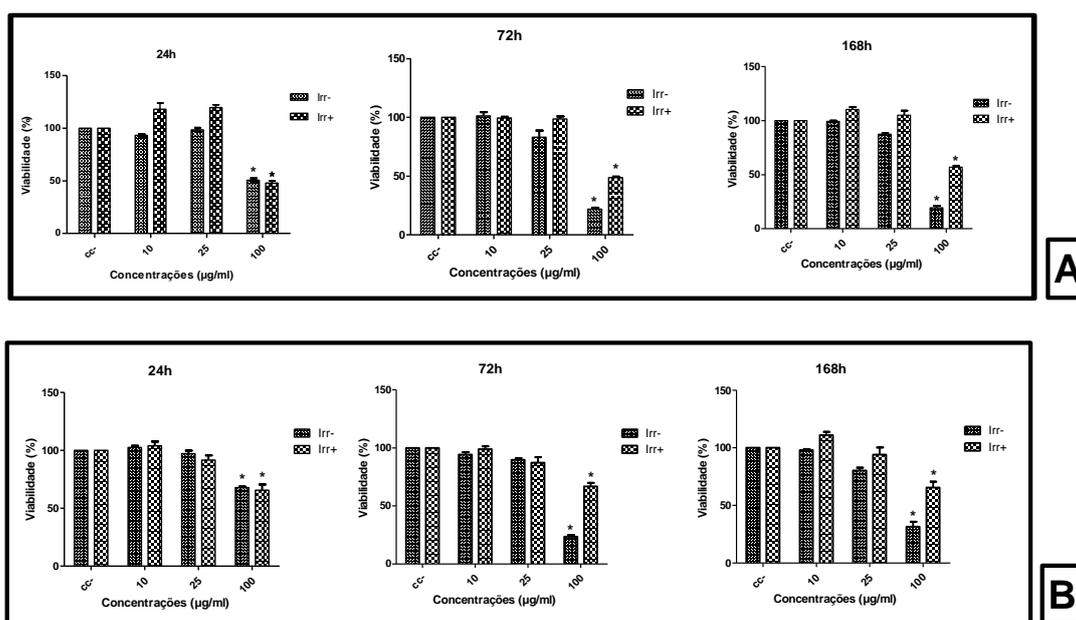


Figura 18: Efeitos de extrato da própolis vermelha sobre CTMs. Comparação entre concentrações com irradiação UVA positiva (Irr+) e irradiação negativa (Irr-) e controles sem tratamento (cc-). As células foram irradiadas por 2 horas com 3,4J/cm³. A- Comparação dos efeitos de extratos da própolis vermelha nas CTDAs no ensaio 2D. B- Comparação dos efeitos da própolis nas CTDAs no ensaio 2D. C- Comparação dos efeitos de extratos da própolis vermelha nas CTDAs no ensaio 3D. Teste ANOVA seguido do teste de Tukey expressa valores como médias ± DP e análise estatística (* p <0,05 quando comparado ao controle da análise no tempo correspondente).

Como pode-se observar na figura 18A, na linhagem de células HaCat no cultivo 2D nos tempos de tratamento com extratos de própolis vermelha testados, não apresentou diferença expressiva na viabilidade das células, frente ao grupo controle (também exposto à irradiação UVA, mas sem tratamento com extratos de própolis vermelha). O grupo em que utilizou 100 µg/mL de própolis vermelha obteve uma redução frente aos outros grupos tratados com extratos. Percebe-se também um declínio na viabilidade celular nas concentrações de 25 µg/mL e 100 µg/mL conforme o aumento do tempo de tratamento. Já na figura 18B, na cultura 3D da linhagem HaCat, observa-se uma resistência da linhagem celular para a concentração mais alta (100 µg/mL) além de um leve aumento proliferativo das células nas concentrações mais baixas (10 µg/mL e 25 µg/mL) em comparação ao grupo controle.

Analisando a Figura 19A pode-se perceber que a linhagem de CTM manteve a viabilidade na faixa dos 100% nas concentrações mais baixas (10 µg/mL e 25 µg/mL). Em contrapartida, a concentração de 100 µg/mL apresentou uma morte celular considerável. É importante ressaltar a presença de proliferação celular especialmente após a irradiação das células mesenquimais. Entretanto, na Figura 19B é possível visualizar que as células tratadas com concentrações de própolis vermelha no ensaio 3D mantiveram uma resistência maior em comparação ao ensaio 2D, mantendo-se semelhante ao grupo controle. Apesar da redução da viabilidade na concentração de 100 µg/mL, também foi possível verificar a diferença significativa na proliferação e/ou resistência das células após a irradiação UVA. Os extratos de própolis com concentração maior (100 µg/mL), tiveram um efeito deletério sobre as células. Ressalta-se que em concentrações iguais ou abaixo de 25 µg/mL parece haver um efeito protetor dos extratos de própolis vermelha, demonstrado pela viabilidade celular mantida e, após a exposição à irradiação UVA, as células apresentaram proliferação celular.

Outro aspecto que pode ser ressaltado no ensaio de irradiação e citotoxicidade celular, considerando a exposição à radiação UVA no período testado, observou-se redução da viabilidade celular em ambos os tipos celulares, ao comparamos irradiação negativa com a positiva nos ensaios 3D, enquanto nos ensaios 2D o padrão foi visualizado somente no controle e na concentração mais baixa (10 µg/mL). A viabilidade celular em todas as concentrações foi superior quando houve a exposição das células em doses de 3,4J/cm³.

5.7 Avaliação de apoptose celular

A apoptose é um processo essencial para a eliminação de células defeituosas, promovendo a manutenção das replicações celulares. A condensação do núcleo é uma das características das células em apoptose. A apoptose pode ser visualizada por marcação do núcleo em microscopia ou por detecção de corpos apoptóticos por citometria de fluxo, como avaliado neste estudo (figura 19). Após a delimitação da concentração alvo (10 µg/mL), levando em consideração os melhores resultados obtidos, a concentração de 25µg/mL foi excluída da análise. Células apoptóticas positivas para anexina V podem ser visualizadas nos quadrantes superiores e células em necrose positivas para anexina e PI no quadrante inferior direito. Os resultados indicam uma tendência para formação de células em necrose em concentração de extrato de própolis vermelha a 100 µg/mL.

A irradiação UVA pode ser entendida como um causador de estresse oxidativo, que promove a indução de apoptose celular. No entanto, o pré-tratamento com 10 µg/mL de própolis antes da irradiação UVA resultou em proteção contra a apoptose de células HaCaT e CTDA's induzida por UVA (Figuras 20 e 21).

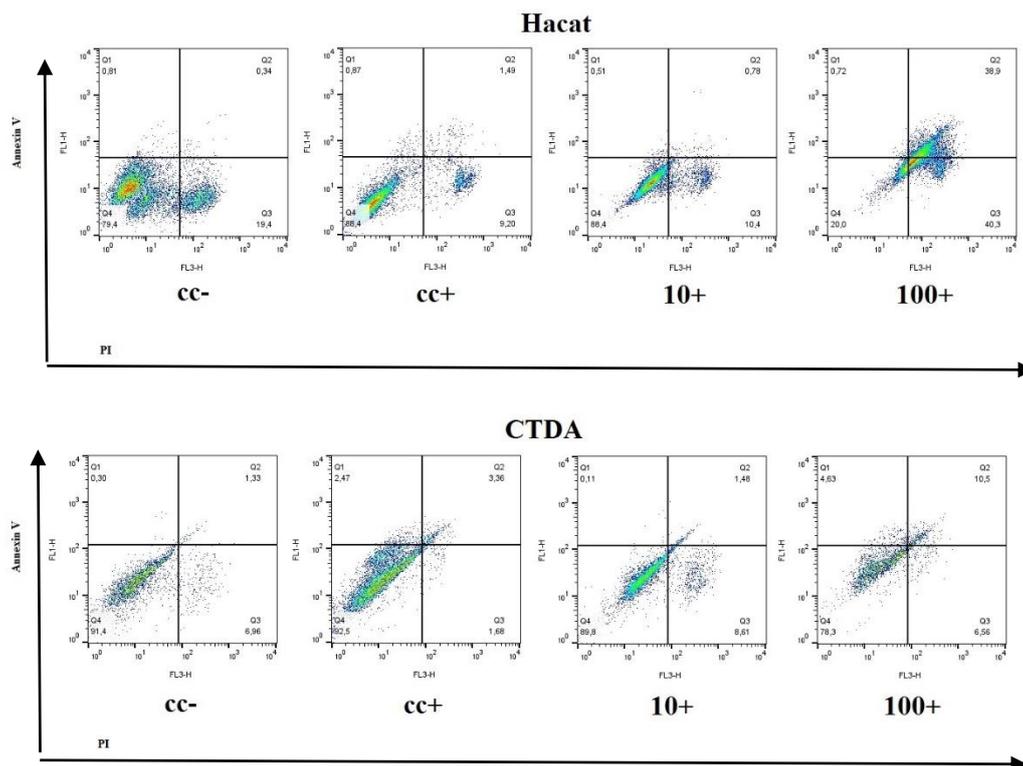


Figura 19: Imagens representativas das análises de apoptose e necrose utilizando Anexina V e Iodeto de Propídeo em citometria de fluxo com as linhagens HaCat e CTDA. Células apoptóticas positivas para anexina V podem ser visualizadas nos quadrantes superiores e células em necrose positivas para anexina e PI no quadrante inferior direito. CC- representa controle negativo sem tratamento e CC+ representa o controle positivo com DMSO 10%.

Contudo, ainda pode-se observar uma resistência e proteção ainda mais evidente nos ensaios 3D quando comparadas as linhagens durante o tratamento em ensaios 2D. Ambas as linhagens tratadas com extratos de própolis vermelha não apresentaram um significativo aumento de células apoptóticas ou necróticas ao comparar com o controle de células sem tratamento. Um aumento em eventos de morte celular, principalmente para apoptose e necrose, é evidente na concentração mais alta (100 $\mu\text{g/mL}$) em todos os tempos testados (Figuras 20 e 21).

Hacat

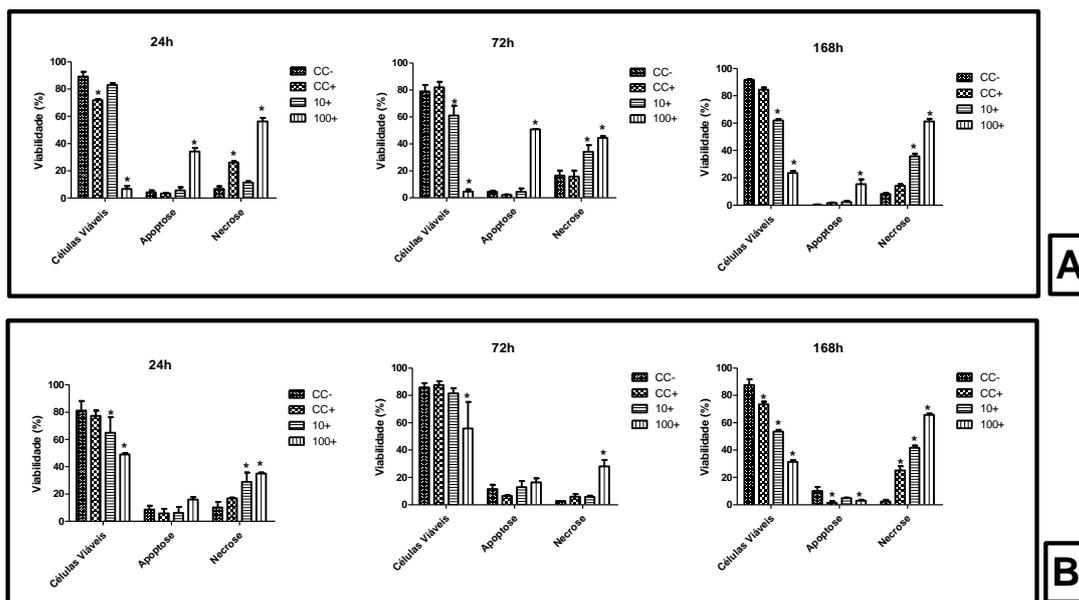


Figura 20: Efeitos de extrato da própolis vermelha na indução de apoptose e necrose celular em ensaios de citometria de fluxo. Comparação entre concentrações com irradiação UVA positiva (Irr+) e controles sem tratamento irradiados (CC+) e sem irradiação (CC-). As células foram irradiadas por 2 horas com $3,4\text{J}/\text{cm}^3$ após o tratamento. A- Comparação dos efeitos da própolis na linhagem HaCat no ensaio 2D nos 3 tempos testados. B- Comparação dos efeitos da própolis nana linhagem HaCat no ensaio 3D nos 3 tempos testados. Teste ANOVA seguido do teste de Tukey expressa valores como médias \pm DP e análise estatística (* $p < 0,05$ quando comparado ao controle da análise no tempo correspondente).

CTDA

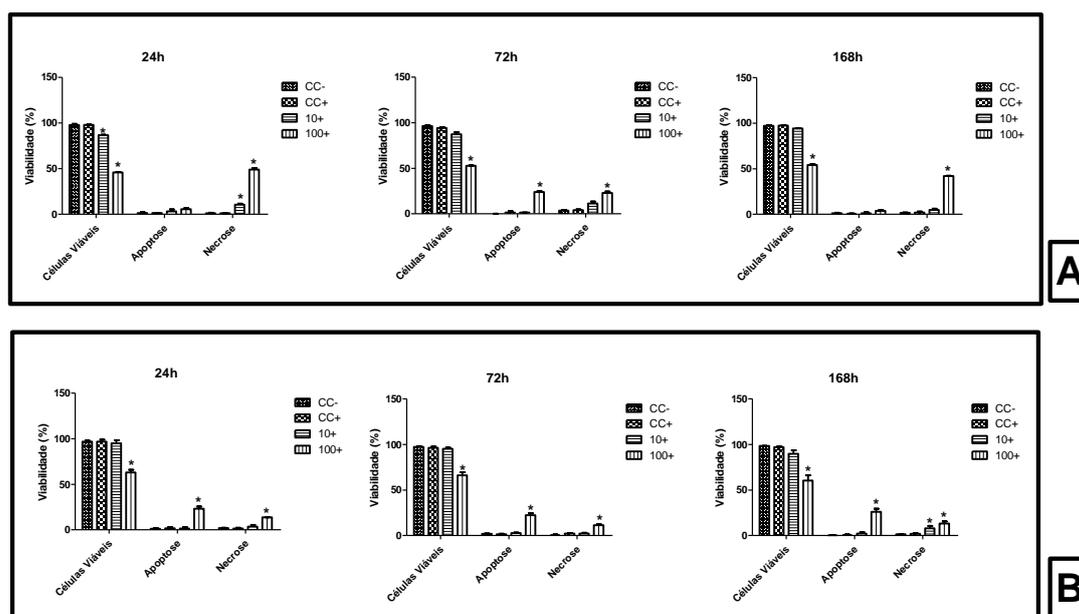


Figura 21: Efeitos de extrato da própolis vermelha na indução de apoptose e necrose celular. Comparação entre concentrações com irradiação UVA positiva (Irr+) e controles sem tratamento irradiados (CC+) e sem irradiação (CC-). As células foram irradiadas por 2 horas com 3,4J/cm³ após o tratamento. A- Comparação dos efeitos de extratos da própolis vermelha nas CTDAs no ensaio 2D nos 3 tempos testados. B- Comparação dos efeitos de extratos da própolis vermelha nas CTDAs no ensaio 3D nos 3 tempos testados. Teste ANOVA seguido do teste de Tukey expressa valores como médias \pm DP e análise estatística (* p <0,05 quando comparado ao controle da análise no tempo correspondente).

Ressalta-se que mesmo a irradiação ultravioleta-A sendo considerado um fator estressante e potencialmente indutor de morte celular, na concentração de 10 μ g/mL não pode-se observar quantidade considerável de células em apoptose ou necrose, promovendo uma proteção dessas células contra o fator estressor.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que as células tronco derivadas de tecido adiposo apresentaram inicialmente morfologia heterogênea com vários formatos distintos, dentre eles planas, estreladas, triangulares, mas que após alguns dias de cultura e algumas replicações, estas passaram a ter uma morfologia mais homogênea, apresentando características alongadas. De acordo com Lotfy et al. (2014), a morfologia de CTDAs em sua condição de cultura padrão mostra-se semelhante a fibroblastos e em formato fusiforme. O tempo de replicação entre doadores foi variável. Porém, pode haver uma diferença no tempo de replicação celular devido à passagem celular e variação genética dos doadores (Barlian et al., 2018).

Um desafio técnico na caracterização das CTMs é que não há um marcador positivo consistente e definitivo. Há uma gama ampla de marcadores positivos descritos, mas cada grupo de investigadores usa diferentes marcadores, nenhum deles específico ou exclusivo. Talvez as diferenças entre os estudos possam ser atribuídas a variações nos métodos de cultura ou ao estágio de diferenciação das células. De qualquer modo, sem marcadores definidos, os estudos *in vitro* das linhagens celulares perde em fatores comparativos (Bydlowski et al., 2009). Neste estudo, as células isoladas de lipoaspirado foram testadas por citometria de fluxo e apresentaram marcações positivas para os CDs positivos utilizados (CD90, CD73 e CD29), com

variações devido à baixa fluorescência de um dos anticorpos. O mesmo conjunto de células marcou negativo para os CDs negativos utilizados (CD34 e CD45). A literatura parece mostrar um consenso quanto as CTM humanas adultas não expressam os marcadores hematopoéticos CD45 (marcador de todas as células hematopoéticas), CD34 (um marcador de célula-tronco hematopoética primitiva, raramente expressa em CTMs humanas, apesar de ser positiva em camundongos). Expressam níveis variáveis CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD90 (Thy-1), assim como as moléculas de adesão CD29. Estes são alguns dos marcadores expressos ou não, descritos em literatura (Liu, Zhuge e Velazquez, 2009). Para que a caracterização das células tronco mesenquimais esteja enquadrada nos protocolos da literatura, as amostras devem expressar marcadores positivos superiores a 90% da população celular, enquanto os marcadores negativos devem estar abaixo de 2% (Dominici et al., 2006). O resultado apresentado neste estudo mostrou que as CTMs expressaram porcentagens de marcadores aceitas pelos critérios determinados.

Foi realizada a caracterização por citometria de fluxo e foi demonstrado que as CTMs mostraram expressão baixa ou negativa para todos os marcadores de células hematopoéticas. Os resultados coincidem com os observados por Jin S, *et al.* (2015) e atendem aos critérios de classificação para CTM de acordo com a International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT) e da International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS).

Nesse trabalho, todas as amostras de CTMs apresentaram capacidade de diferenciação para tecido osteogênico, adipogênico e condrogênico de forma bem estabelecida, conforme critério de aceitação já descrito em literatura. Os resultados encontrados vão de acordo com os apresentados por Neybecker P. *et al.*, (2020) e Pittenger MF. *et al.*, (1999). A identificação das CTMs baseadas em suas características morfológicas e a capacidade das células em formar estes três tipos celulares é o único critério disponível para identificar CTMs genuínas e diferenciá-las de preosteoblastos, preadipócitos ou precondrócitos, que dão origem somente ao tipo celular pré-determinado. Mas também teriam o potencial de diferenciação endodérmico e neuroectodérmico (Bydlowski et al., 2009; Kolf, Cho e Tuan, 2007).

Estudar as interações entre células e potenciais tratamentos *in vitro* é de grande importância para a determinação das propriedades biológicas sua aplicação em diversos

processos, como exemplo pode-se destacar o tratamento para feridas de queimaduras e regeneração tecidual. Além disso, o uso tópico de um potente agente antimicrobiano, anti-inflamatório e regenerador à base de extratos de própolis brasileira torna-se uma alternativa vantajosa durante o processo de regeneração tecidual, uma vez que as infecções são responsáveis por 75% das mortes em pacientes com lesões cutâneas. Com isso, a investigação da viabilidade celular das células irradiadas com UVA e tratadas com própolis apresentam um resultado promissor. A própolis vermelha é alvo de diversos estudos do nosso grupo, com a finalidade de comprovar seu potencial em tratamentos celulares. Esta se demonstrou ser promissora e eficaz na busca de tratamentos para regeneração celular e tecidual.

O fato de que a radiação UVA ser pouco absorvida pelos nucleotídeos canônicos, causa muito menos danos diretos ao DNA do que o UVB. No entanto, a UVA ainda pode ser absorvida por outros cromóforos celulares, gerando espécies fotoexcitadas como oxigênio singlete, bem como radicais livres, e consequentemente causando danos oxidativos nas células (Schuch et al., 2017; Baier et al., 2006). A irradiação UVA aumenta a liberação de fatores inflamatórios, incluindo IL10 a partir de células de queratinócitos (Schneider et al., 2017). Nesse contexto, as células do presente estudo foram irradiadas sob as mesmas condições durante diferentes tempos, a fim de determinar qual a maior potência de irradiação UVA sem diminuir a viabilidade das células abaixo de 90% das duas linhagens testadas.

Com isso, segundo metodologias propostas pela Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 2004), entende-se o um tratamento alvo, com extratos da própolis vermelha atende aos critérios de qualidade se os controles do tratamento irradiado mostrarem uma viabilidade acima de 80% quando comparados com o controle não irradiado. Com base nos testes realizados, os extratos da própolis vermelha testados não apresentaram fototoxicidade nas células durante o período de tempo testado.

O equilíbrio da epiderme depende da capacidade proliferativa e de diferenciação dos queratinócitos, que são o principal tipo celular desta camada da pele e estão em constante renovação. Embora a ação do UVB na epiderme seja bem definida, os mecanismos celulares induzidos pelo UVA subjacentes às alterações epidérmicas durante o fotoenvelhecimento não são tão bem compreendidos (Fitsiou et al., 2020).

O ensaio de fototoxicidade *in vitro* foi utilizado para identificar o potencial fototóxico induzido por uma substância excitada após exposição à luz. O teste avalia foto-citotoxicidade pela redução relativa na viabilidade de células expostas ao tratamento na presença versus ausência de luz. Entende-se que as substâncias identificadas por este teste sejam fototóxicas também *in vivo*, após aplicação sistêmica e distribuição na pele, ou após aplicação tópica (OECD, 2004).

Para que esse teste seja comprovado, é necessária a utilização de um composto fototóxico conhecido para controle. A Clorpromazina (CPZ) é recomendada pela OECD. O espectro de ação UV do CPZ *in vivo* se estende de 330 nm a 380 nm. A reação fototóxica *in vitro* é independente do oxigênio. Após a irradiação ultravioleta, o CPZ forma um radical livre estável, e foi proposto que este próprio radical ou seus produtos de polimerização sejam responsáveis pela ação fototóxica (Hunter, Bhutani e Magnus, 1970; Kochevar e Lamola, 1979; Forrest, Forrest e Berger, 1958). A Clorpromazina foi utilizada durante a realização destes ensaios, a fim de comprovar o seu efeito fototóxico e, assim, mensurar a fototoxicidade das células após exposição a própolis vermelha. Sendo assim, os testes realizados com a CPZ demonstraram que os resultados obtidos são compatíveis para a utilização da CPZ como controle positivo.

Foi demonstrado que doses altas de UVA induzem apoptose em queratinócitos epidérmicos, mas até o momento o impacto de baixas doses de UVA no fotoenvelhecimento epidérmico não foi bem caracterizado (Fitsiou et al., 2020; Assefa et al., 2005). Após irradiar as células com doses de 3,4J/cm², através da marcação com XTT, nos testes realizados com extratos da própolis vermelha demonstraram uma viabilidade superior a 80% nas concentrações de 5µg/mL, 10µg/mL e 25µg/mL. Este resultado é ainda mais significativo quando comparados entre células expostas e não expostas à irradiação UVA. Pôde-se perceber que em algumas concentrações de extratos da própolis vermelha testadas, após a irradiação, houve uma viabilidade superior em comparação às células não irradiadas. Este fator pode estar relacionado a uma resistência maior dessas células e/ou a proliferação dessas células após a exposição à irradiação UVA. Segundo Assefa e colaboradores (2005), as células viáveis desenvolvem uma série de mecanismos para neutralizar os danos ao DNA causados por estressores ambientais, incluindo a luz UV. Isso sugere que as células irradiadas possivelmente ativaram mecanismos de defesa celular, para evitar a morte das células que sofreram danos. Ainda assim, as células tratadas com as concentrações mais baixas

de extratos da própolis vermelha (10µg/mL) demonstraram ser potencialmente protetoras para as linhagens testadas.

A exposição da pele aos raios UVA aumenta os níveis celulares de espécies reativas de oxigênio gerados por processos fotossensibilizadores, que têm sido associados à apoptose e ao dano de proteínas celulares, lipídios e polissacarídeos, e também pode indiretamente causar danos estruturais ao DNA (Syed et al., 2006; Andreassi e Andreassi, 2004; Pillai et al., 2005). Estudos prévios também demonstraram que os flavonoides (incluindo flavonas, flavonoides, flavanonas e diidroflavonois) e vários ácidos fenólicos (principalmente ácidos cinâmicos substituídos e seus ésteres) são os constituintes ativos mais importantes da própolis vermelha, possuindo atividades antioxidantes potentes e têm comprovada capacidade de remover (ou desativar) radicais livres, além de serem capazes de proteger lipídios e vitamina C de serem destruídos no processo oxidativo (Moreno et al., 2000; Kumazawa, Hamasaka e Nakayama, 2004; Banskota et al., 2001; Mohammadzadeh et al., 2007; Wojtunik-Kulesza et al., 2016; Attia et al., 2012; Frozza et al., 2013).

As concentrações mais baixas (5µg/mL, 10µg/mL e 25µg/mL) dos extratos de própolis vermelha apresentaram também um aumento significativo da proliferação celular nas linhagens testadas, demonstrando um efeito protetivo da própolis nas células irradiadas. Os resultados obtidos coincidem com os resultados demonstrados por Kim e Yoo (2016), em que extratos da própolis vermelha em concentrações até 10µg/mL possuem efeitos protetivos em ensaios *in vitro*, podendo prevenir a disfunção mitocondrial de células HaCaT irradiadas com UVA.

É importante ressaltar que nas duas linhagens celulares avaliadas neste estudo foi observado que a viabilidade e sobrevivência celular se manteve superior à mesma condição sem irradiação. Estudos realizados por Liu e colaboradores (2012) demonstram que doses baixas de UVA (7,2J/cm²) foram denominadas como uma dosagem que não afeta a morfologia e o crescimento de células. Os mesmos autores sugerem que baixas doses de radiação UVA podem induzir uma resposta adaptativa protegendo as células de danos subsequentes de dosagens letais de UVA. Durante muito tempo, os UV foram considerados prejudiciais para células e organismos, mas desde há algumas décadas a estimulação da proliferação celular pela radiação UVA em doses de 3 a 9 kJ/m² ficou conhecida, no entanto, os mecanismos subjacentes a este fenômeno não são completamente compreendidos (Han et al., 2011 e Grossman et al., 1998;

Berton et al., 1997; Liu et al., 2012; WHO, 2002; IARC, 2005). É possível que o aumento da porcentagem de células que sobrevivem após a exposição à irradiação UVA neste estudo se refere a indução da proliferação celular, já que o número de células apoptóticas mostrou-se muito pequena e sua diminuição não causaria alteração significativa o suficiente para ser detectado por ensaio de indução apoptótica com marcação com Anexina V e PI, por citometria de fluxo.

Em um estudo publicado por Cornelius et al. (1985), descrevem que o eritema é a resposta fotoquímica mais comum da pele após exposição a comprimentos de onda nas regiões UVC e UVB. No entanto, o eritema pode ser produzido pela exposição apenas à radiação UVA em exposições radiantes muito elevadas ($> 10 \text{ J/cm}^2$). Segundo Murray e colaboradores, 2016, a dosagem de 100 kJ/m^2 (ou 10 J/cm^2) de UVA é fisiologicamente relevante, pois é alcançada após aproximadamente uma hora de exposição solar durante o verão, sendo assim, a dosagem alvo utilizada no presente estudo ($3,4 \text{ J/cm}^2$) representaria em média 20 minutos de exposição solar durante o verão. Apesar de a irradiação solar ser composta por UVA e UVB, a irradiação UVA exerce sua toxicidade pela geração de ROS, que pode ter sido neutralizada pelos mecanismos de defesa inatos das células, bem como a presença de compostos provenientes do extrato da própolis vermelha nos resultados apresentados. Enquanto o UVB é mais genotóxico por afetar diretamente o DNA celular (Sample e He, 2018; Sun et al., 2020). Estudos sugeriram que a fototoxicidade da UV nos queratinócitos epidérmicos depende do tipo e dosagem da radiação, com maior dano celular sendo causado pelo UVB em doses mais baixas em comparação com o UVA (Bajgar et al., 2021).

Ao contrário de uma cultura celular em monocamada, um esferóide 3D é um modelo apropriado para imitar o ambiente real das células tumorais e a taxa de difusão de nutrientes entre as células. Esferoides tumorais multicelulares nos permitem estudar o mecanismo bioquímico de crescimento celular, reações enzimáticas e diversas modalidades de tratamento (Kapałczyńska e Kolenda, 2018; Vörsmann, 2013 e Lagies et al., 2020). As respostas de células à irradiação UVA foram diferentes no ambiente 2D versus 3D, destacando a importância do ambiente de colágeno na regulação das atividades mecânicas. O comportamento após estimulação mecânica mimetiza de perto o ambiente extracelular estressado. O modelo de células irradiados com UVA cultivados em gel de colágeno 3D tenso ilustrou a situação *in vivo* da pele humana

estressada mecanicamente e fotoenvelhecida (Nakyai et al., 2018). Isso vai de acordo com os comparativos da cultura celular 3D com a monocamada celular encontrados nesse trabalho, que revelou algumas diferenças nas respostas das células quando irradiadas além de características fisiológicas e morfológicas específicas, como diferenças na proliferação, resistência e necrose.

Vale ressaltar que nos ensaios realizados, mostraram que as CTMs apresentaram uma maior estabilidade e resistência quando irradiadas com UVA, esses resultados vão de acordo com os encontrados por Perez e colaboradores (2019) que afirmam que as CTMs demonstraram efeitos benéficos em relação à regeneração de danos cutâneos induzidos por UV, estas são relativamente resistentes à exposição UV e preservam em grande parte as características das suas células estaminais.

Os ensaios com células 3D buscam se assimilar à um modelo mais próximo e realista de um modelo de pele *in vitro*. A epiderme é a camada mais superficial da pele, constituída de epitélio pavimentoso estratificado queratinizado (queratinócitos – como é a HaCat) e possui camadas de células epiteliais bem organizadas. Os raios UVB penetram até a camada da epiderme. Já a UVA penetra na derme, a camada de tecido conjuntivo, abaixo da epiderme, no qual estão imersos os anexos cutâneos, vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. Delgado e colaboradores (2006), demonstraram que os valores típicos de profundidades de penetração óptica (δ) para comprimentos de onda vai de 280 a 400 μ m para UVA (350 - 400nm) atingindo a derme e de 7 a 28 μ m para UVB (280 - 300 nm) atingindo a epiderme.

O molde utilizado para a formação dos esferoides neste trabalho (Molde MicroTissues® 3D Petri Dish® micro-mold spheroids), gera 81 esferoides por molde com dimensões de 800 μ m x 800 μ m, permitindo assim, uma maior atuação, penetração e consequente proteção no modelo 3D, isto porque a radiação UVA penetra mais fundo e alcança os esferóides em profundidade. Sendo assim, Gęgotek e colaboradores (2019) demonstraram que células cultivadas em 2D e tratadas com compostos orgânicos expostas à radiação UV exibiram um efeito mais acentuado nos níveis de proteínas envolvidas na resposta antioxidante e na inflamação. Por outro lado, as células cultivadas em 3D mostraram uma maior resposta à ação do tratamento contra as alterações induzidas pelos UV, que se basearam na ativação de vias de sinalização. Portanto, o modelo 3D irradiado com UV proporcionou uma nova visão sobre a

natureza da interação célula-célula, bem como sobre a alteração do metabolismo das células da pele.

Embora os modelos de pele 3D sejam geralmente projetados para simular a epiderme ou toda a pele humana, nenhum deles está atualmente aprovado para testes de absorção cutânea, um ponto importante quando avaliamos os efeitos tóxicos (Abd et al., 2016). No entanto, estes modelos são ferramentas importantes para a realização de testes de triagem e, assim, redução de experiências com animais (Nakyai et al., 2018).

O presente estudo demonstrou a importância e o interesse da utilização de extratos de própolis vermelha para o tratamento de células de pele como potencial protetor e reparador celular e tecidual. Estudos também corroboram demonstrando que a adição de extratos da própolis vermelha em protetores solares com filtro UV incorporado, apresentam um aumento relativo do FPS e da possível atividade antioxidante, levando a maior proteção da pele, o que sugere sua indicação para uso em produtos fotoprotetores (Almeida et al., 2019). Além disso, estudos realizados pelo grupo já demonstraram que tratamentos com extratos de própolis vermelha em CTMs demonstram ser vantajosos para aplicações regeneradoras, como curativos oclusivos para diversos defeitos cutâneos (Garcia et al., 2021; Picolotto et al., 2019; de Moura, 2011).

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo evidenciam que o extrato de própolis vermelha pode proteger os queratinócitos e células-tronco dos efeitos deletérios multifacetados da UVA. Doses baixas de UVA podem estimular respostas adaptativas das células induzindo mecanismos de proteção e proliferação. Assim, extratos da própolis vermelha podem ser considerados candidatos promissores para o desenvolvimento de produtos cosméticos novos e altamente eficazes. De igual modo, tratamentos utilizando própolis em conjunto com baixas dosagens de irradiação podem ser explorados, a fim de estimular proliferação celular em busca de tratamentos alternativos para a medicina regeneradora. Estudos na literatura e também explorados pelo nosso grupo com extratos da própolis vermelha reportam propriedades antioxidantes, antimutagênicas e de antienvhecimento. Estas atividades biológicas estão relacionadas direta e indiretamente aos resultados de proteção evidenciados dos extratos da própolis vermelha nos dois modelos celulares testados neste estudo. Os resultados aqui expostos fornecem evidências de que a utilização de extratos da própolis vermelha não causa fototoxicidade nas linhagens testadas e nas condições de uso pretendidas. Esses resultados concordam com análises anteriores que já vem sendo avaliadas por nosso grupo, os quais sugerem que a utilização dos extratos da própolis vermelha como um produto oclusivo para tratamentos tópicos de pele é viável e não ocasiona irritação da pele ou induzem a sensibilização deste tecido. Ressalta-se também que as células no modelo 3D obtiveram uma melhor resistência e proliferação celular, quando comparadas ao modelo 2D, isso sugere que a atuação da irradiação UVA sob o arranjo tridimensional destas células permita uma penetração às camadas interiores de células, de maneira que não acontece no modelo 2D. Sendo assim, o modelo 3D, sendo um modelo mais aproximado de um tecido *in vivo*, apresenta uma resistência a fotosensibilidade com resultados ainda mais interessantes quando associados à tratamentos com concentrações baixas de própolis vermelha (10 µg/mL).

No entanto, um estudo mais aprofundado para entendimento das diferenças de viabilidade entre células irradiadas e não irradiadas precisa ser realizado além de se fazerem necessárias pesquisas futuras para validar ainda mais as atividades biológicas dos extratos de própolis vermelha, definir detalhadamente o mecanismos molecular de ação subjacente e vincular suas ações citoprotetoras com a elucidação estrutural de seus ingredientes ativos, bem como avaliar os efeitos da irradiação UVA na estrutura celular

das linhagens HacaT e CTDA e a formação de radicais livres de oxigênio, afim de comprovar a eficácia e a segurança da utilização da própolis e irradiação UVA como fonte terapêutica em humanos.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar espécies reativas de oxigênio (ROS) através de citometria de fluxo para comprovar o efeito da irradiação nas duas linhagens testadas;
- Verificar potencial de membrana das células em ensaios de fluorescência *in situ* e pela técnica de citometria de fluxo com o intuito de analisar as alterações morfológicas e células defeituosas após tratamento e irradiação;
- Verificar a fragmentação de DNA para determinar se a irradiação UVA e tratamento com própolis afetaram as células testadas causando algum dano ao DNA;
- Verificar a possibilidade de construção de um modelo 3D híbrido contendo as duas linhagens celulares e verificar fatores de proteção e resistência;
- Avaliar as estruturas celulares e possíveis alterações por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afaq, F. *Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 2011; 508: 144-151.
- Almeida, WAS. *et al.* *Photoprotective activity and increase of SPF in sunscreen formulation using lyophilized red propolis extracts from Alagoas*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Ouro Preto, v. 29, n. 3, p. 373-380, 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2019.02.003>.
- Alves, EA.; Guimarães, ACR. *Cultivo celular*. In: Molinaro, EM.; Caputo, LFG.; Amendoeira, MRR.(Org.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. v.2. Rio de Janeiro: EPSJV. 2010; p. 215-253.
- Amaral, JB; Machado-Santelli, GM. *A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen*. **Naturalia**, 2011; v. 34, p. 1–20.
- Andreassi, M.; Andreassi, L. *Antioxidant in dermocosmetology: from the laboratory to clinical application*. **J. Cosmet. Dermatol.** 2004; 153–160.
- Ansorge, S., Reinhold, D., Lendeckel, U. *Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells*. **Z. Naturforsch. C**, 2003;58(7-8):580-589
- Arora, R. *et al.* *Radioprotective and antioxidant properties of low-altitude Podophyllum hexandrum (LAPH)*. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, 2005;24, 299-314.
- Arthey S.; Clarke VA. *Suntanning and sun protection: a review of the psychological literature*. **Social Science & Medicine** 1995; 40: 265-274
- Assefa, Z. *et al.* *Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: On the role of cytosolic factors*. **Biochim. Biophys. Acta (BBA) Rev. Cancer** 2005; 1755:90–106.
- Atoui, AK. *et al.* *“Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile,”* **Food Chemistry**, 2005; vol. 89, no. 1, pp. 27–36.
- Attia, AA.; ElMazoudy, RH., & El-Shenawy, NS. *Antioxidant role of propolis extract against oxidative damage of testicular tissue induced by insecticide chlorpyrifos in rats*.

Pesticide Biochemistry and Physiology, 2012; 103(2), 87-93.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.04.002>

Bai, J.; Meng, Z. *Expression of apoptosis-related genes in liver from rats exposed to sulfur dioxide*. **Toxicology** 2005; 216, 253–260.

Bai, J; Meng, Z. *Effects of sulfur dioxide on apoptosis-related gene expressions in lungs from rats.* **Regulatory toxicology and pharmacology**, 2005; v. 43, n. 3, p. 272-279.

Baier, J. *et al.* *Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers*. **Biophys J** 2006; 91, 1452–1459.

Bajgar, R.; Moukova, A.; Chalupnikova, N.; Kolarova, H. Differences in the effects of broad-band UVA and narrow-band UVB on epidermal keratinocytes. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021, 18, 12480. [CrossRef]

Bankova, V. *Chemical diversity of propolis and the problem of standardization*. **J. Ethnopharmacol.**, 2005; v.100, p. 114-117.

Banskota, AH. *et al.* *Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis*. **Phytomedicine**, 2001; 8, 16-23.

Barbosa, MH. *et al.* *Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas*. **Acta Paul.Enferm.**, 2009; v.22, n. 3, p. 318-322.

Barreto, ALS. *Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos*. [Dissertação] **Universidade Tiradentes**; 2008.

Batista, EKF. *et al.* *Influência da própolis sobre os perfis leucocitário e proteico de camundongos e tempo de fechamento de feridas excisionais limpas e infectadas por Staphylococcus aureus*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, 2015; v. 17, n. 3, p. 413-419.

Bazaliński, D. *et al.* *Zastosowanie larw Lucilia sericata w oczyszczaniu ran przewlekłych – opis trzech przypadków*. **Leczenie Ran** 2018, 15, 153–159.

Benkovic, V. *et al.* *Enhanced antitumor activity of irinotecan combined with propolis and its polyphenolic compounds on Ehrlich ascites tumor in mice*. **Biomed. Pharmacother.**, 2007; 61, 292-297.

Benkovic, V. *et al.* Radioprotective effects of propolis and quercetin in c-irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay. **Phytomedicine**, 2008;15, 851- 858.

Bernards, MT., Jiang, S. pH-induced conformation changes of adsorbed vitronectin maximize its bovine aortic endothelial cell binding ability. **J. Biomed. Mater. Res. A**, 2008;87(2):505-514.

Berneburg M.; Krutmann J. Photoimmunology, DNA repair and photocarcinogenesis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 2000; 54: 87-93.

Berton TR. *et al.* Epidermal proliferation but not quantity of DNA photodamage is correlated with UV-induced mouse skin carcinogenesis. **J Invest Dermatol.** 1997; 109:3407.

Bickers DR.; Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **J Invest Dermatol.** 2006 Dec;126(12):2565-75. doi: 10.1038/sj.jid.5700340. PMID: 17108903.

Bissel MJ. *et al.* The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. **Differentiation; research in biological diversity.** 2002; v. 70, n. 9-10, p. 537-46.

Blau, HM.; Brazelton, TR.; Weimann, JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? **Cell.** 2001; Jun 29;105(7):829-41.

Bobis, S.; Jarocha, D.; Majka, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochem Cytobiol.** 2006;44(4):215-30.

Bonina, F. *et al.*, "Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage," **International Journal of Pharmaceutics**, 1996; vol. 145, no. 1-2, pp. 87–94.

Bonucci, J. *et al.* The role of vitamin C in the gene expression of oxidative stress markers in fibroblasts from burn patients. **Acta Cir. Bras.** 2018, 33, 703–712.

Borenfreund, E.; Puerner, JA. Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Lett.**, 1985;24, 119-124.

Boudon, SM. *et al.* Evaluation of Sparfloxacin Distribution by Mass Spectrometry Imaging in a Phototoxicity Model. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, 2014;25, 1803-1809.

Boukamp, P. *et al.*, Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **J Cell Biol.** 1988, 106, 761–771.0

Bourin P, et al. *Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)*. **Cytotherapy** 2013; 15:641–648.

Boyce, ST.; Warden, GD. *Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes*. **Am. J. Surg.** 2002;183, 445–456.

Bradstreet, JJ. et al. *Efficacy of fetal stem cell transplantation in autism spectrum disorders: An open-labeled pilot study*. **Cell Transplantation**. Naples, out. 2014. Caderno 1, p. 05-112.

Brandão, ML., et al., *Evaluation of wound healing treated with latex derived from rubber trees and Aloe Vera extract in rats*. **Acta cirurgica brasileira**, 2016; **31**(9): p. 570-577.

Brenner M.; Hearing V. *The protective role of melanin against UV damage in human skin*. **Photochemistry and Photobiology** 2008; 84: 539-549.

Buser H, et al. *Isolation of adipose-derived stromal cells without enzymatic treatment: expansion, phenotypical, and functional characterization*. **Stem Cells Dev.** 2014 Oct 1;23(19):2390-400. doi: 10.1089/scd.2014.0071. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24805167; PMCID: PMC4172561.

Bydlowski, SP. et al. *Características biológicas das células-tronco mesenquimais*. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 2009; v. 31, p. 25-35. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000038>

Cabral, LDS et al. *Filtros solares e fotoprotetores: uma revisão*. **Infarma**, 2013; v. 25, n. 2.

Calcagno, AM., et al., *Prolonged Drug Selection of Breast Cancer Cells and Enrichment of Cancer Stem Cell Characteristics*. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, 2010;102(21), 1637–1652.

Caldwell MM.; Robberecht R.; Flint SD. *Internal filters: prospects for UV-acclimation in higher plants*. **Physiologia Plantarum** 1983;58: 445-450.

Campbell C. et al., *Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation*. **Cancer Research**. 1993; 53: 2697-9.

Cerletti M. *et al.* *Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles.* **Cell** 2008; 134:37–47.

Charcot P. *Erythème produit par l'action de la lumière électrique* **C.R. Soc. Biol. Paris**, 1858; 5, 63-65.

Chatelain E.; Gabard B. *Photostabilization of butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzone) and ethylhexyl methoxycinnamate by bisethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a New UV Broadband Filter.* **Photochemistry and Photobiology** 2001; 74: 401-406.

Chen, Y. *et al.* *Matrix contraction by dermal fibroblasts requires transforming growth factor- β /activin-linked kinase 5, heparan sulfate-containing proteoglycans, and MEK/ERK: insights into pathological scarring in chronic fibrotic disease.* **Am. J. Pathol.**, 2005;167(6):1699-1711. [doi:10.1016/S0002-9440(10) 61252-7]

Chiari-Andréo, BG *et al.* *Can natural products improve skin photoprotection?.* **Rodriguésia** [online]. v. 71, 2020. e00672019. ISSN 2175-7860. Acesso em: 06 jan. 2023

Chien KR. *Regenerative medicine and human models of human disease.* **Nature** 2008; 453:302–305.

Chignell, CF.; Motten, AG.; Buettner, GR. *Photoinduced free radicals from chlorpromazine and related phenothiazines: relationship to phenothiazine-induced photosensitization.* **Environ. Health Perspect.**, 1985;64, 103-110.

Christ, W.; Lehnert, T. *Toxicity of the quinolones.* In **The New Generation of Quinolones** (C. Siporin, C. L. Heifertz, and J. M. Domagala, Eds.), 1990; 165–187. Marcel Dekker, New York.

Chung, NG. *et al.* *Cotransplantation of marrow stromal cells may prevent lethal graft-versus-Host Disease in major histocompatibility complex mismatched murine hematopoietic stem cell transplantation.* **International Journal Of Hematology.** [s.i], 2004; p. 370-376. ago.

Coalson, E. *et al.* *Stem cell therapy chronic skin wounds in the era of personalized medicine: From bench to bedside.* **Genes Dis.** 2019, 6, 342–358.

Cooke, MS. *et al. Recommendations for standardized description of and nomenclature concerning oxidatively damaged nucleobases in DNA.* **Chemical Research in Toxicology** 2010;23: 705-707.

Cornelius, WA. *et al. Non-Ionizing Radiation Measurements and Protection.: lecture notes from a course conducted at the Australian radiation laboratory..* Yallambie Victoria: **Australian Radiation Laboratory**, 1985. 1 v.

Da Costa, LA.; Badawi, A.; El-Sohehy, A. *Nutrigenetics and modulation of oxidative stress.* **Ann. Nutr. Metab.** 2012;60 (Suppl. 3), 27–36.

Da Silva JFM. *et al. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities.* **Food Chem** 2006; 99: 431-435.

Da Silva Meirelles, L., Nardi, NB. *Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization.* **Br J Haematol**, 2003; v. 123 n.4, p. 702-11.

Danno, K.; Horio, T. *Sunburn cell: factors involved in its formation.* **Photochem. Photobiol.**, 1987;45, 683-690.

DATASUS. Acesso em 09.05.2020.
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>

Dawson, G. *et al. Autologous cord blood infusions are safe and feasible in young children with autism spectrum disorder: Results of a single-center phase i open-label trial.* **Stem Cells Translational Medicine** 2017; **6**: 1332– 1339.

De Bari, C., *et al., Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane.* **Arthritis Rheum.** 2001; v.44, p.1928-1942.

de Moura, SA. *et al. Aqueous extract of Brazilian green propolis: primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges.* **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine.** 2011; 2011:748283.

De Vuyst, E. *et al. Reconstruction of normal and pathological human epidermis on polycarbonate filter.* **Methods Mol. Biol.** 2014;1195, 191–201.
http://dx.doi.org/10.1007/7651_2013_40.

De Wever, B. *et al.* “open source”–based engineered human tissue models: a new gold standard for Nonanimal testing through openness, transparency, and collaboration, promoted by the ALEXANDRA Association. **Appl. in Vitro Toxicol.** 2015;1, 5–9. <http://dx.doi.org/10.1089/aivt.2014.0011>.

Delgado, JA. *et al.* Safety of UV radiation for autofluorescence diagnosis of skin cancer. **Revista Mexicana de Física**, Distrito Federal, México, 2006; v. 52, n. 1, p. 78-83.

Denning, MF. *Epidermal keratinocytes: Regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms.* **International Journal of Biochemistry and Cell Biology.** 2004; 36: 1141-6.

DeUgarte, DA. *et al.*, Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. **Cells Tissue Organs**, 2003; v.174, n.3, p.101-109.

Devi KSP, *et al.* Assessing the immunomodulatory role of heteroglycan in a tumor spheroid and macrophage co-culture model system. **Carbohydrate Polymers**, 127, 1–10, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.035>

Dinkova-Kostova AT. *Phytochemicals as protectors against ultraviolet radiation: versatility of effects and mechanisms.* **Planta Medica** 2008;74: 1548-1559

Do Amaral, JB. *et al.* MCF-7 cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer. **Tissue Eng. Part C Methods** 2011, 17, 1097–1107

Dominici M, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy.** 2006;8(4):315-7.

Dos Santos DA, *et al.* Brazilian red propolis extracts: study of chemical composition by ESI-MS/MS (ESI+) and cytotoxic profiles against colon cancer cell lines. **Biotechnology Research and Innovation.** 2019; 3:120---130.

Douki T, *et al.* Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. **Biochemistry** 2003;42: 9221-9226.

Dwyer AR, *et al.* A three-dimensional co-culture system to investigate macrophage-dependent tumor cell invasion. **Journal of Biological Methods**, 2016;3(3), 49. <https://doi.org/10.14440/jbm.2016.132>

- Edmondson, R. *et al.* *Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors.* **Assay Drug Dev. Technol.** 2014, 12, 207–218.
- Ekmekçi, OB.; Ekmekçi, H. *Vitronectin in atherosclerotic disease.* **Clin. Chim. Acta**, 2006; 368(1-2):77-83. [doi:10.1016/j.cca.2005.12.015]
- El Kahi, CG. *et al.* *Modulation of wound contracture α -smooth muscle actin and multispecific vitronectin receptor integrin $\alpha\beta 3$ in the rabbit's experimental model.* **Int. Wound J.**, 2009;6(3):214-224. [doi:10.1111/j.1742-481X.2009.00597.x]
- Elliott TR, *et al.* *Does participation mediate the prospective relationships of impairment, injury severity, and pain to quality of life following burn injury?* **J Health Psychol.** 2015.
- Ezzedine K, *et al.* *Expatriates in high-UV index and tropical countries: Sun exposure and protection behavior in 9,416 French adults.* **Journal of Travel Medicine** 2007;14: 85-91.
- Fahey MC.; Wallace EM. *Stem cells: research tools and clinical treatments.* **J Paediatr Child Health** 2011; 47:672–675.
- Falanga, V. *et al.* *Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds.* **Tissue Eng.** 2007;13(6):1299-312.
- Faria, TF. *et al.* *Topical use of green propolis for wound healing: A systematic review of the literature.* **Brazilian Journal of Enterostomal Therapy.** 2022;v. 20, e0222.
- Fennema, E, *et al.* *Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues.* **Trends in biotechnology.** 2013;v. 31, n. 2, p. 108-115.
- Fernandes, JD.; Oliveira, ZNP.; Machado, MCR. *Prevenção e cuidados com a pele da criança e do recém-nascido.* **An Bras Dermatol.** 2011; 86: 102-10.
- Ferrari M, *et al.* *Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro e in vivo de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*).* **Revista Brasileira de Farmacognosia** 2007;17: 626-630.
- Fisher GJ, *et al.* *Mechanisms of photoaging and chronological skin aging.* **Arch Dermatology** 2002;138: 1462-1470.

- Fitsiou, E. *et al.* Cellular senescence and the senescence-associated secretory phenotype as drivers of skin photoaging. **J. Investig. Dermatol.** 0, 2020.
- Fodor, WL. *Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate.* **Reprod Biol Endocrinol.** 2003; 1:102.
- Foldi, V. *et al.* Effects of fluid resuscitation methods on burn trauma-induced oxidative stress. **J. Burn Care Res.** 2009, 30, 957–966.
- Foley P, *et al.* The frequency of reactions to sunscreens: Results of a longitudinal population-based study on the regular use of sunscreen in Australia. **British Journal of Dermatology** 1992;128: 512-518.
- Forrest IS.; Forrest FM.; Berger M. Free radicals as metabolites of drugs derived from phenothiazine. **Biochim Biophys Acta** 1958;29:441- 442.
- Franchi Jr., *et al.* Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evid. Based Complement. Altern. Med.** 2012, 918956-1–918956-6. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/918956>
- Freeman, AK.; Gordon, M. *Dermatologic diseases and problems.* **Geriatric Medicine** (4th edition), Springer, New York, 2006; pp. 869-881.
- Freeman, BA.; Grapo, JD. *Biology of disease: free radical and tissue injury.* **Lab. Invest.** 1982; 47, 412–426
- Frieboes HB, *et al.* An Integrated Computational/Experimental Model of Tumor Invasion. **Cancer Research**, 2006;66(3), 1597–1604. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3166>
- Frozza, COdS. *et al.*, Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and chemical toxicology**, 2013. 52: p. 137-142.
- Fuchs, J. *et al.* Acute effects of near ultraviolet light on the cutaneous antioxidant defense system; **Photochem. Photobiol.** 1989; 50:739-744
- Funari, CS.; Ferro, VO. *Análise de própolis.*, **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 2006; v. 26, n. 1, p. 171-178.
- Garcia, CSC. *et al.* Natural rubber films incorporated with red propolis and silver nanoparticles aimed for occlusive dressing application. **Materials Research.** 2021; 24(2): e20200415.

Gasparro FP.; Mitchnick M.; Nash JF. *A review of sunscreen safety and efficacy*. **Photochem Photobiol** 1998;68:243-56.

Gentile, P.; Garcovich, S. *Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (AD-MSCs) against Ultraviolet (UV) Radiation Effects and the Skin Photoaging*. **Biomedicines**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 532-540, 11 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9050532>.

Geoffrey K.; Mwangi NA.; Maru SM. *Sunscreen products: rationale for use, formulation development and regulatory considerations*. **Saudi Pharm J** 2019;27:1009-18.

Ghisalberti, EL. *Própolis: a review*. **Bee World**. 1979;60, 59-84.

Gobbo-Neto L.; Lopes NP. *Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários*. **Química Nova** 2007;30: 374-381.

Gonçalo, M. *Phototoxic and photoallergic reactions*. **Contact Dermatitis**, Springer, 2011; pp. 361-376

Gonzalez H. *Percutaneous absorption of benzophenone-3, a common component of topical sunscreens*. **Photochem Photobiol Sci**. 2010; 9: 482-8.

González S.; Fernández-Lorente M.; Gilaberte-Calzada Y. *The latest on skin photoprotection*. **Clin Dermatol**. 2008; 26(6):614–26. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.09.010>.

Goodman, TT.; Ng, CP.; Pun, SH. *3D tissue culture systems for the evaluation and optimization of nanoparticle-based drug carriers*. **Bioconjug. Chem**. 2008, 19, 1951–1959.

Grossman N, et al. *780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species*. **Lasers Surg Med**. 1998; 22: 212–8 PMID: 9603282

Gustavsson Gonzalez H, Farbrot A & Larkö O (2002) Percutaneous absorption of benzophenone-3, a common component of topical sunscreens. *Clinical and Experimental Dermatology* 27: 691-694.

Hammer E. *Ober den Einfluss des Lichtes*. **Ferdinand Enke**, Stuttgart. 1891.

- Han CY. *et al.* Role of Pin1 in UVA-induced cell proliferation and malignant transformation in epidermal cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 2011; 410: 68–74 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.106> PMID: 21640077
- Han, TT. *et al.* Adipose-derived stromal cells mediate in vivo adipogenesis, angiogenesis and inflammation in decellularized adipose tissue bioscaffolds. **Biomaterials** 2015; 72, 125–137.
- Havran, WL.; Jameson, JM. Epidermal T cells and wound healing. **J. Immunol.**, 2010;184(10):5423-5428. [doi:10.4049/jimmunol.0902733]
- Hayacibara MF *et al.* In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Jounal Ethnopharmacol** 2005, 101: 110-115.
- He, YY. *et al.* UVA-induced cell cycle progression is mediated by a disintegrin and metalloprotease/epidermal growth factor receptor/AKT/Cyclin D1 pathways in keratinocytes. **Cancer Res.** 2008; 68, 3752–3758.
- He, Z. *et al.* Apoptosis inhibition effect of Dihydromyricetin against UVA-exposed human keratinocyte cell line, **J. Photochem. Photobiol.** 2016; B 161, 40–49.
- Heinrich, M.; Modarai, M.; Kortenkamp, A. Herbal extracts used for upper respiratory tract infections: are there clinically relevant interactions with the cytochrome P450 enzyme system? **Planta Medica** 2008; 4.
- Helbling EW. *et al.* Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. **Marine Ecology Progress Series** 1992;80: 89-100.
- Hinneburg I. *et al.* Antioxidant and photoprotective properties of an extract from buckwheat herb (*Fagopyrum esculentum* MOENCH). **Die Pharmazie** 2006;61: 237-240.
- Home E. On the black rete mucosum of the Negro being a defense against the scorching effect of the sun's rays. **Philos. Trans. R. Soc. London**, 1820;111, 1.
- Horwitz, EM.; Andreef, M.; Frassoni, F. Mesenchymal Stromal Cells. **Curr Opin Hematol.**, 2006;v. 13, n. 6, p. 419–425.
- Huang, S. *et al.* Recent advances in the chemical composition of propolis. **Molecules** 2014, 19, 19610–19632.

Hughes TM.; Stone NM. *Benzophenone 4: an emerging allergen in cosmetics and toiletries?* **Contact Dermatitis** 2007;56: 153-156.

Hunter JAA.; Bhutani LK.; Magnus IA. *Chlorpromazine photosensitivity in mice: Its action spectrum and the effects of anti inflammatory agents.* **Br J Dermatol** 1970;82: 157-168.

Hyde, C. *et al. Insulin-like growth factors (IGF) and IGF-binding proteins bound to vitronectin enhance keratinocyte protein synthesis and migration.* **J. Invest. Dermatol.**, 2004;122(5): 1198-1206. [doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22527.x]

Iannacone MR.; Hughes MCB.; Green AC. *Effects of sunscreen on skin cancer and photoaging.* **Photodermatol Photoimmunol Photomed** 2014;30:55-61.

IARC Working Group Reports. Vol 1. *Exposure to artificial UV radiation and skin cancer.* ISBN 92 832 2441 8, 2005.

ICH: *ICH guideline S10 on photosafety evaluation of pharmaceuticals.* **ICH, US: FDA.** 17, 2014.

Ikehata, H.; Ono, T. *Significance of CpG methylation for solar UV-induced mutagenesis and carcinogenesis in skin,* **Photochem. Photobiol.** 2007; 83 (1), 196–204.

INCA - Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2022: incidência de câncer no Brasil.* Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro, 2002.

Inoue H, Yamanaka S. *The use of induced pluripotent stem cells in drug development.* **Clin Pharmacol Ther** 2011; 89:655–661.

ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices — Part 5: in vitro cytotoxicity tests. 2009

Ito, T. *et al. Peroxiredoxin I plays a protective role against UVA irradiation through reduction of oxidative stress,* **J. Dermatol. Sci.** 2014;74, 9–17.

Jans J. *et al. Powerful skin cancer protection by a CPDphotolyase transgene.* **Current Biology** 2005;15: 105-115.

Jastrzębska-Stojko Z, et al. *Biological Activity of Propolis-Honey Balm in the Treatment of Experimentally-Evoked Burn Wounds*. **Molecules** 2013; 18: 14397-413.

Jiang, Y. et al. *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. **Nature Publishing Group**, 2002; [s.i], v. 418, n. 4, p.41-49.

Jin, S. et al., *Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells from gingival connective tissue*. **Journal of periodontal research**, 2015. 50(4): p. 461-467.

Jung, KM. et al. *KeraSkin™-VM: a novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests*. **Toxicol. in Vitro** 2014;28, 742–750. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.02.014>.

Kapałczyńska, M.; Kolenda, T. *2D and 3D cell cultures—A comparison of different types of cancer cell cultures*. **Arch. Med. Sci.** 2018;14, 910–919.

Kern, S. et al., *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. **Stem Cells**, 2006; v.24, p.1294-1301.

Kim, HB.; Yoo, BS. *Propolis Inhibits UVA-Induced Apoptosis of Human Keratinocyte HaCaT Cells by Scavenging ROS*. **Toxicological Research**, 2016; [s.l.], v. 32, n. 4, p.345-351. The Korean Society of Toxicology. <http://dx.doi.org/10.5487/tr.2016.32.4.345>.

Kim, K.; Park, H.; Lim. K. *Phototoxicity: Its Mechanism and Animal Alternative Test Methods*. **Toxicol. Res.** 2015; Vol. 31, No. 2, pp. 97-104.

Kochevar, IE, Lamola AA. *Chlorpromazine and protriptyline phototoxicity: Photosensitized, oxygen independent red cell hemolysis*. **Photochem Photobiol** 29:791-796, 1979 6.

Kocik, J. *Udział cytokin i innych mediatorów w procesie gojenia rany*. **Postępy Biol. Komórki** 1996, 23, 63–92.

Koli, K. et al. 1991. *Enhancement of vitronectin expression in human HepG2 hepatoma cells by transforming growth factor-β1*. **Eur. J. Biochem.**, 1991;199(2):337-345. [doi:10.1111/j.1432-1033.1991.tb16129.x]

Krutmann J. *The interaction of UVA and UVB wavebands with particular emphasis on signaling*. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**. 2006; 92: 105-7.

Krutmann, J. *et al*; *Daily photoprotection to prevent photoaging*. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.** 2021, 37, 482–489.

Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. *Antioxidant activity of propolis of various geographic origins*. **Food Chem.**, 2004;84, 329-339.

Kunz-Schughart, LA., *et al*. *The Use of 3-D Cultures for High-Throughput Screening: The Multicellular Spheroid Model*. **Journal of Biomolecular Screening**, 2004;9(4), 273–285. <https://doi.org/10.1177/1087057104265040>

Kvam E.; Tyrrell RM. *Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation*. **Carcinogenesis** 1997;18: 2379-2384.

Kwon, OS. *et al*. *Photoaging-associated changes in epidermal proliferative cell fractions in vivo*. **Arch. Dermatol. Res.** 2008; 300, 47–52.

Lagies, S. *et al*. *Cells grown in three-dimensional spheroids mirror in vivo metabolic response of epithelial cells*. **Commun. Biol.** 2020;3(1), 246. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0973-6>.

Lanza, R. *et al*. *Principles of tissue engineering*. 5. ed. **Academic press**, 2020;1678 p.

Lanza, R. *et al*. *Principles of Tissue Engineering*. 3. ed. San Diego: **Academic Press**, 2007;1344 p.

Lee, DE.; Ayoub, N.; Agrawal, DK. *Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy*. **Stem cell research & therapy**, 2016; v. 7, n. 1, p. 37.

Lee, J. *et al*. *In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture*. **Small** 2009;5, 1213–1221. [CrossRef]

Lee, JS. *et al*. *A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke*. **Stem Cells**. 2010; [s.i], p. 1099-1106.

Lemischka, IR. *Stem cell biology: a view toward the future*. **Ann N Y Acad Sci**. 2005; 1044:132-8.

- Li, JL. *et al.* Inhibition of UVA-induced apoptotic signaling pathway by polypeptide from *Chlamys farreri* in human HaCaT keratinocytes, **Radiat. Environ. Biophys.** 2007;46, 263–268.
- Lindner, U. *et al.* Mesenchymal stem or stromal cells: Toward a better understanding of their biology? **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, 2010; v. 37, n. 2, p. 75–83
- Liu Z. *et al.* Low-Dose UVA Radiation-Induced Adaptive Response in Cultured Human Dermal Fibroblasts. **International Journal of Photoenergy** 2012; [s.i], v. 2012, p. 1-11 ID 167425. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/167425>.
- Lodi D.; Iannitti T.; Palmieri B. *Stem cells in clinical practice: applications and warnings.* **J Exp Clin Cancer Res** 2011; 30:9.
- Lopez, BC. *et al.*, Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. **Journal of applied microbiology**, 2015;119(3): p. 677-687.
- Lv *et al.* Transplational of human cord blood mononuclear cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in autism. **Journal of Translational Medicine** 2013; 11:1:196.
- Madronich, S. *et al.* Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, 1998; 46, 5-19.
- Magga J, *et al.* Production of monocytic cells from bone marrow stem cells: therapeutic usage in Alzheimer's disease. **J Cell Mol Med** 2012; 16:1060–1073.
- Maragno, L. *Vamos aprender um pouco sobre radiação ultra violeta?* 2019. Disponível em: <https://www.lucianamaragno.com/>. Acesso em: 04 jan. 2023.
- Mariano, JS. *Extração e caracterização de dois tipos de própolis: Verde (mineira) e vermelha (alagoana).* Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, **Minas Gerais**, p.17, 2014. Disponível online em: <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-B3PH8V/1/disserta_o_mestrado_propolis_verde_e_vermelha.pdf> Acesso em: 29 out. 2021.
- Martinez, RM. *et al.* Hesperidin methyl chalcone inhibits oxidative stress and inflammation in a mouse model of ultraviolet B irradiation-induced skin damage, **J. Photochem. Photobiol. B** 148, 2015; 145–153.

Martinotti S.; Ranzato E. *Cellular and molecular mechanisms of honey wound healing*. **Hauppauge**, New York: Nova Publishers Inc; 2014.

Marto J. *et al.* *Design of novel starch-based Pickering emulsions as platforms for skin photoprotection*. **Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology** 2016;162: 56-64.

Marx U. *Trends in Cell Culture Technology*. **Advances in experimental medicine and biology** 2012; pp. 26-46.

Mata, VPd. *Ocorrência natural e aspectos de interesse agrônômico de dalbergia ecastaphyllum (l.) taubert (fabaceae) no estado da bahia: base para a produção da própolis vermelha*. 2014. 74 f. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, **Cruz das Almas**, 2014. Disponível em: <http://www.repositorio.ufrb.edu.br/>. Acesso em: 18 ago. 2022.

McCormick JB, Huso HA. *Stem cells and ethics: current issues*. **J Cardiovasc Transl Res** 2010; 3:122–127.

McCullough, JL.; Kelly, KM. *Prevention and treatment of skin aging*. **Anne. N.Y. Acad. Sci.** 2006, 1067, 323–331. [CrossRef] [PubMed]

Mclennan, S.V *et al.* *The anti-inflammatory agent Propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes*. **Wound Repair And Regeneration**, 2008; [s.l.], v. 16, n. 5, p.706-713. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1524-475x.2008.00421.x>.

Mcmillan, TJ. *et al.* *Cellular effects of long wavelength UV light (UVA) in mammalian cells*. **J. Pharm. Pharmacol.** 2008; 60, 969–976.

Melo, NdOR., *et al.*, *Effect of red propolis on hamster cheek pouch angiogenesis in a new sponge implant model*. **Acta Cirurgica Brasileira**, 2018. 33(5): p. 420-430.

Memic A, *et al.* *Hydrogels 2.0: improved properties with nanomaterial composites for biomedical applications*. **Biomedical Material.** 2016; 11:1-15.

Menezes, H. *Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas*. **Arq. Inst. Biol.**, v.72, n.3, p. 405-411, 2005.

Ministério da Saúde. *Cartilha para o tratamento de emergência das queimaduras.* 2012. **Brasília, DF.** Disponível *online* em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cartilha_queimaduras.pdf>, acesso em: 05 mar. 2021.

Ministério da Saúde. *Portaria nº 737/2001.* Disponível *online* em: <<http://www.mprs.mp.br/infancia/legislacao/id3072.htm>>, acesso em 05 mar. 2021

Mohammadzadeh, S. *et al.* *Antioxidant power of Iranian propolis extract.* **Food Chem.**, 2007;103, 729- 733.

Molinaro, EM., Caputo, LFG., Amendoeira, MRR. (Org.). *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*, v. 2. **Rio de Janeiro:** EPSJV; IOC, 2010. v. 2. 254 p.

Montenegro, L. *et al.*, “*Protective effect evaluation of free radical scavengers on UVB induced human cutaneous erythema by skin reflectance spectrophotometry,*” **International Journal of Cosmetic Science**, 1995; vol. 17, no. 3, pp. 91–103.

Moon JY.; Lee EJ.; Yoo BS. *Propolis Protects Human Keratinocyte HaCaT Cells against UV-induced Apoptosis.* **Journal of Apiculture.** 2012; 27:243–249.

Moraes, CS, *et al.* *Comparative antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of two groups of Brazilian propolis.* **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 2010;30, 539–543.

Moreno, MIN. *et al.* *Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina.* **J. Ethnopharmacol.**, 71,109-114, 2000.

Moshksayan, K.; *et al.* *Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture.* **Sens. Actuators B Chem.** 2018; 263, 151–176. [CrossRef]

Moura, MPSGd. *Padronização da tecnologia de cultivo tridimensional escalonável para engenharia de cartilagem.* 2015. 70f. Trabalho de Conclusão de Curso de Mestrado em Biotecnologia – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, **Duque de Caxias**, 2015.

Mudit V.; Katiyar SK. *Molecular mechanisms of inhibition of photocarcinogenesis by silymarin, a phytochemical from milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) (Review).* **International Journal of Oncology** 2010;36: 1053-1060.

Murray, HC. et al. *Nucleotide excision repair deficiency in melanoma in response to UVA*. **Exp. Hematol. Oncol.** 2016; 5, 6. [CrossRef] [PubMed]

Nakyai, W. et al. *Effects of Repeated UVA Irradiation on Human Skin Fibroblasts Embedded in 3D Tense Collagen Matrix*. **Photochemistry and Photobiology**, 2018; 94(4), 715–724. doi:10.1111/php.12895

Napolitano AP, et al. *Dynamics of the selfassembly of complex cellular aggregates on micromolded nonadhesive hydrogels*. **Tissue engineering**. 2007; v. 13, n. 8, p. 2087-2094.

Narayanapillai, S. et al. *Silibinin is a potent sensitizer of UVA radiation-induced oxidative stress and apoptosis in human keratinocyte HaCaT cells*, **Photochem. Photobiol.** 2012; 88, 1135–1140.

Nascimento CS, et al. *Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha*. **Revista Brasileira de Farmácia** 2009;30: 334-339.

Nash JF.; Tanner PR.; Matts PJ. *Ultraviolet a radiation: testing and labeling for sunscreen products*. **Dermatologic Clinics** 2006;24: 63-74.

Neale RE, et al. *Basal cell carcinoma on the trunk is associated with excessive sun exposure*. **Journal of the American Academy of Dermatology** 2007;56: 380-386.

Neybecker P. et al., *Respective stemness and chondrogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from human bone marrow, synovial membrane, and synovial fluid*. **Stem Cell Research and Therapy**. 2020

Nichols JA.; Katiyar SK. *Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms*. **Archives of Dermatological Research** 2010;302: 71-83.

Nichols, JA.; Katiyar, SK. *Skin Photoprotection by natural polyphenols: Anti-Inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms*. **Arch. Dermatol. Res.** 2010, 302, 71–83.

Domingues, S. et al. *Clinical Grade Human Pluripotent Stem Cell-Derived Engineered Skin Substitutes Promote Keratinocytes Wound Closure In Vitro*. **Cells** 2022; 11, 1151. <https://doi.org/10.3390/cells1107115>

Nie, X. *et al.* *Cosmetic improvement in various acute skin defects treated with tissue-engineered skin.* **Artif Organs.** 2007;31(9):703-10.

Noel, P., *et al.* *Preparation and Metabolic Assay of 3-dimensional Spheroid Co-cultures of Pancreatic Cancer Cells and Fibroblasts.* **Journal of Visualized Experiments**, 2017;126. <https://doi.org/10.3791/56081>

Nwosu, ADG. *et al.* *Evaluation of ascorbic acid adjuvant therapy and oxidative stress parameters in burns patients.* **JAMMR.**64890 2020;32, 296–306.

OECD, 2015. *ENV/JM/MONO (2015)27.* In: *Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified in Vitro Reconstructed Human Epidermis (Rhe) Test Methods for Skin Irritation Testing as Described in TG 439,* **Organisation for Economic Cooperation And Development**, pp. 22 (intended for the developers of new or modified simi).

OECD. *INVITRO 3T3 NRU Phototoxicity Test.* In: *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.* 4. ed. Paris: **Organisation for Economic Cooperation and Development**, 2004. Cap. 432, p. 1-15.

OECD. *Test No. 439: in vitro skin irritation: reconstructed human epidermis test method.* In: *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.* **Organisation For Economic Cooperation And Development**, 2021 Section 4, pp. 1–28. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264242845-en>.

OECD. *TG101: UV-VIS Absorption Spectra.* **OECD**, Paris: OECD, pp. 1-6. 1981.

Olczyk P. *et al.* *Propolis Induces Chondroitin/Dermatan Sulphate and Hyaluronic Acid Accumulation in the Skin of Burned Wound.* **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2013; [s.l.], v. 2013, p.1-8. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/290675>.

Olczyk P. *et al.* *Propolis modulates vitronectin, laminin, and heparan sulfate/heparin expression during experimental burn healing.* **Journal Of Zhejiang University Science B**, 2012; [s.l.], v. 13, n. 11, p.932-941. Zhejiang University Press. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.b1100310>.

- Oliveira-Junior RG, *et al.* *In vitro* antioxidant and photoprotective activities of dried extracts from *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **J Appl Pharm Sci.** 2013;3(1):122–7. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.30124>.
- Oresajo C. *et al.* Complementary effects of antioxidants and sunscreens in reducing UV-induced skin damage as demonstrated by skin biomarker expression. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy** 2010;12: 157-162.
- Park, YK. *et al.* park. **Honeybee Sci.** 2000;21, 85–90.
- Paye M.; Barel AO.; Maiback HI. *The handbook of cosmetology.* 2nd ed. **Informa Health Care, New York.** 1961.
- Perin EC, *et al.* Randomized, double-blind pilot study of transendocardial injection of autologous aldehyde dehydrogenase-bright stem cells in patients with ischemic heart failure. **Am Heart J** 2012; 163:415–421, 421.e1.
- Peura M, *et al.* Paracrine factors from fibroblast aggregates in a fibrin-matrix carrier enhance keratinocyte viability and migration. **J Biomed Mater Res - Part A** 2010;95 A (2):658-64.
- Picolotto, A. *et al.* Bacterial cellulose membrane associated with red propolis as phytomodulator: Improved healing effects in experimental models of diabetes mellitus. **Biomedicine and Pharmacotherapy.** 2019;112. 108640. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108640> ISSN 0753-3322
- Pierce, AJ. *et al.* Doublestrand breaks and tumorigenesis, **Trends Cell Biol.** 2001;11 (11), S52–S59.
- Pillai S.; Oresajo C.; Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. **International Journal of Cosmetic Science** 2005;27: 17-34.
- Pittenger MF. *et al.*, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, 1999; 284(5411): p. 143-147.
- Pollock, K. *et al.* Human Mesenchymal Stem Cells Genetically Engineered to Produce Brain-derived Neurotrophic Factor Improve Outcomes in Huntington's disease Models, **Molecular Therapy** 2016; doi:10.1038/mt.2016.12

- Ponti, D., et al., *Isolation and In vitro Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem/Progenitor Cell Properties*. **Cancer Research**, 2005;65(13), 5506–5511. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0626>
- Poumay, Y. et al. *A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies*. **Arch. Dermatol. Res.** 2004;296, 203–211. <http://dx.doi.org/10.1007/s00403-004-0507-y>
- Poumay, Y.; Coquette, A. *Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research*. **Arch. Dermatol. Res.** 2006;298, 361–369. <http://dx.doi.org/10.1007/s00403-006-0709-6>.
- Prata, KL. *Efeito da quimioterapia em altas doses sobre as células-tronco mesenquimais humanas*. 2006. 202p. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Medicina, Universidade São Paulo, **Ribeirão Preto**, 2006.
- Proserpio G. *Natural sunscreens: vegetable derivatives as sunscreens and tanning agents*. **Cosmetics & Toiletries** 1976; 91: 34-36.
- Puculek, M. et al. *The morphology and application of stem cells in digestive system surgery*. **Folia Morphol.** 2020, 80, 13–19.
- Pustisek, N.; Situm, M. *UV-radiation, apoptosis and skin*, **Coll. Antropol.** 35 (Suppl. 2) 2011;339–341.
- Qin, FJ. et al. *Protective effects of tiopronin against oxidative stress in severely burned patients*. **Drug Des. Devel. Ther.** 2019, 13, 2827–2832.
- Quan, T. et al. *Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging*. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.** 2009; 14, 20–24.
- Rabe, JH. et al. *Photoaging: Mechanisms and repair*. **J. Am. Acad. Dermatol.** 2006; 55, 1–19. [CrossRef]
- Raj, D.; Brash, DE.; Grossman, D. *Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease*. **Journal of Investigative Dermatology.** 2006; 126: 243-57.
- Räsänen, K., Vaheri, A. *Proliferation and motility of HaCaT keratinocyte derivatives is enhanced by fibroblast nemoisis*. **Exp. Cell Res.**, 2010;316(10):1739-1747. [doi:10.1016/j.yexcr.2010.01.020]

Rashid ST, *et al.* *Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells.* **J Clin Invest** 2010; 120:3127–3136.

Rebello SP, *et al.* *3D-3-culture: A tool to unveil macrophage plasticity in the tumour microenvironment.* **Biomaterials**, 163, 185– 197. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.02.030>

Rigel DS. *Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer.* **Journal of the American Academy of Dermatology** 2008;58: S129-S132.

Righi, AA. *et al* *Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities.* **J Sci Food Agric** 2011;91(13): 2363-2370.

Rimann M.; Graf-Hausner U. *Synthetic 3D multicellular systems for drug development.* **Curr Opin Biotechnol.** 2012 Oct;23(5):803-9. doi: 10.1016/j.copbio.2012.01.011. Epub 2012 Feb 10. PMID: 22326911.

Ritter E. *Ann. Phys.*, 7, 527. 1801.

Roberston, JD.; Orrenius, S. *Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals.* **Crit. Rev. Toxicol.** 2000;30, 609–627.

Roitt, I. *Imunologia.* 5.ed. **São Paulo: Manole**, 1999.

Rufatto, LC. *et al.* *Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity.* **Asian Pac J Trop Biomed** 2017; 7(7): 591–598

Rufatto, LC. *et al.*, *Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation.* **Microbiological Research**, 2018; 214: p. 74-82.

Russo A. *et al.* *Genistin inhibits UV light-induced plasmid DNA damage and cell growth in human melanoma cells.* **The Journal of Nutritional Biochemistry** 2006;17: 103-108.

Salatino, A. *et al.* *Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis.* **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, 2005; [s.l.], v. 2, n. 1, p.33-38. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/neh060>.

Sample, A.; He, YY. *Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma.* **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.** 2018, 34, 13–24. [CrossRef]

- Sander CS. et al. *Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis*. **International Journal of Dermatology** 2004;43: 326-335.
- Sander, M. et al. *The efficacy and safety of sunscreen use for the prevention of skin cancer*. **Canadian Medical Association Journal**, 2020; [s.l.], v. 192, n. 50, p. 1802-1808. CMA Joule Inc.. <http://dx.doi.org/10.1503/cmaj.201085>.
- Scharffetter-Kochanek, K. et al. *Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms*. **Exp. Gerontol.** 2000, 35, 307–316.
- Schneider, LA. et al. *UVA-1 exposure in vivo leads to an IL-6 surge within the skin*. **Exp Dermatol.** 2017;26 (9):830–832. doi:10.1111/exd.13286
- Schuch, AP. et al. *Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions*. **Free Radic. Biol. Med.** 2017;107, 110–124.
- Senesi, L. et al. *Mechanical and enzymatic procedures to isolate the stromal vascular fraction from adipose tissue: preliminary results*. **Frontiers in cell and developmental biology**, 2019; 7: 88.
- Sensebé, L. *Generation and characterization of mesenchymal stromal cells for clinical application*. **ISBT Science Series**. 2009; 4:31-6.
- Serafini, MR. et al. *UVA-UVB photoprotective activity of topical formulations containing Morinda citrifolia extract*, **Biomed. Res. Int.** 2014; 2014:587819.
- Setlow RB. et al. *Wavelengths effective in induction of malignant melanoma*. **Proceedings of the National Academy of Science** 1993;90: 6666-6670.
- Sforcin, JM.; Bankova V. *PropolisPropolis: is there a potential for the development of new drugs?* **Journal of Ethnopharmacology**, 2011; [s.l.], v. 133, n. 2, p.253-260. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>.
- Sharples, F. et al. *Oportunities and barriers to progress in stem cell research for regenerative medicine*. In: Sharples, F. (Ed.). *Stem Cells and the Future os regenerative Medicine*. Washington DC, **Nacional Acadamy Press**, 2003, p. 41-54.
- Shimoda, K. et al. *Phototoxic lesions induced by quinolone antibacterial agents in auricular skin and retina of albino mice*. **Toxicol. Pathol.** 1993;21, 554–561.

- Shindo, Y., Witt, E., Packer, L. *Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light*. **Journal of Investigative Dermatology**, 1993; 100(3), 260–265.
- Silva, RAd. *et al. Queratinócitos e seus desafios: uma revisão da literatura sobre mecanismos intracelulares*. **Saúde em Revista**, Piracicaba, 2013; 13(35): 3-14.
- Simões, CM. *et al. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. **Artmed, Porto Alegre**. 2017.
- Solovchenko AE.; Merzlyak MN. *Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants*. **Russian Journal of Plant Physiology** 2008;55: 719-737.
- Soundararajan, M.; Kannan, S. *Fibroblasts and mesenchymal stem cells: Two sides of the same coin?* **Journal of Cellular Physiology**, [s.l.], v. 233, n. 12, p.9099-9109, 26 jun. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.26860>.
- Spiekman, M. *et al. The power of fat and its adiposederived stromal cells: Emerging concepts for fibrotic scar treatment*. **J. Tissue Eng. Regen. Med.** 2017, 11, 3220–3235.
- Stahl W.; Sies H. *Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight*. **Molecular Biotechnology** 2007;37: 26-30.
- Staniforth V. *et al. Ferulic acid, a phenolic phytochemical, inhibits UVB-induced matrix metalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms*. **The Journal of Nutritional Biochemistry** 2012;23: 443-451.
- Ströbel S, *et al. Characterization of a novel "in vitro 3D skin microtissue model for efficacy and toxicity testing*. **Toxicology Letters** 258S. 2016. S156
- Sun BK.; Siprashvili Z.; Khavari PA. *Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds*. **Science**. 2014;346(6212):941-5.
- Sun, X. *et al. Ultraviolet Radiation and Melanomagenesis: From Mechanism to Immunotherapy*. **Front. Oncol.** 2020; 10, 951. [CrossRef]
- Svobodova, A. *et al. Attenuation of UVA-induced damage to human keratinocytes by silymarin*. **J. Dermatol. Sci.** 2007;46, 21–30.

- Svoronos, AA., et al. *Micro-Mold Design Controls the 3D Morphological Evolution of Self-Assembling Multicellular Microtissues*. **Tissue engineering part A**. 2014;20(7-8), 1134-44.
- Syed, DN. et al. *Photochemopreventive effect of pomegranate fruit extract on UVA-mediated activation of cellular pathways in normal epidermal keratinocytes*. **Photochem. Photobiol.** 2006; 82, 398–405.
- Szymański, K.; Waś, J. *Potencjalne możliwości leczenia i regeneracji skóry w rozległych ranach oparzeniowych przy zastosowaniu substytutów regenerujących skórę*. **Leczenie Ran** 2014; 11, 11–20.
- Takahashi A. et al. *Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH_m)*. **Brain Research Bulletin**. 2004; 62: 497-504
- Talwar, HS. et al. *Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin*. **J. Investig. Dermatol.** 1995; 105, 285–290.
- Tejavibulya, N. et al. *Directed Self-Assembly of Large Scaffold-free Multicellular*. **Biofabrication**. 2011; 3, 034110.
- Tønnesen, HH. *Formulation and stability testing of photolabile drugs*. **Int. J. Pharm.**, 2001; 225, 1-14.
- Towle, KM.; Fung, E; Monnot, AD. *Phototoxicity Evaluation of Hair Cleansing Conditioners*. *Cosmetics*, 2019; [s.l.], v. 6, n. 3, p. 53-60. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cosmetics6030053>.
- Tzouveleakis A, et al. *Stem cell therapy for idiopathic pulmonary fibrosis: a protocol proposal*. **J Transl Med** 2011;9:182.
- Ulrich, TA. et al. *Probing cellular mechanobiology in three-dimensional culture with collagen-agarose matrices*. **Biomaterials** 2010; 31, 1875-1884.
- Uma Devi, P. et al. *In vivo radioprotection by ocimum flavonoids: survival of mice*. **Radiat. Res.**, 1999; 151, 74-78.
- Urbach F., in: F. Urbach (Ed.), *Biological Responses to UVA radiation*, **Valdemar Publishing Company**, Overland Park, 1992, p. 1.

- Valachova, K. *et al.* *Skin wound healing with composite biomembranes loaded by troponin or captopril.* **J. Biotechnol.** 2020; 310, 49–53.
- Vendramin FS.; Franco D.; Franco TR. *Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo.* **Rev. Bras. Cir. Plást.** 2009;24(2)212-8.
- Vieira, AP. *et al.* *Ação dos flavonoides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar.* Semina: **Ciênc. Biol. Saúde**, 2008; v. 29, n. 1, p. 65-74.
- Vile GF.; Tyrrell RM. *UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen.* **Free Radical Biology and Medicine** 1995;18: 721-730.
- Vörsmann, H. *et al.* *Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing.* **Cell Death Dis.** 2013;4, e719.
- Wagh, VD. *Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials.* **Adv. Pharmacol. Sci.** 2013; 2013, 308249.
- Wang, J. *et al.* *Mechanical micronization of lipoaspirates for the treatment of hypertrophic scars.* **Stem Cell Res. Ther.** 2019; 10, 42.
- Weiss DJ, *et al.* *Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases.* **Proc Am Thorac Soc** 2011;8: 223–272.
- Wenzel, C., *et al.* *3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions.* **Experimental Cell Research**, 2014;323(1), 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.01.017>
- Werner, S.; Krieg, T.; Smola, H. *Keratinocyte fibroblast interactions in wound healing.* **J. Invest. Dermatol.**, 2007;127(5):998-1008. [doi:10.1038/sj.jid.5700786]
- WHO (2012) *World Health Organization. Media Centre.* Fact sheet n. 365. Disponível on line em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/en/index.html>>, acesso em: 20 ag. 2022.
- WHO (2014) **WHO.** *World Health organization Facts about injuries: burn.* Disponível on line em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/en/>>. Acesso em: 03 mar. 2022
- WHO.** *Global Solar UV index.* ISBN 92 4 159007 6, 2002

- Widmark J. *Ober den Einfluss des Lichtes auf die Haut*. **Hygiea Festband**. 1889
- Willan R. *On Cutaneous Diseases*. **Johnson**, London. 1808.
- Wu, NL *et al.* *Chrysin Protects Epidermal Keratinocytes from UVA- and UVB-Induced Damage*. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, Taiwan. 2011; 59-.8391-8400.
- Xi J.; Zhang SC. *Stem cells in development of therapeutics for Parkinson's disease: a perspective*. **J Cell Biochem** 2008; 105:1153–1160.
- Yue K, *et al.* *Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels*. **Biomaterials**. 2015; 73:254-71.
- Zappia, E. *et al.* *Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy*. **American Society Of Hematology: Blood**. Washington Dc, 2016; p. 1755-1761.
- Ziegler, A. *et al.* *Sunburn and p53 in the onset of skin cancer*. **Nature**, 1994;372, 773-776.
- Zorihah, A., Rasool, HBA. *The effects of honey sulfadiazine for the treatment of burns: A systematic review of randomized controlled trials*. **Burns** 2017; 43, 50–57.
- Zuk PA, *et al.* *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. **[MolBiol.Cell](#)**. 2002; 13(12):4279-95.
- Jin, S., *et al.*, *Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells from gingival connective tissue*. *Journal of periodontal research*, 2015. **50**(4): p. 461-467.