



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA LAURA MANTUANI IVAN

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E
DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO
DITIOCARBAMATO DE PIRROLIDINA NO ESTRESSE
OXIDATIVO INDUZIDO POR RADIAÇÃO UVB EM
CAMUNDONGOS SEM PELO**

ANA LAURA MANTUANI IVAN

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E
DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO
DITIOCARBAMATO DE PIRROLIDINA NO ESTRESSE
OXIDATIVO INDUZIDO POR RADIAÇÃO UVB EM
CAMUNDONGOS SEM PELO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Estadual de
Londrina

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rúbia Casagrande

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

I93a Ivan, Ana Laura Mantuani.
Avaliação da atividade antioxidante in vitro e do efeito anti-inflamatório e antioxidante do ditiocarbamato de pirrolidina no estresse oxidativo induzido por radiação UVB em camundongos sem pelo/ Ana Laura Mantuani Ivan. – Londrina, 2013.
101f.: il.

Orientador: Rúbia Casagrande.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2013.
Inclui bibliografia

1. Antioxidantes – Teses. 2. Radicais livres (Química) – Teses. 3. Estresse oxidativo – Teses. 4. Pele – Efeito da radiação – Teses. 5. Camundongo como animal de laboratório – Teses. I. Casagrande, Rúbia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 615:616.5

ANA LAURA MANTUANI IVAN

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E DO
EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO
DITIOCARBAMATO DE PIRROLIDINA NO ESTRESSE OXIDATIVO
INDUZIDO POR RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS SEM PELO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Rúbia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra Fabiana Testa Moura de Carvalho
Vicentini
Universidade de São Paulo – USP

Londrina, 22 de Março de 2013.

A Deus, presença constante em minha vida, por sempre iluminar meus passos e abençoar minhas decisões.

Aos meus pais, Lauro e Adriana, fonte inesgotável de amor incondicional, pelo imenso apoio em todos os momentos!

Ao meu irmão João Maurício e toda minha família, por todos os momentos compartilhados!

Ao meu amor, Rodrigo, por sua infinita paciência, compreensão e companheirismo, pelo seu imenso amor!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Rúbia Casagrande, pela acolhida, oportunidade e confiança depositada, por toda sua dedicação e por seus ensinamentos. Muito obrigada por tudo! As mesmas palavras se estendem ao Dr. Waldiceu Ap. Verri Jr.

À minha companheira de Mestrado, Marcela Zambrim Campanini, pela imensa ajuda em todo o trabalho, pela amizade construída e pelos momentos de alegria e descontração compartilhados.

A Renata Micheli Martinez e aos estagiários Vitor Ferreira Sottero e Vinícius Steffen pela ajuda com os experimentos.

Aos colegas do Laboratório de LPG/CCS, em especial a Chiara Cristina Bortolasce, Carine Conegliam de Farias e a Técnica Denise Duarte por toda colaboração.

A Dra. Maria Emília Fávero e o Dr. Décio Sabbatini Barbosa por todo o auxílio e suporte oferecido.

A todos os alunos do Laboratório de Patologia Experimental, principalmente a Ana Carla Zarpelon pelo auxílio prestado, a ajuda de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

A Dra. Maria José Vieira Fonseca por nos receber em seu laboratório de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial a aluna Fernanda Maria Pinto Vilela, pela colaboração com as metodologias analíticas.

Aos funcionários Izaltino e José pelo cuidado e dedicação aos animais experimentais.

Aos animais experimentais, por propiciarem a realização deste trabalho, o meu respeito e a minha eterna gratidão.

A todos os Professores e Pesquisadores que aceitaram o convite para participarem da banca deste trabalho.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação por toda a assistência.

A CAPES pelo auxílio financeiro concedido na forma de bolsa de estudo.

Ao CNPq e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho, muito obrigada!

“Aprender é a única coisa da qual a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”

Leonardo da Vinci

Ivan, Ana Laura Mantuani. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e do efeito anti-inflamatório e antioxidante do ditiocarbamato de pirrolidina no estresse oxidativo induzido por radiação UVB em camundongos sem pelo.** 2013. 101f. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

A exposição à radiação UVB causa muitos danos à pele como câncer e envelhecimento precoce. Esses eventos estão relacionados com o aumento de radicais livres e processos inflamatórios. O uso de antioxidantes como o ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC) pode ser uma estratégia para a prevenção dos danos fotooxidativos. O PDTC é um potente antioxidante sintético, e tem sido utilizado em processos que envolvem a participação de radicais livres e citocinas. Assim, o presente estudo avaliou *in vitro* o mecanismo de atividade antioxidante do PDTC e *in vivo* os efeitos benéficos do PDTC na inibição dos danos fotooxidativos induzidos por radiação UVB. Primeiramente foi realizada uma análise de tempo-resposta de instalação do estresse oxidativo/inflamação cutânea após a irradiação dos animais com a dose de 4,14 J/cm² de UVB. Os efeitos do PDTC foram testados por duas vias, intraperitoneal nas doses de 10, 30 e 100 mg/Kg, administrado 1 h antes da irradiação e 8 h após a primeira dose e por via tópica (0,5 g) administrado 12 h, 6 h, 5 min antes e 6 h após o início da irradiação. Os resultados *in vitro* demonstraram que o PDTC possui capacidade de sequestrar o radical 2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) apresentando IC₅₀ de 0,74, 5,14 e 66,53 µg/mL, respectivamente. Ainda, o PDTC também inibiu eficientemente a peroxidação lipídica dependente (IC₅₀ de 1,08 µg/mL) e independente de ferro (IC₅₀ de 3,77 µg/mL), além de possuir atividade queladora do íon ferro (IC₅₀ de 35,32 µg/mL). Na avaliação do tempo-resposta de instalação do estresse oxidativo/inflamação na pele dos camundongos sem pelo verificou-se que a retirada das amostras 12 h após o término da irradiação foi adequado para analisar o aparecimento de edema cutâneo, aumento do recrutamento de neutrófilos (analisado indiretamente pelo ensaio da mieloperoxidase), aumento da secreção/atividade da metaloproteinase 9 (MMP-9), bem como a diminuição da capacidade antioxidante da pele (GSH, FRAP e ABTS). O aumento significativo dos níveis da citocina IL-1β na pele foi observado 2 h após o término da irradiação. *In vivo*, o tratamento com PDTC por ambas as vias levou a uma diminuição estatisticamente significativa dos parâmetros inflamatórios (edema, recrutamento de neutrófilos, MMP-9 e níveis de IL-1β), além de manter a capacidade antioxidante da pele (GSH, FRAP e ABTS). Os dados obtidos sugerem que o PDTC é um fármaco promissor para prevenir os danos que a radiação UVB causa na pele, sendo necessários mais estudos pré-clínicos e moleculares para a compreensão completa dos seus efeitos protetores.

Palavras-chaves: Atividade antioxidante. Radicais livres. Estresse oxidativo. PDTC. Radiação UVB

Ivan, Ana Laura Mantuani. **Antioxidant activity evaluation *in vitro* and the anti-inflammatory and antioxidant effect of pyrrolidine dithiocarbamate on oxidative stress induced by UVB irradiation in hairless mice.** 2013. 101p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Exposure to UVB radiation causes skin damage such as cancer and premature aging. These effects are mainly related to the increase of free radicals and inflammatory processes. The use of antioxidant such as pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) can prevent the fotoxidative damage. The PDTC is a potent synthetic antioxidant, and it has been used in pathological processes which involve free radicals and cytokines. Thus, the present study evaluated *in vitro* the antioxidant mechanisms of PDTC and *in vivo* the beneficial effects of PDTC against UVB irradiation-induced oxidative damages. Firstly, a time-response evaluation was performed in order to verify the cutaneous oxidative stress/inflammation installation on animals after UVB-irradiation (4.14 J/cm²). The effects of PDTC were tested in two pathways, intraperitoneal (10, 30 and 100 mg/Kg), 1h before the irradiation and 8 h after the first dose and topic (0.5 g) 12 h before, 6 h before, 5 min before and 6 h after the begin of irradiation. The *in vitro* results demonstrated that PDTC presented ability to scavenge 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) radical (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical (DPPH) and hydroxyl radical ([•]OH) with IC₅₀ of 0.74, 5.14 and 66.53 µg/mL, respectively. PDTC also efficiently inhibited iron-dependent (IC₅₀ of 1.08 µg/mL) and independent (IC₅₀ of 3.77 µg/mL) lipid peroxidation. Further, PDTC inhibited chelated iron (IC₅₀ of 35.32 µg/mL). In time-response evaluation of oxidative stress/inflammation installation, results show that the removal of skin sample 12 h after the end of irradiation was more appropriated to analyze the following parameters: cutaneous edema, neutrophil recruitment (determined by the myeloperoxidase assay), increase of metalloproteinase 9 (MMP-9) secretion/activity, as well as the reduction of antioxidant capacity of the skin (GSH, FRAP and ABTS). However, significant increase in IL-1β levels was observed 2 h after the end of the irradiation. Regarding *in vivo* studies, PDTC administered by both pathways was able to significantly decrease inflammatory parameters (edema, neutrophil recruitment, MMP-9 and IL-1β) and to maintain the antioxidant capacity of the skin (GSH, FRAP and ABTS). These data suggest that PDTC may be a promising drug to prevent and/or treat UVB radiation-induced skin damages; however, pre-clinical and molecular investigations are still needed for complete understanding of its protective effects.

Keywords: Antioxidant activity. Free radicals. Oxidative stress. PDTC. UVB radiation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular do PDTC	23
Figura 1' – Avaliação tempo-resposta do edema cutâneo induzido por radiação UVB em camundongos sem pelo	84
Figura 2' – Avaliação tempo-resposta do aumento da atividade da MPO induzida pela radiação UVB em camundongos sem pelo	84
Figura 3' – Avaliação tempo-resposta do aumento da produção de IL-1 β induzida pela radiação UVB em camundongos sem pelo	85
Figura 4' – Avaliação tempo-resposta do aumento da atividade/secreção de MMP-9 induzida pela radiação UVB em camundongos sem pelo	85
Figura 5' – Avaliação tempo-resposta da diminuição do antioxidante endógeno GSH induzido pela radiação UVB em camundongos sem pelo	86
Figura 6' – Avaliação tempo-resposta da diminuição da capacidade antioxidante da pele através do ensaio FRAP	86
Figura 7' – Avaliação tempo-resposta da diminuição da capacidade antioxidante da pele através do ensaio ABTS.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Ativador de proteína-1
APS	Persulfato de amônio
BPS	Batofenantrolina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DDTC	Dietil ditiocarbamato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FeCl ₃ .6H ₂ O	Cloreto férrico hexahidratado
FRAP	Poder antioxidante de redução férrica
GCS	γ-glutamil-cisteína-sintetase
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
GSH	Glutathiona reduzida
HCl	Ácido clorídrico
HOCl	Ácido hipocloroso
HTAB	Brometo de hexadecil trietil amônio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido ortofosfórico
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IκB	Fator inibidor de κB
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
KCl	Cloreto de potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico

KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
KOH	Hidróxido de potássio
LPS	Lipopolissacarídeo
MAP	Proteína ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κB	Fator nuclear-κB
NO	Óxido Nítrico
NO [•]	Radical óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio molecular diatômico
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlet
O ₃	Ozônio
[•] OH	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	Tampão fosfato salino
PDTC	Ditiocarbamato de pirrolidina
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PLA2	Fosfolipase A2
RO ₂ [•]	Radical peroxil
RUV	Radiação ultravioleta
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloro acético

TGF- α	Fator de transformação do crescimento- α
TNF	Fator de necrose tumoral
TPTZ	2,4,6 tripiridil-S-triazina
Tris	Hidroximetil aminometano
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Radicais livres e estresse oxidativo	15
1.2	Radiação UV e os danos à pele	16
1.3	Ditiocarbamato de pirrolidina	22
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo Geral	26
2.2	Objetivos Específicos	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Materias	27
3.1.1	Reagentes	27
3.1.2	Equipamentos	27
3.2	Métodos	28
3.2.1	Avaliação in vitro da atividade antioxidante do PDTC por diferentes métodos	28
3.2.1.1	Determinação da atividade doadora de íons hidrogênio ao radical DPPH pelo PDTC	28
3.2.1.2	Avaliação da capacidade sequestradora do radical ABTS pelo PDTC	28
3.2.1.3	Determinação da atividade sequestradora do radical •OH pelo PDTC utilizando ensaio de deoxirribose	29
3.2.1.4	Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica induzida por Fe ²⁺ pelo PDTC	30
3.2.1.5	Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica independente de Fe ²⁺ pelo PDTC	31
3.2.1.6	Determinação da atividade queladora do íon ferro pelo PDTC utilizando a batofenantrolina (BPS)	31
3.2.2	Avaliação do efeito terapêutico in vivo do PDTC na prevenção do estresse oxidativo/inflamação induzido por radiação UVB	32
3.2.2.1	Animais experimentais	32
3.2.2.2	Sistema e fonte de radiação UVB	32

3.2.2.3	Medida da irradiância da lâmpada UVB.....	33
3.2.2.4	Avaliação tempo-resposta de instalação do estresse oxidativo/inflamação após a irradiação UVB.....	33
3.2.2.5	Protocolo experimental para administração do PDTC intraperitoneal.....	34
3.2.2.6	Preparo da formulação com PDTC.....	34
3.2.2.7	Protocolo experimental para administração tópica de PDTC.....	35
3.2.2.8	Avaliação da eficácia anti-inflamatória in vivo do PDTC através do ensaio de edema cutâneo, MPO, MMP-9 e dosagem de citocina pró-inflamatória (IL-1 β).....	35
3.2.2.8.1	Avaliação do edema cutâneo.....	35
3.2.2.8.2	Ensaio de MPO.....	36
3.2.2.8.3	Avaliação da inibição de secreção/atividade da MMP-9.....	36
3.2.2.8.4	Avaliação da produção de IL-1 β	38
3.2.2.9	Avaliação da eficácia in vivo do PDTC na proteção da capacidade antioxidante da pele.....	38
3.2.2.9.1	Dosagem do antioxidante endógeno GSH.....	38
3.2.2.9.2	Ensaio FRAP.....	39
3.2.2.9.3	Ensaio ABTS.....	40
3.3	Análise estatística.....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	41
4.1	Pyrrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin oxidative stress and inflammation in hairless mice and showed antioxidant activity in vitro.....	41
4.2	Efficacy of topical formulation containing PDTC against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice.....	70
5	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	ANEXO A – Avaliação tempo-resposta dos ensaios realizados in vivo.....	84

ANEXO B – Guia para autores - The Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology	88
ANEXO C – Guia para autores - Journal of Dermatological Science.....	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 Radicais livres e estresse oxidativo

Radical livre é qualquer espécie química com um ou mais elétrons desemparelhados, geralmente instáveis e reativos, e com capacidade de existência independente. Uma vez formado, o radical pode reagir com outro ou com outra molécula por várias interações. A velocidade e seletividade desses tipos de reações dependem principalmente da concentração do radical e da localização do elétron desemparelhado (ARUOMA, 1998).

Os radicais livres de maior importância para os organismos vivos incluem o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e o radical peróxil ($\text{RO}_2\cdot$). O peroxinitrito (ONOO^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e o ozônio (O_3) não são considerados radicais livres, porém podem facilmente sofrer reações e formar radicais livres (ARUOMA, 1998). Em sistemas biológicos os radicais livres são derivados principalmente do oxigênio molecular diatômico (O_2) e são denominados espécies reativas de oxigênio (EROS) e há também as espécies reativas de nitrogênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A maioria das EROS são geradas nas células pela cadeia respiratória mitocondrial (REUTER et al., 2010). Sabe-se que as EROS desempenham diferentes papéis *in vivo*, alguns são benéficos e estão relacionados com sua participação na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização intra e intercelular. Porém, as EROS podem ser muito prejudiciais atacando lipídeos de membrana, proteínas e enzimas teciduais, carboidratos e ácido desoxirribonucléico (DNA), induzindo oxidação nestas moléculas, causando danos a membrana, modificações protéicas e danos ao DNA (PIETTA, 2000).

Estes danos oxidativos ocorrem principalmente quando há um desequilíbrio entre as EROS e os sistemas de defesa antioxidante, efeito conhecido como estresse oxidativo, que tem sido implicado em numerosas doenças como câncer, aterosclerose, artrite reumatóide, Parkinson, doença neuro motora e diabetes (ARUOMA, 1999). Das macromoléculas, as mais suscetíveis ao ataque das EROS são os lipídios, visto que as membranas biológicas apresentam uma grande quantidade de lipídios insaturados e são banhadas por fluídos ricos em oxigênio e metal (BUEGE; AUST, 1978).

Para neutralizar as EROS os sistemas biológicos necessitam dos antioxidantes, que por definição são qualquer substância que, quando presente em concentrações baixas comparada com o substrato oxidável (proteínas, lipídios, carboidratos, DNA), consegue retardar ou impedir a oxidação destas moléculas (HALLIWELL et al., 1995).

O organismo humano é rico em antioxidantes endógenos e há pelo menos três mecanismos endógenos de defesa contra as EROS. O sistema enzimático formado pela superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GSH-Px); o sistema não enzimático que pode ser subdividido em três categorias, os antioxidantes de baixo peso molecular, que podem ser sintetizados pelas células como a glutathione; os antioxidantes provenientes da dieta, como ácido ascórbico, tocoferol, polifenóis e ácido lipóico e ainda os produtos de eliminação como o ácido úrico, estes são conhecidos por ação direta, responsáveis pelo sequestro das EROS; já o terceiro sistema é composto pelos quelantes de metais, também de baixo peso molecular, apresentam ação indireta, como por exemplo, os transportadores de ferro (ferritina, hemoglobina, transferrina) e de cobre (ceruloplasmina). Os sistemas de defesa são complementares uns aos outros, já que atuam contra EROS diferentes e em diversos compartimentos celulares (PIETTA, 2000).

A ação dos antioxidantes pode se dar através da inibição da produção ou sequestro de EROS (ARUOMA, 2003). Além disso, os antioxidantes podem atuar por meio do aumento de antioxidantes endógenos, como por exemplo, regulando a expressão de genes que codificam antioxidantes enzimáticos como SOD, catalase e GSH-Px (ARUOMA, 2003).

Algumas situações como poluição do ar, radiação ultravioleta (UV), fumaça de cigarro, dieta rica em ácidos poli-insaturados, inflamação, isquemia/reperfusão podem levar a um aumento na geração de EROS, causando uma saturação no nosso sistema de defesa antioxidante endógeno, sendo necessário o uso de antioxidantes exógenos para evitar os danos oxidativos (PIETTA, 2000).

1.2 Radiação UV e os danos à pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e está constantemente exposta a um elevado grau de estresse oxidativo ocasionado por fatores externos e internos (KOHEN, 1999), devido a sua função de interface entre o corpo e o ambiente (REUTER et al., 2010).

A pele é um órgão complexo com vários tipos de células e estruturas, é dividida em três regiões: epiderme, derme e a hipoderme. A camada superior da pele é a epiderme, esta é

constituída de vários tipos celulares, sendo a maior parte composta por queratinócitos, mas há também melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (RITTIE; FISHER, 2002; KOSTER; ROOP, 2004). Uma membrana basal separa a epiderme da derme, esta por sua vez é composta principalmente por proteínas da matriz extracelular produzidas por fibroblastos, como colágeno e elastina, e é nesta camada que estão localizados os vasos sanguíneos e linfáticos, além das estruturas anexiais. O colágeno tipo I é a proteína mais abundante desta camada, que contém ainda outros tipos de colágenos como tipo III, V e VII. A hipoderme é composta por células adiposas que reforçam a estrutura do tecido conjuntivo (RITTIE; FISHER, 2002).

Um dos principais fatores externos de danos à pele é a radiação UV. A radiação UV faz parte do espectro eletromagnético solar que atinge a terra e pode ser dividida em três regiões de acordo com o comprimento de onda. Onda curta UVC (200 – 280 nm), onda média UVB (280 – 320 nm) e onda longa UVA (320 – 400 nm). Quanto menor o comprimento de onda mais energética é a radiação, sendo assim, a UVC é a mais energética e que causa maior dano biológico, porém é praticamente toda retida pela camada de ozônio (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005). No entanto, a radiação UVA e UVB penetram a atmosfera e podem causar inúmeros danos ao organismo humano. A radiação UVA é a de menor energia e é mais abundante que a UVB, representando cerca de 95% de toda a radiação, possui a capacidade de penetrar mais profundamente na pele atingindo a epiderme, derme superficial e média (FLOR; DAVOLO; CORREA, 2007), sendo altamente relacionada com o fotoenvelhecimento, uma vez que pode alterar as fibras de colágenos da derme (PAZ et al., 2008). Já a radiação UVB atinge principalmente a epiderme e é cerca de mil vezes mais eficiente em causar queimaduras na pele (FLOR; DAVOLO; CORREA, 2007; PAZ et al., 2008).

Os queratinócitos são os principais responsáveis pela absorção cutânea de radiação UVB na pele e a capacidade da pele se proteger contra o estresse oxidativo gerado por esta radiação é dependente da capacidade antioxidante deste tipo celular (CARINI et al., 2000). A ação da radiação UV na pele resulta em uma variedade de efeitos adversos como edema, eritema, queimaduras solares, inflamação, hiperplasia, hiperpigmentação, envelhecimento precoce e fotocarcinogêneses (AFAQ; ADHAMI; AHMAD, 2003).

O estresse oxidativo é considerado ser capaz de desempenhar um papel central na iniciação e condução dos eventos de sinalização que conduzem a resposta celular após a irradiação UV. A radiação UV leva a um aumento na pele de H_2O_2 e outras EROS além de diminuir os antioxidantes endógenos (RITTIE; FISHER, 2002). A exposição da pele a

radiação UV afeta a sobrevivência e proliferação de células epidérmicas e dérmicas e altera várias funções cutâneas (MARTINEZ et al., 2006).

Uma grande quantidade de antioxidantes enzimáticos como a SOD, a catalase e GSH-Px, assim como, antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos de baixo peso molecular, glutathiona reduzida (GSH), vitamina C e E, e carotenóides estão presentes na pele para protegê-la dos danos oxidativos. A maior parte destes se concentra na epiderme, visto ser a camada mais exposta às agressões. Em humanos, por exemplo, o nível de ascorbato na epiderme é cinco vezes maior que na derme (FUCHS, 1998).

A glutathiona, um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), é encontrada na célula predominantemente na sua forma reduzida e normalmente na concentração de 1-5 mM (MOERLLERING et al., 1999). É considerada o antioxidante endógeno produzido em maior quantidade pelas células (REUTER et al., 2010) e um dos mais importantes antioxidantes endógenos contra EROS produzidas por radiação UV. Na pele é encontrada principalmente na epiderme, a camada de pele considerada a primeira linha de defesa (MELONI; NICOLAY, 2003; CARINI et al., 2000).

Este composto versátil atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos, incluindo síntese protéica, metabolismo e proteção celular, (CARINI et al., 2000; MELONI; NICOLAY, 2003) age como um sequestrador de radical livre (MOERLLERING et al., 1999), atua efetivamente contra o radical hidroxil (MAHER, 2005) e produtos da peroxidação lipídica incluindo o peroxinitrito. A GSH sequestra radicais diretamente por transferência de hidrogênio, atua como cofator para a enzima GSH-Px e regenera vitamina C e E (CARINI et al., 2000; MELONI; NICOLAY, 2003). Talvez o papel mais importante da GSH seja promover a principal linha de defesa para proteção das células contra as substâncias provenientes do estresse oxidativo (MAHER, 2005).

Fuchs et al. (1989), demonstraram uma diminuição significativa de GSH na pele de camundongos sem pelo expostos a radiação UVB em comparação com camundongos não irradiados, provando que o sistema glutathiona é fortemente alterado pelo estresse oxidativo induzido por radiação UVB. O aumento da produção de EROS após a exposição aos raios UV pode esgotar essas defesas antioxidantes deixando a pele vulnerável ao ataque de EROS (HALLIDAY, 2005).

A radiação UVB e com menor participação a radiação UVA são responsáveis pelos casos de câncer induzidos pela luz solar. O processo carcinogênico é iniciado por danos ao DNA. A radiação UVB possui energia suficiente para causar dano direto ao DNA com formação de fotoprodutos 6-4 e os dímeros de pirimidinas ou ciclobutanos (BATISTA et al.,

2008; HECK et al., 2004). Os danos são causados por ligação errônea de duas pirimidinas na mesma fita de DNA. Em vez de ocorrer o pareamento clássico AT ou GC, as bases podem ligar-se por meio de CC, TT ou CT. A radiação UVB pode causar também transversões de C→A e G→T, além de quebras no DNA (MARTINEZ et al., 2006).

Já a radiação UVA não possui energia suficiente para induzir dano direto ao DNA, e os danos causados a estes são induzidos indiretamente através da formação de EROS (HECK et al., 2004), que são produzidas através da estimulação de cromóforos como DNA e aminoácidos aromáticos que excitados pela captura de fótons da radiação UVA, transferem energia para o oxigênio molecular levando assim a geração de EROS (FONSECA, 2010). Estas podem causar lesões nas bases que compõem o DNA levando a erros no pareamento que podem levar a mutações e rearranjos cromossômicos que desencadeiam o câncer (MARTINEZ et al., 2006).

O processo de fotocarcinogênese é muito complexo mostrando ser resultado de uma associação de fatores provocados pela radiação UV como inflamação, estresse oxidativo, mutação do gene e imunossupressão (HALLIDAY, 2005).

Tanto a radiação UVA quanto a UVB ativam na pele a óxido nítrico sintase (NOS), aumentando o nível de óxido nítrico (NO) na pele. O NO é produzido a partir do aminoácido L-arginina por ação da NOS. O NO aumentado na pele pode combinar-se com o $O_2^{\cdot-}$ também produzido pela radiação UV e formar o $ONOO^{\cdot-}$, que existe em equilíbrio com o ácido peroxinitroso. Estas espécies reativas de nitrogênios formadas são muito tóxicas e podem causar danos ao DNA, nitrosilação de resíduos de tirosina em proteínas e iniciar a peroxidação lipídica, todos os quais interferem com a função celular (HALLIDAY, 2005).

Além do DNA, as EROS formadas pela radiação UV podem causar dano oxidativo em proteínas e lipídios. A peroxidação lipídica, consequência da radiação UV, leva a uma desorganização da membrana celular com liberação de ácido graxo como o ácido araquidônico a partir de fosfolipídios, o que desencadeia aumento da fosfolipase A2 (PLA2) e da ciclooxigenase-2 (COX-2), resultam em níveis aumentados de prostaglandinas (PG), incluindo a prostaglandina E2 (PGE2) que resulta em inflamação na pele (HALLIDAY, 2005).

A inflamação causada na pele pela radiação UV resulta em um aumento de células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos, estes também produzem grandes quantidades de NO e EROS como o $O_2^{\cdot-}$ e, portanto, elevam o nível de $ONOO^{\cdot-}$ no local da lesão, desencadeando os mesmos eventos citados acima (HALLIDAY, 2005). As células inflamatórias também produzem mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, as

quais atuam recrutando mais células inflamatórias para o local da lesão e produzindo mais EROS. Portanto, estresse oxidativo e a inflamação, induzidos pela radiação UV estão intimamente relacionados e levam a um círculo vicioso, que resultará em danos teciduais e em longo prazo, pode conduzir a carcinogênese (REUTER et al., 2010).

A radiação UVB causa recrutamento de células inflamatórias que se inicia após a irradiação e permanece alta por alguns dias (BATHIA et al., 2011). As EROS podem causar dano celular direto ou agir como segundo mensageiro na ativação das respostas celulares que controlam o destino das células e a inflamação (LEE; KIM; LEE, 2008). Após a radiação, as células epidermais liberam uma variedade de citocinas, as quais têm sido descritas como mediadoras da resposta inflamatória da pele (BATHIA et al., 2011).

A liberação de citocinas é considerada ter uma função central nos efeitos imunopatológicos mediados pela radiação UV. Interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) foram descritas como indutoras de inflamação local na pele após irradiação UVA, e altos níveis de IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- α) oriundos provavelmente da ativação de queratinócitos foram encontrados no plasma de indivíduos expostos a radiação UVB (GRANDJEAN-LAQUERRIERE et al., 2002). Outras citocinas como TNF- α e TNF- β são encontradas na pele e liberadas após a radiação UV, se ligam a receptores de membrana e iniciam a transdução de sinais (HECK et al., 2004).

Baixas doses de radiação UVB (5-40 mJ/cm²) induziu em cultura de queratinócitos humanos a expressão de várias citocinas proinflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IL-6, as quais estimulam as reações de outras células efetoras na pele como leucócitos e células endoteliais (CARINI et al., 2000).

A radiação UV pode liberar fatores de crescimento e citocinas latentes das células epidermais ou leucócitos infiltrados que vão atuar de forma autócrina ou parácrina para estimular a sinalização intracelular. Um exemplo é a IL-1, que está presente na pele na forma latente e é liberada após a exposição à radiação UV podendo facilmente induzir sinalização intracelular de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases). Assim, dependendo do tipo celular, a irradiação UV induz a ativação funcional das subfamílias multi-membros da MAP quinases, como as quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinases p38 e quinase c-Jun N-terminal (JNK), as quais se translocam para o núcleo e ativam muitos alvos, incluindo fatores de transcrição (HECK et al., 2004).

Os fatores de transcrição, fator nuclear- κ B (NF- κ B) e ativador de proteína -1 (AP-1), são ativados pela radiação UVB em células de mamíferos, mas também podem ser ativados

por outros agentes como lipopolissacarídeo (LPS), IL-1 e TNF- α (GRANDJEAN-LAQUERRIERE et al., 2002).

A ativação da via NF- κ B pela radiação UV estimula a expressão de genes que codificam citocinas inflamatórias, enquanto a ativação da via AP-1 também pela radiação UV promove a expressão de genes que codificam metaloproteinases da matriz (MMPs). Ambas as vias contribuem para os danos causados à pele pela radiação UV, como fotoenvelhecimento e câncer de pele (VICENTINI et al., 2011). AP-1 regula também a expressão de muitos genes envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação celular (RITTIÉ; FISHER, 2002). O NF- κ B também tem sido descrito como um dos mais importantes fatores de transcrição para a produção de MMP-9 (CHOU et al., 2010).

As MMPs são uma grande família de endopeptidases dependente de zinco com uma ampla gama de substratos (RITTIÉ; FISHER, 2002). Coletivamente, as MMPs são capazes de degradar todas as proteínas componentes da matriz extracelular e das membranas basais (NAVARRO et al., 2006). Desempenham papel importante na remodelação de matriz extracelular em muitos processos fisiológicos e patológicos. As MMPs degradam as macromoléculas da matriz, incluindo o colágeno intersticial, a fibronectina, a laminina e a proteoglicana, entre outras. Estudos recentes têm demonstrado uma forte associação entre a expressão desregulada de genes que codificam as MMPs e várias condições fisiopatológicas como câncer, artrite, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e outras (STANIFORTH et al., 2011).

As MMPs são secretadas na forma de proenzimas inativas, denominadas zimogeneses, ativados no ambiente pericelular dos tecidos (NAVARRO et al., 2006; RITTIÉ; FISHER, 2002). Diferentes tipos de células da pele como leucócitos polimorfonucleares, fibroblastos, queratinócitos, monócitos, macrófagos e as células endoteliais, são conhecidas por produzirem MMPs. Essas células são capazes de responder a fatores de crescimento e citocinas, incluindo IL-1, a TNF- α e o fator de transformação do crescimento- α (TGF- α). Na presença dessas substâncias, essas células liberam as MMPs de grânulos específicos de armazenamento para o meio extracelular (NAVARRO et al., 2006). A expressão de MMPs é conhecida por ser regulada em vários níveis incluindo transcricional e postranscricional (STANIFORTH et al., 2011).

A expressão de genes que codificam as MMPs-1, 3 e 9 é induzida após a irradiação UV na pele humana *in vivo*. Esta observação é consistente com a indução do fator de transcrição AP-1 pela radiação UV. A transcrição de genes que codificam MMPs-1, 3 e 9 é induzida dentro de 8 h após a irradiação UV. A indução de MMPs pela radiação UV é, em

parte, responsável por danos causados ao tecido conjuntivo da pele. Juntas, MMPs-1, 3 e 9 têm a capacidade de degradar completamente o colágeno fibrilar maduro da pele. O aumento da degradação de colágeno foi observado dentro de 24 h após a irradiação UV na pele humana *in vivo* (RITTIÉ; FISHER, 2002).

A radiação UVB é responsável por induzir a expressão de genes que codificam duas importantes MMPs, a MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B), as quais têm sido associadas com o fotoenvelhecimento e fotocarcinogêneses na pele (STANIFORTH et al., 2011). Staniforth et al., (2011) demonstraram que houve aumento na expressão de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) de MMPs-2 e 9 na pele de camundongos irradiados com radiação UVB, indicando aumento da regulação transcricional destes genes pela radiação UVB.

1.3 Ditiocarbamato de pirrolidina

Os ditiocarbamatos são amplamente utilizados na agricultura como pesticidas (KIM et al., 2000), fumegantes de sementes e em indústrias de borracha sintética como aceleradores de vulcanização (NICUOLO et al., 2001) e são considerados alérgenos de contato (KIM et al., 2000).

O seu baixo custo e escassa toxicidade aguda têm contribuído para o seu uso em larga escala, porém alguns efeitos como neurotóxico, fetotóxico, embriotóxico e mutagênico têm sido relatado por indivíduos expostos (NICUOLO et al., 2001). Paradoxalmente, os ditiocarbamatos possuem uso terapêutico em inúmeras doenças, como alcoolismo e intoxicação por metais (KIM et al., 2000).

Ditiocarbamatos têm sido utilizados para o tratamento de várias doenças com causas aparentemente não relacionadas, estas incluem câncer, aterosclerose, choque endotóxico e retinopatia diabética (KIM et al., 2000). Os diversos usos dos ditiocarbamatos têm sido atribuídos a sua alta atividade antioxidante tanto em células livres quanto em sistemas biológicos, por serem potentes inibidores do NF- κ B e por suas propriedades quelantes (CHEN et al., 2008).

Um dos seus derivados, o dietil ditiocarbamato (DDTC), tem sido usado há décadas para o tratamento de intoxicação por metais pesados em seres humanos e mais recentemente tem sido usado para retardar o início da síndrome da imunodeficiência adquirida em pessoas

infectadas pelo vírus HIV, através da inibição da ativação do NF- κ B (CUZZOCREA et al., 2002).

O ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC) é um tiol de baixo peso molecular derivado dos ditiocarbamatos (CHANG et al., 2009), é um composto sintético, estável, amplamente utilizado em estudos de biologia celular e conhecido por exercer tanto efeito antioxidante como pró-oxidante, dependendo das condições em que é empregado (NICUOLO et al., 2001). Estas ações opostas do PDTC têm sido frequentemente associadas com a presença de dois grupos sulfidrílicos na sua molécula (fig. 1) e a sua elevada capacidade de combinação com metais de transição (NICUOLO et al., 2001). Tem apresentado uma variedade de atividades bioquímicas como alterar o estado redox, quelar metais pesados e inibir enzimas (CHANG et al., 2009).

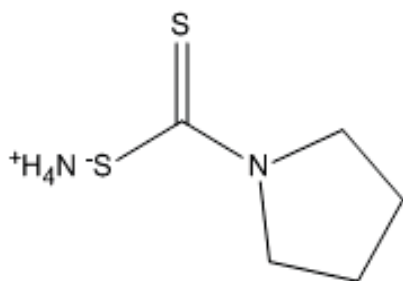


Fig. 1: Estrutura molecular do PDTC.

De todos os derivados do ditiocarbamatos o PDTC parece ser o inibidor mais potente do NF- κ B, resultado de sua capacidade em atravessar a membrana celular e apresentar estabilidade prolongada em soluções com pH fisiológico (CUZZOCREA et al., 2002). Tem sido utilizado como um antioxidante para combater os efeitos tóxicos dos radicais livres e para diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias. O PDTC pode ativar a expressão de genes que codificam antioxidantes endógenos como a superóxido dismutase por via independente de qualquer efeito sobre NF- κ B (CHANG et al., 2009). O potencial antioxidante do PDTC é primariamente devido ao seu grupo tiol, que neutraliza as EROS (CHENG et al., 2006).

O PDTC é responsável por induzir os genes que codificam as duas subunidades da enzima γ -glutamil-cisteína-sintetase (GCS), aumentando assim, a síntese de GSH (MOELLERING et al., 1999; WILD; MULCAHY, 1999). A concentração de PDTC necessária para induzir a síntese de GSH é bem menor que a necessária para inibir o NF- κ B (MOELLERING et al., 1999).

O estresse oxidativo ocasionado pela alta produção de EROS é considerado o maior ativador do NF- κ B. O efeito inibitório do NF- κ B pelo PDTC tem sido atribuído a sua capacidade antioxidante (KIM et al., 2000). O NF- κ B é um fator transcricional que desempenha papel central em processos fisiológicos, é chave na regulação da expressão de genes na inflamação e lesão celular (CUZZOCREA et al., 2002). Na maioria dos tipos celulares, os dímeros de NF- κ B ficam no citoplasma, ligados a subunidade inibitória κ B (I- κ B). Após alguns estímulos como radiação UV, vírus, citocinas, alteração do estado redox, EROS como H₂O₂ e ONOO⁻ (ALTURA; GEBREWOLD, 1998), o I- κ B sofre fosforilação, seguida de ubiquitinação e rápida degradação por via proteossoma dependente. Assim, o NF- κ B se torna livre e ativo, transloca para o núcleo e se liga ao DNA nas regiões promotoras de genes alvo e ativa, via transcricional, os genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-12 (BRUCK et al., 2002; CUZZOCREA et al., 2002), TNF- α , IL-6, IL-8 (GRANDJEAN-LAQUERRIERE et al., 2002), moléculas de adesão celular como molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e molécula de adesão celular intercelular-1 (ICAM-1), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e COX-2 (CUZZOCREA et al., 2002).

Grandjean-Laquerriere et al. (2002) irradiaram queratinócitos humanos da linha NCTC 2544 com radiação UVB e constataram que o PDTC foi capaz de inibir a ativação do NF- κ B, ativado pela radiação UVB.

Segundo Chang et al. (2009) o PDTC preveniu o dano oxidativo e reduziu a inflamação induzida pelo paraquate em ratos, além de melhorar os níveis de SOD, GSH-Px e malondialdeído (MDA), usado como indicador da peroxidação lipídica. Os resultados mostraram que o PDTC agiu como um antioxidante neutralizando os efeitos tóxicos dos radicais livres e interferiu na geração de citocinas pró-inflamatórias protegendo o pulmão dos danos oxidativos causados pelo paraquate. Além disso, as evidências morfológicas mostraram que o PDTC diminuiu as agressões celulares produzidas pelo paraquate.

Cuzzocrea et al. (2002) mostraram que o PDTC atenuou a inflamação aguda induzida por carragenina na pleura e a crônica induzida por colágeno nas articulações através da inibição da ativação do NF- κ B em camundongos. O PDTC também foi capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, o infiltrado de polimorfonucleares, a ativação de polipolimerase, a expressão e atividade de iNOS e COX-2. Além de reduzir a degradação do I κ B- α , molécula estabilizadora do NF- κ B, e a consequente translocação do NF- κ B do citoplasma para o núcleo.

Em outros estudos o PDTC também foi capaz de aumentar significativamente o GSH diminuído por isquemia/reperfusão hepática em ratos (LEE; KIM; LEE, 2008), além de inibir

o processo inflamatório em animais e cultura de células quando este está associado com a ativação do NF- κ B (PINKUS; WEINER; DANIEL, 1996; MOELLERING et al., 1999, MEISNER et al., 2000; BRUCK et al., 2002; LEE; KIM; LEE, 2008).

Há vários trabalhos que demonstram o potencial antioxidante do PDTC, como o realizado por Zhu; Carr; Frei (2002) que mostraram que o PDTC é um potente antioxidante sendo que uma molécula de PDTC foi capaz de sequestrar 11 moléculas de HOCl. O PDTC foi de duas a três vezes mais potente que o GSH e o *N*-acetilcisteína e tão potente como o DDTC no sequestro direto do radical HOCl, evitando assim, danos protéicos como a oxidação da lipoproteína humana de baixa densidade, a carbonilação de proteínas e inativação do inibidor de protease α 1-antiproteínase, todos induzidos pelo HOCl que pode ser gerado *in vivo* por neutrófilos e monócitos ativados.

Por esses efeitos torna-se interessante o estudo do PDTC *in vitro* e *in vivo*, em eventos que envolvem o estresse oxidativo e condições inflamatórias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Considerando o potencial antioxidante do PDTC contra os danos causados pela exposição à radiação UV em cultura de queratinócitos e em outros modelos de estresse oxidativo/inflamação, o presente estudo teve como objetivo investigar os mecanismos de atividade antioxidante do PDTC *in vitro*, bem como, avaliar seu efeito terapêutico quando administrado por via intraperitoneal e tópica em modelo de estresse oxidativo cutâneo induzido por radiação UVB.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o mecanismo de atividade antioxidante do PDTC utilizando as seguintes metodologias *in vitro*:
 - Capacidade doadora de hidrogênio ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH);
 - Capacidade sequestradora do radical 2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS);
 - Capacidade sequestradora do radical hidroxil;
 - Inibição da peroxidação lipídica induzida por ferro (Fe^{2+});
 - Inibição da peroxidação lipídica independente de Fe^{2+} ;
 - Atividade queladora do íon ferro;
- Análise tempo-resposta de instalação do estresse oxidativo/inflamação após a radiação UVB;
- Avaliação da eficácia anti-inflamatória *in vivo* do PDTC administrado intraperitoneal utilizando os testes de edema cutâneo, mieloperoxidase (MPO), atividade/secreção de metaloproteinase 9 (MMP-9) e dosagem de citocina proinflamatória (IL-1 β) e do PDTC administrado por via tópica utilizando os testes de edema cutâneo, MPO e atividade/secreção de MMP-9;
- Avaliação da eficácia *in vivo* do PDTC administrado intraperitoneal e tópico na proteção da capacidade antioxidante da pele através da dosagem do antioxidante endógeno GSH e dos ensaios de FRAP (poder antioxidante de redução férrica) e ABTS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materias

3.1.1 Reagentes

• Ácido linoléico, Sigma-Aldrich; • Ácido tiobarbitúrico (TBA), Synth; • Batofenantrolina (BPS), Acros; • Brometo de hexadecil trietil amônio (HTAB), Sigma-Aldrich; • Corante azul brilhante, Sigma-Aldrich; • Ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC), Alexis Corporation; • Fenantrolina, Sigma-Aldrich; • Fluoreto de fenilmetilsulfonila, Sigma-Aldrich; • Glutathione Reduzida (GSH), Sigma-Aldrich; • Kits de ELISA para dosagem das citocinas IL-1 β , eBioscience; • N-etilmaleimida, Sigma-Aldrich; • *o*-Dianisidina, Sigma-Aldrich; • Trolox, Acros • Xilene cianol, Amresco; • 2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), Sigma-Aldrich; • 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH), Sigma-Aldrich; • 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ), Sigma-Aldrich; • 2-deoxi-D-ribose, Acros; • Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), Sigma. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1.2. Equipamentos

• Agitador mecânico, Fisatom[®]; • Agitador Orbital, modelo 255, Fanem[®]; • Balança analítica, modelo HR-120, And, precisão de 4 casas; • Banho, modelo 314/2 DN, Nova Ética; • Banho, modelo Banho Maria 100, Fanem; • Centrífuga, modelo Baby I 206-BL, Fanem; • Centrífuga refrigerada, modelo Rotina 46 R, Hettich Zentrifugen, compartimento de madeira projetado para irradiação; • Deionizador de água, modelo Purebal Option-Q, Elga; • Espectrofotômetro, modelo Evolution 60, Thermo Scientific; • Espectrofotômetro, modelo Helios alfa, Thermo Spectronic; • Estufa 0 -120 °C, De LEO & Cia; • Fonte elétrica para eletroforese, modelo MS 300V, Major Science; • Homogeneizador de tecidos Ultra Turrax[®], modelo T18 basic, IKA; • Homogeneizador de tecido, modelo Tissue-Tearor, Biospec; • Lâmpada ultravioleta fluorescente, modelo PHILIPS TL/12 40W RS-UVB (MedicalHolland); • Leitor de microplaca, modelo Asys Expert Plus, Biochrom; • Leitor de microplaca, modelo Victor X3, Perkin Elmer; • Pipetas automáticas 20, 100, 200 e 1000 M, modelo LabMate, HTL; • pHmetro, modelo Tec-3MP, TECNAL; • Radiômetro IL 1700 Research Radiometer.

Detectores: SED240 – filtro UVB (290 nm), SED005 – filtro UV (350 nm); SED033 – filtro TRED (633 nm), International Light-USA; • Sistema de eletroforese Mini Vertical, modelo Mini-Protean[®] Tetra System, Bio-RAD; • Ultra-som, modelo TSO, Thornton.

3.2 Métodos

3.2.1. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do PDTC por diferentes métodos

3.2.1.1 Determinação da atividade doadora de íons hidrogênio ao radical DPPH pelo PDTC

A atividade antioxidante do PDTC foi determinada pela sua capacidade de doar hidrogênios e estabilizar o radical livre DPPH (BLOIS, 1958; CASAGRANDE et al., 2007).

A redução do radical DPPH foi determinada pela mudança na absorvância medida em 517 nm (BLOIS, 1958). Aliquotas de 50 µL das amostras de PDTC em diferentes concentrações, foram adicionadas ao meio reacional contendo 1 mL de tampão acetato 0,1 M (pH 5.5), 1 mL de etanol e 0,5 mL de solução etanólica de DPPH 250µM. As concentrações finais de PDTC obtidas no meio reacional foram de 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 2,5, 5,0, 5,5, 10,0, 25,0 e 50 µg/mL. A mudança na absorvância foi medida em espectrofotômetro após 30 min de incubação à temperatura ambiente.

O controle positivo foi preparado sem PDTC e o branco composto apenas de 1 mL de tampão acetato 0,1 M (pH 5.5) e 1,5 mL de etanol. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. A capacidade estabilizadora do radical DPPH foi calculada pela seguinte equação: Equação I: % atividade = $[1 - (\text{absorvância amostra} / \text{absorvância do controle})] \times 100$.

3.2.1.2 Avaliação da capacidade sequestradora do radical ABTS pelo PDTC

A capacidade antioxidante do PDTC frente ao radical livre ABTS foi realizada de acordo com SÁNCHEZ-GONZALES et al. (2005).

O radical ABTS foi produzido reagindo 7 mM da solução de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. A mistura foi armazenada em frasco âmbar e em temperatura ambiente por no mínimo 16 horas antes do uso. A solução ABTS foi diluída com tampão fosfato (pH 7.4) até uma absorvância de 0,700 a 0,800 nm.

Ao meio contendo 4 mL da solução ABTS diluída foi adicionado 10 μ L das amostras em diferentes concentrações, obtendo-se concentrações finais de PDTC no meio reacional de 0,08, 0,1, 0,2, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5 e 2,0 μ g/mL, após incubação de 6 minutos foram realizadas as leituras de absorvância em 730 nm.

O controle positivo não continha PDTC e o branco foi preparado com uma solução de persulfato de potássio diluída em tampão fosfato. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. A avaliação da capacidade sequestradora do radical ABTS foi calculada pela equação I.

3.2.1.3 Determinação da atividade sequestradora do radical \cdot OH pelo PDTC utilizando ensaio de deoxirribose

A avaliação da atividade sequestradora do radical \cdot OH pelo PDTC foi determinada pela diminuição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) provenientes da degradação da deoxirribose pelo radical \cdot OH gerado na reação de Fenton (HALLIWELL; GUTTERIDGE; ARUOMA, 1987).

Ao meio reacional contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio monobásico/hidróxido de potássio ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$) 20 mM (pH 7.4), 100 μ M de ascorbato, 50 μ M de cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 52 μ M de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), 2,8 mM de deoxirribose e 1 mM de H_2O_2 foram adicionados 50 μ L das amostras em diferentes concentrações, obtendo-se concentrações finais de PDTC no meio reacional de 10, 15, 25, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 250 e 500 μ g/mL. A reação foi incubada a 37°C por 30 min. Para determinar as TBARS que foram formadas, 1 mL de TBA 1% preparado em 50 mM de hidróxido de sódio (NaOH), 0,1 mL de NaOH 10 M e 0,5 mL de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) 20% foram adicionados. Em seguida incubou-se a reação por 20 min a 85°C, posteriormente a absorvância foi determinada em 535 nm.

O controle positivo foi preparado sem PDTC, o controle negativo sem ferro e o branco sem PDTC e deoxirribose. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. A atividade sequestradora do radical hidroxil foi calculada pela equação I.

3.2.1.4 Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} pelo PDTC

As mitocôndrias utilizadas nos experimentos foram obtidas através do fígado de camundongos Swiss provenientes do Biotério Central da UEL. Cerca de 10 camundongos pesando aproximadamente 30 g foram eutanasiados por deslocamento cervical, os fígados (10 a 15 g) foram removidos e a eles foram adicionados 50 mL de tampão fosfato salino (PBS) (pH 7.0). A mistura foi homogeneizada em turrax (T18 basic, IKA) até a obtenção de um homogenato. A suspensão obtida foi centrifugada a 1350 g por 5 min a 4°C em centrífuga refrigerada. O sobrenadante resultante foi novamente centrifugado a 5000 g por 10 min a 4°C. O precipitado obtido foi ressuspensionado em 10 mL de PBS e novamente centrifugado a 3000 g por 15 min a 4°C. O sedimento final contendo o concentrado de mitocôndrias, foi suspenso em 1 mL de tampão KCl/tris-HCl 130 mM e 10 mM respectivamente (pH 7.4) (CAIN; SKILLETER, 1987) e submetido a dosagem de proteínas pelo método de Biureto (GORDAL; BARDAWILL; DAVID, 1949). As mitocôndrias obtidas foram utilizadas como fonte de lipídios para a avaliação da peroxidação da lipídica.

A medida da atividade inibidora de peroxidação lipídica pelo PDTC foi determinada pela diminuição da formação de TBARS provenientes da peroxidação lipídica (BUEGE; AUST, 1978). Foram adicionados em 1 mL de meio de reação (130 mM de KCl e 10 mM de tris-HCl, pH 7,4), 2 mM de citrato de sódio, 20 μL das amostras em diferentes concentrações, obtendo-se concentrações finais de PDTC no meio reacional de 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 5,0, 10 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, suspensão de mitocôndria correspondente a 1 mg de proteína e 50 μM de sulfato ferroso amoniacal. A reação foi incubada a 37°C por 30 min. As substâncias reativas ao TBA foram estimadas dele método descrito no item 3.2.1.4. As TBARS foram extraídas com 2 mL de n-butanol e centrifugação a 2000 g por 10 min. A absorvância foi determinada em 535 nm.

Ao teste foi incluído o controle positivo sem PDTC, o controle negativo preparado sem PDTC e ferro. O branco foi preparado sem PDTC e sem mitocôndria. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. A atividade inibidora da lipoperoxidação lipídica induzida por Fe^{2+} foi calculada pela equação I.

3.2.1.5 Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica independente de Fe^{2+} pelo PDTC

A atividade inibidora da peroxidação lipídica independente de Fe^{2+} foi determinada pela diminuição da formação de hidroperóxido lipídico, um produto primário da peroxidação lipídica (LINGNERT et al., 1979). Primeiramente, preparou-se a emulsão de ácido linoléico 10 mM, em tampão fosfato de potássio monobásico/dibásico ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,1 M (pH 6.5), com auxílio de tween 20. Em 2 mL da emulsão foram adicionados 20 μL das amostras em diferentes concentrações, obtendo-se concentrações finais de PDTC no meio reacional de 0,50, 1,0, 2,5, 5,0, 10, 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A determinação de hidroperóxidos lipídicos foi realizada antes e após a incubação da emulsão contendo as amostras, a 37°C por 8 h. Assim, em 0,2 mL da emulsão incubada ou não foram adicionados a 2 mL de metanol e 6 mL de metanol 60% e a absorvância foi determinada em 234 nm.

No teste foi incluído o controle positivo sem PDTC. O branco foi constituído de tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M (pH 6.5) com tween 20. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. A atividade inibidora da lipoperoxidação independente de Fe^{2+} foi calculada pela seguinte equação:

Equação II: % atividade = $1 - (\text{absA após incubação} - \text{absA sem incubação}) / (\text{absC após incubação} - \text{absC sem incubação}) \times 100$. Onde: *absA* é a absorvância da amostra e *absC* é a absorvância do controle.

3.2.1.6 Determinação da atividade queladora do íon ferro pelo PDTC utilizando a batofenantrolina (BPS)

A atividade queladora do íon ferro foi determinada utilizando a BPS, um forte quelador do íon ferro, a qual forma um complexo colorido quando liga a este íon. A quelação de íons ferro pelo PDTC foi determinada pela mudança colorimétrica medida em 530 e 700 nm (BOLANM; ULVIK, 1987).

No meio reacional contendo 2 mL de tampão cloreto de potássio/hidroximetil aminometano-ácido clorídrico ($\text{KCl}/\text{Tris-HCl}$) 130 mM e 10 mM respectivamente (pH 7.4), foram adicionados 50 μM de sulfato ferroso amoniacal e 50 μL das amostras em diferentes concentrações, obtendo-se concentrações finais de PDTC no meio reacional de 0,5, 1,0, 5,0, 10, 25, 50, 100, 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 15 min de incubação à temperatura ambiente foram

adicionados 0,2 mM de BPS. A reação foi incubada por 15 min à temperatura ambiente e posteriormente as absorvâncias foram determinadas.

No teste foi incluído o controle positivo sem PDTC e o controle da amostra sem a BPS. O branco foi preparado sem PDTC e BPS. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. A atividade queladora de íons Fe^{2+} foi calculada pela equação I.

3.2.2 Avaliação do efeito terapêutico *in vivo* do PDTC na prevenção do estresse oxidativo/inflamação induzido por radiação UVB

3.2.2.1 Animais experimentais

Como modelo animal foram utilizados camundongos sem pelo da linhagem HRS/J, de ambos os sexos, adulto e com peso de 20 a 30 g. Os animais foram mantidos no biotério do Hospital Universitário de Londrina-PR, em sala com temperatura controlada, ciclo claro/escuro de 12h e com suprimento de água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos conforme as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (OF. CIRC. CEEA N° 160/2010 em 17 de dezembro de 2010, registrado no CEEA sob o n° 85/10, processo n° 33631.2010.82).

3.2.2.2 Sistema e fonte de radiação UVB

A fonte de luz utilizada nos experimentos para indução de estresse oxidativo foi uma lâmpada UVB fluorescente modelo PHILIPS TL/12 40W RS (Medical-Holand). A lâmpada emite radiação na faixa de λ de 270 a 400 nm com pico máximo de emissão em 313 nm.

A lâmpada foi instalada em um compartimento de madeira desenvolvido para a indução do estresse oxidativo. Os animais foram colocados em caixas de plástico e cobertos com uma tela plástica para garantir a total exposição da região dorsal. Um rodízio com as caixas contendo os animais foi realizado devido às variações de radiação ao longo da lâmpada. Os animais ficaram a 20 cm da fonte de irradiação e movimentavam-se livremente na caixa (CASAGRANDE et al., 2006).

3.2.2.3 Medida da irradiância da lâmpada UVB

A irradiância, taxa de fluxo de energia por unidade de área (W/cm^2), foi medida pelo radiômetro IL 1700 (Newburyport, MA, USA) equipado com detectores para radiação UV (SED005) e, especialmente, para UVB (SED240). A medida da irradiância foi realizada em toda a extensão do compartimento, a distância de 20 cm e com a presença da tela plástica utilizada para conter os animais. A dose de exposição (J/cm^2) foi obtida pela multiplicação da irradiância (W/cm^2) pelo tempo de exposição em segundos (CASAGRANDE et al., 2006).

3.2.2.4 Avaliação tempo-resposta de instalação do estresse oxidativo/inflamação após a irradiação UVB

A irradiação induz um processo inflamatório sendo tempo dependente à liberação dos mediadores inflamatórios, a migração de células inflamatórias e produção de EROS que desempenham um importante papel no desenvolvimento dos danos causados a pele pela radiação UV (AFAQ, ADHAMI, MUKHTAR, 2005). Sendo assim, foi necessária a padronização do melhor tempo após a irradiação para a coleta de amostra para as análises.

Realizou-se uma análise tempo-reposta de instalação do estresse oxidativo/inflamação para determinar o melhor tempo para retirada da pele para os testes de edema cutâneo, MPO, citocina pró-inflamatória (IL-1 β), MMP-9, GSH, FRAP e ABTS. 25 animais foram alocados em 5 grupos (n=5) e eutanasiados por anestesia terminal com éter etílico em diferentes tempos. Sendo:

- Grupo 1 = não irradiado;
- Grupo 2 = irradiados e eutanasiado logo após o término da irradiação;
- Grupo 3 = irradiados e eutanasiado 2 h após término da irradiação;
- Grupo 4 = irradiados e eutanasiado 4 h após término da irradiação;
- Grupo 5 = irradiados e eutanasiado 12 h após término da irradiação;

A dose de irradiação utilizada para indução do estresse oxidativo foi de $4,14 \text{ J}/\text{cm}^2$ (SHINDO; WITT; PACKER, 1993; CASAGRANDE et al., 2006). Posteriormente a pele do dorso foi retirada, limpa, lavada com cloreto de sódio (NaCl) 145 mM e armazenada a -70°C para as análises subsequentes. Os testes edema cutâneo, FRAP e ABTS foram realizados no mesmo dia da coleta. Os resultados obtidos nesta padronização foram apresentados anexos, uma vez que não foram utilizados na redação dos artigos científicos.

3.2.2.5 Protocolo experimental para administração do PDTC intraperitoneal

Os animais foram alocados aleatoriamente em cinco grupos (n=5). Sendo:

- Grupo 1 = não irradiados e tratados com o veículo (salina);
- Grupo 2 = irradiados e tratados com o veículo (salina);
- Grupo 3 = irradiados e tratados com PDTC 10 mg/kg;
- Grupo 4 = irradiados e tratados com PDTC 30 mg/kg;
- Grupo 5 = irradiados e tratados com PDTC 100 mg/kg;

O PDTC e o veículo (NaCl 0,9%) foram administrados intraperitonealmente 1h antes do início da irradiação e 8 h após a primeira dose. Para a dosagem de citocinas os animais foram tratados apenas uma vez, 1h antes do início da irradiação. A concentração de PDTC utilizada foi baseada no estudo de atividade anti-inflamatória realizado por Cuzzocrea *et al.* (2002). A dose de irradiação utilizada para indução do estresse oxidativo foi de 4,14 J/cm² (SHINDO; WITT; PACKER, 1993; CASAGRANDE *et al.*, 2006). Após 12 h do término da irradiação os animais foram eutanasiados por anestesia terminal com éter etílico, a pele do dorso foi retirada, limpa, lavada com NaCl 145 mM e a armazenada a -70°C para as análises subsequentes. Apenas para a dosagem de citocinas os animais foram anestesiados com éter etílico e eutanasiados por decapitação 2 h após o término da irradiação. Os testes edema cutâneo, FRAP e ABTS foram realizados no mesmo dia da coleta.

3.2.2.6 Preparo da formulação com PDTC

A emulsão foi preparada com 10% de cera auto-emulsionante Polawax[®] (álcool cetosteárilico e monoestearato de sorbitano etoxilado 20 OE), 5% de triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico, 6% de propilenoglicol, 1% de solução etanólica de metilparabeno a 10% e propilparabeno a 2% e água deionizada q.s.p 100%. O PDTC foi incorporado ou não à formulação na concentração de 0,5%.

As fases aquosa (água) e oleosa (Polawax[®] e triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico) foram aquecidas até atingir 70°C, posteriormente verteu-se a fase aquosa na fase oleosa com agitação constante em agitador mecânico (Fisatom) até resfriamento a temperatura ambiente, então adicionou a solução etanólica de metil e propilparabenos. Após 24 h, em geral, foi solubilizado o PDTC em propilenoglicol e adicionou-se a formulação aos poucos até

completa homogeneização, para a formulação sem PDTC foi adicionado somente propilenoglicol. As formulações foram armazenadas a 4°C.

3.2.2.7 Protocolo experimental para administração tópica de PDTC

Os animais foram alocados aleatoriamente em quatro grupos (n=5). Sendo:

- Grupo 1 = não irradiados e não tratados;
- Grupo 2 = irradiados e não tratados;
- Grupo 3 = irradiados e tratados com formulação sem PDTC;
- Grupo 4 = irradiados e tratados com formulação com PDTC;

As formulações foram aplicadas em todo o dorso dos animais com o auxílio de um pincel, cerca de 0,5 g, 12 h, 6 h, 5 min antes da irradiação e 6 h após o início da irradiação. A dose de irradiação utilizada para indução do estresse oxidativo foi de 4,14 J/cm² (SHINDO; WITT; PACKER, 1993; CASAGRANDE et al., 2006). Após 12 h do término da irradiação os animais foram eutanasiados por anestesia terminal com éter etílico, a pele do dorso foi retirada, limpa, lavada com NaCl 145 mM e armazenada a -70°C para as análises subsequentes. Os testes edema cutâneo, FRAP e ABTS foram realizados no mesmo dia da coleta.

3.2.2.8 Avaliação da eficácia anti-inflamatória *in vivo* do PDTC através do ensaio de edema cutâneo, MPO, MMP-9 e dosagem de citocina pró-inflamatória (IL-1 β)

3.2.2.8.1 Avaliação do edema cutâneo

A radiação UV caus inflamação na pele, sendo esta consequência do infiltrado de células inflamatórias, alterações no fluxo sanguíneo, bem como aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos. Este último evento causa o extravasamento de proteínas e fluidos da corrente sanguínea para o interstício, o que resulta entre outras coisas em edema cutâneo (ATHAR et al., 2004).

Com o auxílio de um molde foi coletada uma área constante de pele do dorso de cada animal, que posteriormente foi pesada (AFAQ; ADHAMI; AHMAD, 2003; BATHIA et al., 2011). O efeito do PDTC no edema induzido por radiação UVB foi mensurado por meio do

aumento da espessura da pele na região dorsal. A análise se deu pela diferença de peso entre os diferentes grupos. O resultado foi expresso em mg de pele.

3.2.2.8.2 Ensaio de MPO

A migração de neutrófilo para a pele induzida por radiação UVB foi determinada através da dosagem de MPO (BRADLEY et al., 1982, CASAGRANDE et al., 2006), uma enzima oxidorrredutora do peróxido de hidrogênio encontrada em grânulos de leucócitos.

As amostras de pele foram coletadas em 400 μ L de tampão fosfato 0,05 M (pH 6.0) com 0,5% de HTAB e trituradas com o triturador Tissue-Tearor (Biospec). O homogenato foi centrifugado (Rotina 46 R, Hettich Zentrifugen) a 16.100 g por 2 min a 4°C e o sobrenadante foi retirado para o ensaio.

Em microplaca preparou-se uma curva analítica com neutrófilos na concentração de 97,65 a 100.000 que foi utilizada para inferir o número de neutrófilos presentes nas amostras. A curva foi preparada com a adição de 100 μ L de tampão fosfato 0,05M e uma solução contendo 200.000 neutrófilos no primeiro poço (A1) com posterior diluição seriada até o décimo primeiro poço (A11). O décimo segundo poço (A12) foi utilizado como branco ao qual foi adicionado apenas 200 μ L de água deionizada.

O ensaio com as amostras foi realizado na mesma placa com a adição de 30 μ L da amostra. A reação colorimétrica inicia-se pela adição em todos os poços de 200 μ L de uma solução contendo 10% de tampão fosfato 0,05 M (pH 6.0), 0,0167% de *o*-dianisidina e 0,05% de H₂O₂ em água deionizada. A leitura deve ser realizada em até 5 minutos em 450 nm (Asys Expert Plus, Biochrom). Os resultados foram expressos em número de neutrófilos/mg de pele.

3.2.2.8.3 Avaliação da inibição de secreção/atividade da MMP-9

Para determinação de MMP-9 com atividade gelatinase foi utilizada zimografia em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

As amostras de pele foram diluídas (1:4) e trituradas (T18 basic, IKA) em tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7.4) contendo cloreto de cálcio (CaCl₂) 10 mM e 1% de inibidores de proteinases (fenantrolina, fluoreto de fenilmetilsulfonila e N-etilmaleimida). O homogenato foi duplamente centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4°C. Alíquota de 50 μ L do sobrenadante foi coletada e diluída em 10 μ L de tampão Tris/HCl (pH 6.8) contendo 20% de glicerol, 4%

de duodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,005% de xileno cianol. Para aplicação no gel de eletroforese foi utilizado 25 μL desta mistura. Também foi realizada a dosagem de proteínas das amostras pelo método de Lowry.

A espessura do gel utilizado foi de 1 mm e era composto por um gel de concentração (3 cm) e o gel de separação.

O gel de concentração foi preparado contendo:

- Água deionizada	4.060 μL
- Acrilamida / bisacrilamida (30:0,8)	860 μL
- Tampão Tris HCl/SDS (pH 6.8)	1.670 μL
- APS (Persulfato de amônio) 10%	33 μL
- Temed	6.6 μL

O gel de separação foi preparado contendo:

- Água deionizada	5.870 μL
- Acrilamida / bisacrilamida (30:0,8)	5.000 μL
- Tampão Tris HCl/SDS (pH 8.8)	3.750 μL
- Gelatina 10%	375 μL
- APS (Persulfato de amônio) 10%	50 μL
- Temed	10 μL

O gel foi submetido a uma pré-corrida de 10 mA por 15 min. Durante a eletroforese a corrente aplicada foi de 10 mA para o gel de largada e 13 mA para o gel de corrida, sendo que a última corrente foi mantida constante por 15 min após a saída do corante do gel.

Após a eletroforese o gel de poliácridamida foi lavado por 1 h com solução de triton X-100 2,5% sob constante agitação, posteriormente o gel foi incubado por 12 h a 37°C em tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7.4) CaCl_2 10 mM e 0,02% de azida sódica.

Ao final da incubação o gel foi corado com uma solução contendo 0,25% de azul brilhante, 10% de ácido acético e 50% de metanol em água deionizada. Para visualização das bandas o gel foi descorado com ácido acético 20% (Fonseca et al., 2010). A atividade proteolítica foi analisada semi-quantitativamente por meio da comparação entre as bandas dos diferentes grupos pelo programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

3.2.2.8.4 Avaliação da produção de IL-1 β

A quantificação da citocina IL-1 β foi realizada utilizando-se a técnica de enzima imunoensaio (ELISA) com kits comerciais (eBioscience) conforme descrito previamente por Verri et al. (2008).

As amostras de pele foram trituradas com o triturador Tissue-Tearor (Biospec) em 500 μ L de solução NaCl 0,9%, centrifugadas a 2.000 g (Rotina 46 R, Hettich Zentrifugen) por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi retirado para análise.

Para a realização do ensaio, microplacas com 96 poços foram incubadas por toda à noite a 4°C com anticorpos de captura contra as proteínas de interesse (10 μ g/mL). Após esse tempo de incubação, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20) e incubadas por 1 h à temperatura ambiente com uma solução a 1% de albumina bovina. Após esse bloqueio e lavagem das placas com tampão de lavagem, a curva padrão e as amostras foram adicionadas (100 μ L) e incubadas a 4°C por 12 h. Posteriormente, as placas foram lavadas com tampão de lavagem e os anticorpos policlonais biotinizados (anticorpo de detecção) foram adicionados (100 μ L). Após incubação em temperatura ambiente por 1 h, as placas foram lavadas com tampão de lavagem e 100 μ L de enzima avidina-peroxidase foram adicionados. As placas foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente, lavadas, e adicionado 100 μ L de reagente contendo 0,04% de ortofenilenodiamina (OPD), 0,04% de H₂O₂ em tampão fosfato, a placa foi mantida no escuro em temperatura ambiente por 15 min. A reação enzimática foi interrompida com uma solução de H₃PO₄ 1 M e as absorvâncias determinadas em 450 nm (Victor X3, Perkin Elmer).

A curva padrão foi utilizada para inferir o número de citocina presente na amostra e os resultados foram expressos em picogramas (pg) de citocina/mg de pele (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995; VERRI et al., 2008).

3.2.2.9 Avaliação da eficácia *in vivo* do PDTC na proteção da capacidade antioxidante da pele

3.2.2.9.1 Dosagem do antioxidante endógeno GSH

O GSH é um dos principais antioxidantes endógenos sendo seus níveis diminuídos pela exposição da pele a radiação UV (FUCHS, 1998). O método baseia-se na detecção do

ácido 5-mercapto-2-nitrobenzóico, um composto amarelo, liberado pela quebra da ligação dissulfeto do ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) pelo grupo sulfidril da glutationa (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008).

As amostras de pele foram diluídas (1:4) em EDTA 0,02 M e trituradas (Tissue-Tearor, Biospec). Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 50% na proporção de 1:0,2 de EDTA e TCA, respectivamente. A mistura foi centrifugada a 2.700 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi recentrifugado a 2.700 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante final foi retirado para análise.

O ensaio para quantificação dos níveis de GSH na pele foi realizado em microplaca por meio da adição de 50 µL de amostra ao meio reacional contendo 100 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 5 µL de uma solução de DTNB em metanol (1,9 mg/mL de metanol). A absorvância foi determinada após 5 min de incubação a 420 nm (Asys Expert Plus, Biochrom). A curva analítica foi preparada com 0 a 150 µM de GSH. Os resultados foram expressos em µM de GSH/mg de pele (MORON; DEPIERRE; MANNERVIK, 1979; SRINIVASAN; SABITHA; SHYAMALADEV, 2007).

3.2.2.9.2 Ensaio FRAP

O método FRAP foi realizado para avaliar o poder antioxidante de redução férrico da pele. As amostras de pele foram homogeneizadas em 500 µL de KCl (1,15%) com um triturador (Tissue-Tearor, Biospec) e centrifugadas a 1.000 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi retirado para a análise. Para a reação foram utilizados 30 µL do sobrenadante e 1 mL de reagente FRAP. O reagente de FRAP foi preparado adicionando 2,5 mL de uma solução 10 mM de 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ) em HCl 40 mM a 2,5 mL de FeCl₃.6H₂O e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH 3.6). A solução foi incubada a 37°C por 30 min antes do uso.

A reação foi incubada por 30 min a 37°C e posteriormente foi realizada a leitura em 595 nm (Thermo Spectronic). Soluções padrão com diferentes concentrações de trolox (0,5 a 20 µM) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como µM equivalente de Trolox/mg de pele (KATALINIC et al., 2005).

3.2.2.9.3 Ensaio ABTS

O ensaio é baseado na diminuição da absorvância devido ao sequestro do radical ABTS. As amostras de pele foram homogeneizadas em 500 μL de KCl (1.15%) com um triturador (Tissue-Tearor, Biospec) e centrifugadas a 1.000 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi retirado para a análise. Para a reação foi adicionado 40 μL do sobrenadante a 1 mL de solução de ABTS, preparada conforme item 3.2.1.2.

A reação foi incubada por 6 min e posteriormente foi realizada a leitura em 730 nm. Soluções padrão com diferentes concentrações de trolox (1 a 25 μM) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como μM equivalente de Trolox/mg de pele (KATALINIC et al., 2005).

3.3 Análise estatística

As concentrações de PDTC *in vitro* que inibem o processo oxidativo em 50% (IC_{50}) foram estimadas por meio de uma curva hiperbólica. Nos testes *in vivo* os dados foram analisados pelo teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores correspondentes a $p < 0,05$. Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism[®], versão 3.02.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin oxidative stress and inflammation in hairless mice and showed antioxidant activity *in vitro*

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

Ana L. M. Ivan^a, Marcela Z. C. e Silva^a, Renata M. Martinez^a, Vitor S. Ferreira^a, Fabiana T. M. C. Vicentini^b, Fernanda M. P. Vilela^b, Ana C. Zarpelon^c, Maria J. V. Fonseca^b, Marcela M. Baracat^a, Sandra R. Georgetti^a, Waldiceu A. Verri Jr.^c, Rúbia Casagrande^{a*}

^aDepartment of Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, State University of Londrina - UEL, Robert Koch Avenue, 60, University Hospital, 86038-350, Londrina, PR, Brazil

^bDepartment of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - USP, Av. do Café s/n, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^cDepartment of Pathology, Biological Science Center, State University of Londrina - UEL, Celso Garcia Highway, Km 380, 86051-990, Londrina, PR, Brazil

E-mail of each author:

Ana L. M. Ivan: anLauraivan@hotmail.com

Marcela Z. C. e Silva: marcelazbm@hotmail.com

Renata M. Martinez: renatafarma_55@yahoo.com.br

Vitor S. Ferreira: vsottero@hotmail.com

Fernanda M. P. Vilela: nandajm@fcfrp.usp.br

Fabiana T. M. C. Vicentini: fabianatmcv@hotmail.com

Ana C. Zarpelon: ana.zarpelon@hotmail.com

Maria J. V. Fonseca: magika@fcfrp.usp.br

Marcela M. Baracat: baracat@uel.br

Sandra R. Georgetti: sangeorgetti@gmail.com

Waldiceu A. Verri Jr.: waldiceujr@yahoo.com.br

Rúbia Casagrande: rubiaca@uel.br

*Corresponding author:

Department of Pharmaceutical Sciences, Robert Koch Avenue, 60, University Hospital.

Av. Robert Koch, 60, 86038-350 – Londrina, PR, Brazil

Phone: +55 43 33712475

Fax: +55 43 33712475

E-mail: rubiaca@uel.br or rubiaca@yahoo.com.br

Highlights

- PDTC scavenges varied radicals and chelates iron *in vitro*.
- PDTC reduced UVB induced skin edema, myeloperoxidase activity and MMP-9.
- PDTC modulated IL-1 β levels in UVB-irradiation.
- PDTC prevented the UVB-induced depletion of reduced glutathione.
- PDTC maintained the antioxidant capacity of the skin after UVB radiation exposure.

Abbreviations

ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid)
AP-1	Activator protein-1
BPS	Bathophenanthroline
DPPH	2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GSH	Reduced glutathione
HOCl	Hypochlorous acid
HTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide
I- κ B	Inhibitory factor- κ B
MMP	Matrix metalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
\cdot OH	Hydroxyl radical
PDTC	Pyrrolidine dithiocarbamate
ROS	Reactive oxygen species
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standard error mean
TBA	Thiobarbituric acid
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-s-triazine
UV	Ultraviolet
UVB	Ultraviolet B

ABSTRACT

Exposure to ultraviolet B (UVB) radiation causes skin damage such as cancer and premature aging. These effects are mainly related to the increase of free radicals and inflammatory processes. The pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) is a synthetic antioxidant and inhibitor of the nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation. Thus, the present study evaluated an *in vitro* the antioxidant mechanisms of PDTC and *in vivo* the beneficial effects of PDTC against UVB irradiation-induced oxidative damages. PDTC was administered in hairless mice (10, 30 and 100 mg/Kg, intraperitoneal) 1 h before the irradiation and 8 h after the first treatment. For the cytokine assay it was done just one treatment 1 h before the irradiation. The *in vitro* results demonstrated that PDTC presented the ability to scavenge 2,2'-azinobis-(3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid) radical (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical (DPPH) and hydroxyl radical (\cdot OH); and also efficiently inhibited iron-dependent and -independent lipid peroxidation as well as chelated iron. *In vivo*, the treatment with PDTC led to a statistically significant decrease of skin edema, myeloperoxidase (MPO) activity, production of proinflammatory interleukin-1 β (IL-1 β), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), increase of glutathione reduced (GSH) levels and the antioxidant capacity of skin tested by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) and ABTS assay. These data demonstrates that PDTC is an antioxidant by scavenging free radicals, chelating iron and inhibiting lipid peroxidation *in vitro*. In agreement, *in vivo*, PDTC inhibits UVB-induced oxidative and inflammatory parameters in the skin. These data suggest that PDTC may be a promising drug to prevent and/or treat UVB radiation-induced skin damages; however, pre-clinical and molecular investigations are still needed for complete understanding of its protective effects.

KEYWORDS: antioxidant activity; free radicals; oxidative stress; PDTC; UVB radiation

1. Introduction

Along the whole life, skin is exposed to different exogenous environmental detrimental sources of stress. Among these sources, ultraviolet (UV) radiation is one of the most deleterious to the skin [1].

Acute exposure to ultraviolet B (UVB) radiation is responsible for inducing a number of diseases-related changes in the skin, including erythema, edema, hyperplasia, sunburn cell formation, inflammation, while chronic UVB exposure leads to premature ageing and carcinogenesis in the skin [2,3]. The reactive oxygen species (ROS) formed by exposure to UVB irradiation are presumed to play an important role in the initiation and conduction of signaling events leading to cellular response after UV irradiation, and the skin damage may also be a result of increased oxygen radicals production during the inflammatory response to UV radiation [4,5]. Exogenous supplementation of antioxidants can be an effective strategy to counteract the deleterious effects of the ROS generated from the excessive exposure to UV radiation [6]. Several studies have shown the chemopreventive effects of antioxidants agents, both naturally occurring as well as synthetic, against UV radiation-mediated damage [7,4,8].

Pyrrrolidine dithiocarbamate (PDTC) is a low-molecular weight thiol compound that has been used as an antioxidant to counteract the toxic effects of free radicals. This antioxidant potential of PDTC is attributed to its thiol group which functions by neutralizing reactive oxygen intermediates [9]. It has been widely studied due to biochemical activities, such as redox state alternation, heavy metal chelation and enzyme inhibition [10]. In fact, many studies suggest the antioxidant and therapeutic application of PDTC in diseases processes involving the production of free radicals [11,12]. Although it has been demonstrated in cell-based *in vitro* assays that PDTC inhibits the action of ROS such as anion superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical, its precise antioxidant mechanisms were not determined [13]. Importantly, this antioxidant activity of PDTC seems to be responsible for its inhibitory effect over nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation. It is likely that PDTC prevents the ROS-induced dissociation of inhibitory factor- κ B (I- κ B) from NF- κ B in the cell cytoplasm and as a result, active NF- κ B will not be translocated to the cell nucleus to exert its modulator effect on gene expression. Additionally, PDTC interferes with κ B-dependent transactivation genes [13]. As a consequence of inhibiting NF- κ B activation, PDTC reduces the production of inflammatory cytokines [13,14].

Taking into account the above mentioned, in the present study it was investigated the *in vitro* antioxidant mechanisms of PDTC and its therapeutic effects in UVB irradiation-induced photo-oxidative and -inflammatory damages to the skin of hairless mice.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Brilliant blue R, reduced glutathione (GSH), hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), linoleic acid, N-ethylmaleimide, *o*-dianisidine dihydrochloride, phenylmethanesulfonyl fluoride, thiobarbituric acid (TBA), 1,10-Phenanthroline monohydrate, 2,2'-azinobis-(3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) (TPTZ) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pyrrolidine dithiocarbamate was obtained from Alexis Corporation (Lausen, Lausen, Switzerland). 2-deoxy-D-ribose and bathophenanthroline (BPS) were purchased from Acros (Pittsburgh, PA, USA). Xylene cyanol was obtained from Amresco (Solon, OH, USA). ELISA kit for IL-1 β determination was obtained from eBioscience (San Diego, CA, USA).

2.2 Determination the *in vitro* antioxidant activity of PDTC by differents methods

2.2.1 ABTS free radical scavenging assay

The antioxidant capacity in scavenging the free radical ABTS by different concentrations of PDTC (0.08 - 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was determined by the decrease of absorbance at 730 nm (Evolution 60, Thermo Scientific) [15]. Samples were performed in triplicate and the ability of scavenging ABTS was calculated by the following equation:

Equation I: % of activity = $[1 - (\text{sample absorbance}/\text{control absorbance})] \times 100$.

2.2.2 Determination of DPPH radical scavenging activity

The antioxidant activities of different concentrations of PDTC (0.1 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were determined by its ability to donate hydrogen and stabilize the free radical DPPH. The

reduction of DPPH radical was determined by the change in absorbance measured at 517 nm (Evolution 60, Thermo Scientific) [16,17]. Samples were analyzed in triplicate. The results were expressed as by the equation I.

2.2.3 Scavenging effect on hydroxyl free radical

The hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) scavenging ability of PDTC was measured by reduction of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) from degradation of deoxyribose by $\cdot\text{OH}$ generated in Fenton reaction [20]. The scavenger ability by different concentrations of PDTC (10 - 500 $\mu\text{g/mL}$) was determined by the colorimetric method described [21]. The measurements were analyzed in triplicate. The scavenging of hydroxyl free radical was calculated by the equation I.

2.2.4 Iron-induced lipid peroxidation

Mitochondria of hairless mice were used as a source of lipid membranes to evaluate lipid peroxidation and were prepared by standard differential centrifugation techniques as demonstrated [19,22]. The ability of the different concentrations of PDTC (0.25 - 25 $\mu\text{g/mL}$) to inhibit iron-induced lipid peroxidation was evaluated by reduction of TBARS formation [23,24]. All measurements were performed in triplicate. The inhibition of iron-dependent lipoperoxidation was calculated by the equation I.

2.2.5 Iron-independent lipid peroxidation

The inhibitory activity of iron-independent lipid peroxidation by different concentrations of PDTC (0.5 - 50 $\mu\text{g/mL}$) was determined by decreasing the production of lipid hidroperoxides, a primary product of lipid peroxidation [25]. Lipid hidroperoxides were determined by method as previously described [24]. All measurements were performed in triplicate. The following equation was used:

Equation II: % activity = $1 - (\text{absA after incubation} - \text{absA without incubation}) / (\text{absC after incubation} - \text{absC without incubation}) \times 100$. absA is the absorbance of sample, and absC is the absorbance of the control.

2.2.6 Determination of iron-chelating activity using the bathophenanthroline (BPS) assay

The BPS, a strong chelator of ferrous ion, which forms a colored complex when connect to this ion. The chelation of iron ions by different concentrations of PDTC (0.5 - 500 µg/mL) was determined by colorimetric change measured at 530 and 700 nm (Evolution 60, Thermo Scientific) [18,19]. All measurements were made in triplicate. The iron chelating activity was calculated by the equation I.

2.3 Assessment of PDTC *in vivo* protective effect against UVB-induced photodamages

2.3.1 Animals and experimental protocol

In vivo experiments were performed sex matched hairless mice (HRS/J), weighing 20-30 g. The animals were housed in a temperature-controlled room, with access to water and food *ad libitum*. They were housed within cages with a 12 h light and 12 h dark cycles. All experiments were conducted in accordance with National Institutes of Health guidelines for the welfare of experimental animals and with the approval of the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Londrina (Of. Circ. CEEA N° 160/2010 in December 17, 2010, registered under the number CEEA 85/10, process n° 33631.2010.82). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. The animals were divided in to five groups (n=5): Group 1 = non-irradiated control (saline treatment), Group 2 = irradiated control (saline treatment), Group 3 = irradiated and treated with a solution containing 10 mg/Kg of PDTC, Group 4 = irradiated and treated with a solution containing 30 mg/Kg of PDTC and Group 5 = irradiated and treated with a solution containing 100 mg/Kg of PDTC. The concentrations of PDTC used in these assays were selected based on an anti-inflammatory activity study reported previously [11]. The treatment protocol consisted of applying the test solutions intraperitoneal 1 h before the irradiation and 8 h after the first dose. Only for the cytokine assay the animals were treated just 1 h before the irradiation.

2.3.2 Irradiation

The UVB source used in the experiments to induce oxidative stress was a Philips TL/12 RS 40W (Medical-Holand) emitting a continuous spectrum between 270 and 400 nm with a peak emission at 313 nm. The lamp was mounted 20 cm above the place where the

mice were placed on, resulting in an irradiation of 0.384 mW/cm^2 as measured by an IL 1700 radiometer (Newburyport, MA, USA) equipped with sensor for UV (SED005) and UVB (SED240). The irradiation dose used for induction of oxidative stress was 4.14 J/cm^2 [4,26]. The animals were decapitated 2 h after the end of irradiation to cytokines assay and euthanized with terminal anesthetized of ethyl ether 12 h after to all others tests, dorsal skins were removed, divided to different tests and stored at -70°C until analysis. The samples collected for verification of cutaneous edema were heavy when removed and were not frozen. The ferric reducing antioxidant power (FRAP) and ABTS assay were performed on the same day of sample collection.

2.3.3 Skin edema

The effect of PDTC on UVB-induced skin edema was measured as an increase in the dorsal skin weight. After dorsal skin removal, a constant area (6 mm diameter) was delimited with the aid of a mold, followed by weighing of this constant area [2,27]. The analysis was obtained by comparing the weight of the skin between groups and the result was express in mg of skin.

2.3.4 Myeloperoxidase (MPO) activity

The UVB-induced leukocyte migration to the skin of hairless mice was evaluated using the MPO colorimetric assay [4]. The samples of skin were homogenized in K_2HPO_4 buffer 0.05 M (pH 6.0) containing 0.5% HTAB using a Tissue-Tearor (Biospec). The homogenates were centrifuged at 16.100 g for 2 min at 4°C . The supernatant was removed to assay. Briefly, $30 \mu\text{L}$ of sample was mixed with $200 \mu\text{L}$ of 0.05 M K_2HPO_4 buffer (pH 6.0), containing 0.0167% *o*-dianisidine dihydrochloride and 0.05% hydrogen peroxide. The absorbance was determined in 5 min at 450 nm (Asys Expert Plus, Biochrom). The MPO activity of samples was compared to a standard curve of neutrophils. The results are presented as MPO activity (number of total leukocytes per mg of skin).

2.3.5 Cytokine measurement

The samples of skin were homogenized in $500 \mu\text{L}$ of saline using a Tissue-Tearor (Biospec) and centrifuged at 2.000 g for 15 min at 4°C , the supernatant was used to measured

the cytokine. IL-1 β level was determined as described previously [28] using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to manufacture's instructions (eBioscience). The results are expressed as picograms (pg) of IL-1 per mg of skin.

2.3.6 Analyses of skin proteinase substrate-embedded enzymography

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) substrate-embedded enzymography was used to detect enzymes with gelatinase activity. Assays were carried out as previously described [8]. The total skin of hairless mice (1:4, w/w dilution) were homogenized (T 18 basic, IKA) in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.01 M CaCl₂ and 1% protease inhibitor cocktail. Whole homogenates were centrifuged at 12.000 g for 10 min at 4°C twice. The Lowry method was used to measure protein levels in skin homogenates (Lowry et al., 1951). 50 μ L of samples were mixed with 10 μ L of 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) containing 20% glycerol, 4% SDS and 0.005% xylene cyanol. For electrophoresis, 25 μ L of the mixture was used. SDS-PAGE was performed using 10% acrylamide gels containing 0.25% gelatin. After electrophoresis, the gels were incubated for 1 h with 2.5% Triton X-100 under constant shaking, incubated overnight in 0.05 M Tris-HCl (pH 7,4), 0.01 M CaCl₂ and 0.02% sodium azide at 37°C, and stained the following day with brilliant blue R. After destaining in 20% acetic acid, zone of enzyme activity were analyzed by comparing the groups in the ImageJ Program (NIH, Bethesda, MD, USA).

2.3.7 GSH assay

GSH was determined as previously described [29] with a minor modification. Briefly, skin of hairless mice (1:4, w/w dilution) were homogenized in 0.02 M EDTA using a Tissue-Tearor (Biospec). Whole homogenate was treated with 50% trichloroacetic acid and were centrifuged twice at 2.700 g for 10 min at 4°C. The reaction mixture contained 50 μ L of sample, 100 μ L of 0.4 M Tris and 5 μ L DTNB (1,9 mg/mL in methanol). The colour developed was read at 420 nm (Asys Expert Plus, Biochrom). The standard curve was prepared with GSH 0-150 μ M. The results are presented as μ M of GSH per mg of skin.

2.3.8 FRAP assay

The reducing ability of skin sample was determined by FRAP assay [30]. The samples of skin were homogenized in 500 μ L of KCl (1.15%) using a Tissue-Tearor (Biospec) and centrifuged at 1.000 g for 10 min at 4°C, the supernatant was employed for measurement the antioxidant capacity of skin. The reaction consists to add the supernatant to the FRAP reagent prepared with 0.3 mM acetate buffer pH 3.6, 10 mM TPTZ in 40 mM hydrochlorid acid and 20 mM ferric chloride. The FRAP reagent was warmed to 37°C for 30 min. The absorbance was determined in 595 nm (Helios Alfa, Thermo Spectronic). Previously, a curve of trolox (0.5-20 μ M) was prepared and the results are presented as μ Mol trolox equivalent per mg of skin.

2.3.9 ABTS assay

This assay is based on the inhibition of the absorbance of the radical ABTS. Skin of hairless mice was homogenized in 500 μ L of KCl (1.15%) using a Tissue-Tearor (Biospec) and centrifuged at 1.000 g for 10 min at 4°C, the supernatant was employed for measurement the antioxidant capacity of skin. The solution of ABTS was prepared with 7 mM of ABTS and 2.45 mM of potassium persulfate diluted with phosphate buffer pH 7.4 to an absorbance of 0.7-0.8 in 730 nm was prepared. The supernatant was mixed on ABTS solution and after 6 min the absorbance was determined in 730 nm (Helios Alfa, Thermo Spectronic) [30]. Previously, a curve of trolox (1-25 μ M) was prepared and the results are presented as μ M trolox equivalent per mg of skin.

2.4 Statistical analysis

In vitro data were expressed as means \pm SEM (standard error mean) determined of triplicate analysis. The concentration of PDTC necessary to inhibit the oxidative process in 50% (IC₅₀) was determined by GraphPad Prism[®] software, version 3.02, using hyperbolic curve (one site binding and two site binding hyperbole). *In vivo* results are presented as means \pm SEM of measurements made. The differences between treatments were evaluated by one-way ANOVA followed by Bonferroni's t test. Statistical differences were considered to be significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of PDTC

The antioxidant activity of PDTC was evaluated by its ability to scavenging the ABTS, DPPH and $\cdot\text{OH}$ radicals, the latter being generated by the Fenton reaction and responsible for the degradation of deoxyribose. The results showed that scavenge of these radicals were concentration-dependently. The ABTS assay showed IC_{50} of 0.74 $\mu\text{g/mL}$ with maximum activity (approximately 98%) in 2.0 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 1A). The IC_{50} for the DPPH assay was 5.14 $\mu\text{g/mL}$. The highest H-donor capability was achieved with 10 $\mu\text{g/mL}$ of PDTC (approximately 90% of DPPH reduced), and after this concentration a plateau effect was observed (Fig. 1B). The IC_{50} to scavenging of $\cdot\text{OH}$ radical was 66.53 $\mu\text{g/mL}$ with maximum (approximately 93%) in 500 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 1C). Control quercetin, a flavonoid with known antioxidant activity, exhibited IC_{50} of 0.82 $\mu\text{g/mL}$, 1.17 $\mu\text{g/mL}$ and 0.07 $\mu\text{g/mL}$ to ABTS, DPPH and deoxyribose tests, respectively.

PDTC also concentration-dependently inhibited *in vitro* the iron-dependent lipid peroxidation (Fig. 2A), iron-independent lipid peroxidation (Fig. 2B) and chelated iron (Fig. 2C), with IC_{50} of 1.08 $\mu\text{g/mL}$ with maximum activity at 25 $\mu\text{g/mL}$ (approximately 97%), 3.77 $\mu\text{g/mL}$ with maximum activity at 25 $\mu\text{g/mL}$ (approximately 95%), and 35.32 $\mu\text{g/mL}$ with maximum activity at 250 $\mu\text{g/mL}$ (approximately 97%), respectively. Quercetin control exhibited 0.34 $\mu\text{g/mL}$, 0.51 $\mu\text{g/mL}$, and 4 $\mu\text{g/mL}$ of IC_{50} , in iron-dependent peroxidation, iron-independent lipid peroxidation and iron chelation assays, respectively.

3.2 *In vivo* assessment of the protective effect of PDTC against UVB-induced oxidative stress and inflammation

3.2.1 Skin edema

Skin edema increased significantly after UVB irradiation, compared to unexposed mice. The increase was significantly inhibited by doses of 10, 30 and 100 mg/Kg of PCTC, compared with the irradiated control. However, there was no statistical difference between these doses (Fig. 3).

3.2.2 MPO activity

The effect of PDTC on UVB-induced inflammatory response was observed at three different doses. We have found that UVB irradiation results in elevated MPO activity in comparison with the non-irradiated group. The treatment with PDTC in three different doses showed significant inhibition of MPO activity. However, there was no significant difference between the doses. The treatment did not inhibited MPO activity in a dose dependly manner (Fig. 4).

3.2.3 Cytokine measurement

The inflammatory cytokine, IL-1 β play very important roles in UV irradiation-induced inflammation and skin damage [14,31]. There was a significant increase of IL-1 β production in the skin of irradiated mice comparing to non-irradiated control. On the other hand, the treatment with PDTC in three different doses significantly reduced the levels of IL-1 β (Fig. 5) after the irradiation.

3.2.4 Analyses of MMP-9 in the skin by substrate-embedded enzymography

In agreement with other study [4], a significant increase in the secretion/activity of gelatinases in the skin of hairless mice was observed after UVB irradiation in this study. It was observed by SDS–PAGE zymography that UVB irradiation induced a significant increase of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity which was inhibited by the dose of 100 mg/Kg and unaffected by the doses 10 and 30 mg/Kg (Fig. 6). The control dosage of total proteins in the skin confirmed no significant statistical difference among the samples (data not shown).

3.2.5 GSH assay

The dose of UVB irradiation used in the experiment was able to significantly reduce the endogenous antioxidant GSH in the irradiated group control when compared with the non-irradiated control. Only in the group treated with the dose of 100 mg/kg of PDTC the GSH activity returned to non-irradiated control levels (Fig. 7).

3.2.6 FRAP and ABTS assay

After UVB irradiation the antioxidant capacity of skin measured by FRAP and ABTS assays reduced significantly compared with non-irradiated control. In both assays, the treatment with 100 mg/kg of PDTC was able to increase the antioxidant capacity of irradiated skin (Fig. 8 and Fig. 9).

4. Discussion

Exposure to solar UV radiation has serious effects on the structure and function of human and mouse skin [32]. Skin exposure to UVB irradiation has been shown to produce excessive generation of ROS [7] such as the superoxide anion, hydroxyl radical and the peroxy radical [33], which if overwhelming the endogenous antioxidant defense creates a deleterious oxidative stress condition in the skin. This oxidative stress is shown to be responsible for a variety of inflammation- and oxidative-stress related diseases such as aging and skin cancer [7].

The ROS produced in the skin after the UVB radiation exposure modulate transcription factors such as NF- κ B, an oxidant-sensitive transcriptional factor, which plays a crucial role on activates multiple target genes involved in the expression of several proinflammatory molecules such as cytokines [4,12,14]. UVB irradiation stimulated the inflammatory response, causing erythema, edema and recruitment of inflammatory cells such as neutrophils and lymphocytes [34]. Therefore, the treatment with antioxidant agents is often regarded as a conceivable strategy for the management of these oxidative stress and inflammation conditions.

PDTC is a potent antioxidant [10,11] and this activity explains, at least in part, its *in vivo* anti-inflammatory effect. A series of the *in vitro* experiments were performed in an attempt to evaluate the antioxidant activity of PDTC in order to show the ability of this drug in scavenge different radicals in different systems. The present data demonstrates that PDTC inhibited *in vitro* oxidative stress by acting as a scavenger of ABTS, DPPH and \cdot OH free radicals. Based on the found IC₅₀ value it can be concluded that the highest antioxidant activity of PDTC is to donate electrons to ABTS synthetic radical (IC₅₀ 0.74 μ g/mL) followed by DPPH (IC₅₀ 5.14 μ g/mL), and to scavenge \cdot OH (IC₅₀ 66.53 μ g/mL).

The antioxidants can modulate lipid peroxidation at varied levels [35], such as scavenging initiation, propagation and termination radicals, chelating metallic ions

suppressing Fenton reaction by complexing with iron and inhibiting enzymatic systems responsible for free radicals production. PDTC inhibited efficiently iron-dependent lipid peroxidation by scavenging peroxy and alkoxy radicals (IC_{50} 1.08 $\mu\text{g/mL}$) and chelating iron (IC_{50} 35.32 $\mu\text{g/mL}$) that involves propagation and termination events of lipid peroxidation. At less extend, it also inhibited iron-independent lipid peroxidation as observed in the linoleic acid peroxidation (IC_{50} 3.77 $\mu\text{g/mL}$), which involves initial products of lipid peroxidation such as hydroperoxide lipids formation [24].

In agreement with the *in vitro* mechanisms demonstrated herein, PDTC was about 2-3 times more potent than GSH and *N*-acetylcysteine in scavenging the hypochlorous acid (HOCl) radical and inhibition of protein oxidative damage [36].

Skin edema is regarded as a marker of UV-induced inflammation [7]. Corroborating the anti-inflammatory effect of PDTC, it reduced UV-induced skin edema. In agreement with the present data, PDTC also inhibited the intestinal edema induced by ischemia/reperfusion, which is a model of disease involving free radical mediated inflammation [37]. Furthermore, UV radiation induced leukocyte recruitment [38]. The leukocytes recruited to the UV irradiated loci have a tight relationship with oxidative stress since they are responsible for an additional production of superoxide anion by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH oxidase), which explains in part the excessive generation of ROS by UVB exposure [7]. Corroborating, NADPH oxidase products are essential to maintain the directionality of neutrophils during chemotaxis [39]. The MPO activity is commonly used as a measure of total infiltrating neutrophil content found in inflamed UVB-irradiated skin [4,38], and treatment with PDTC significantly reduced UVB-induced infiltration of leukocytes into the skin of mice. In agreement, PDTC reduced the MPO activity in superior mesenteric ischemia/reperfusion model [37] and acute inflammatory carrageenan-induced pleurisy [11].

UV irradiation leads to activation of one major signaling pathways, NF- κ B [14]. Numerous binding sequences of NF- κ B on various genes with important immunologic functions characterize this transcription factor as a pluripotent factor in the inflammatory response [11]. Many antioxidative agents can suppress NF- κ B activation, including *N*-acetylcysteine, vitamin E, dithiocarbamates and heavy metal chelators [40]. Activation of NF- κ B pathway by UV irradiation stimulates inflammatory cytokine expressions that contribute to UV irradiation-induced skin inflammation [14]. In fact, cytokines contribute to the propagation of the extension of a local or systemic inflammatory process [11]. Cytokines are also important mediators in inflammation responsible for leukocyte recruitment [22,41,42]. Therefore, the inhibition of IL-1 β production by PDTC is consistent with it's the inhibition of

MPO activity by PDTC. Furthermore, it has been shown that PDTC inhibits at low and in a concentration-dependent way the activation of NF- κ B [13,40,43], therefore, it is likely that the inhibition of IL-1 β production by PDTC might be related to the inhibition of NF- κ B activation by PDTC.

The inhibitory effect of PDTC on NF- κ B had previously been attributed to its antioxidant properties [13]. However, findings suggest that the inhibitory action of PDTC on the activity of NF- κ B is related to its ability to translocate extracellular Zn²⁺ to certain intracellular sites [12,44]. In endothelial cells, elevation of the intracellular Zn²⁺ level by pyrithione, a zinc ionophore, inhibited NF- κ B activation [40,45]. This can be an additional mechanism of action of PDTC over NF- κ B, unrelated to its antioxidant and metal chelating activities [40].

MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) are known to be overexpressed in UV irradiated skin tissues and contribute to the acceleration of photoaging and the development of skin cancer [46]. UV radiation has been shown to induce activation of activator protein-1 (AP-1) and NF- κ B transcription factors and thereby the transcription of downstream targets such as MMPs [47]. ROS and cytokines regulate the expression of MMPs [47], including MMP-9 by a NF- κ B-dependent mechanism [48]. Herein, it was observed that PDTC reduced UV irradiation-induced secretion/activity of MMP-9. Corroborating the present data, PDTC down-regulates vascular MMPs and ameliorates vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertension [47]. Moreover, the pretreatment of endometriotic ectopic stromal cells with PDTC attenuated IL-1 β induced expressions of MMP-2 and MMP-9 [49]. Thus, the present inhibition by PDTC of UV-induced IL-1 β production might have contributed to the inhibition of UV-induced secretion/activity of MMP-9. Furthermore, MMP-2 and MMP-9 activities in spontaneously hypertensive rat plasma were significantly reduced (41%) by PDTC treatment, zymographic analyses and in situ zymography showed decreased MMP-2 activity in kidney homogenates and decreased MMP-1 and MMP-9 activities in brain. This evidence is in line with the fact that blockade of NF- κ B almost completely inhibited the expression of MMP-9, and with the presence of NF- κ B binding sites in the promoter region of MMP-9 [50].

Ultraviolet radiation produces ROS, directly and via the inflammatory response, causing the depletion of the cellular antioxidant defense system and an increase in oxidative damage [51]. The cells are normally equipped with protective cell defense mechanisms, which include superoxide dismutase, catalase, and GSH. The balance between prooxidant production and antioxidant defense is pivotal for a correct cell function, whereas a disturbance

in this balance in favor of the oxidants represents an oxidative stress [52]. Several reports indicate that, tissue injury induced by UV-irradiation result in GSH depletion [4].

PDTC functions as an antioxidant due to two structural features: direct scavenging of ROS by the dithiocarboxy group, and chelating activity for heavy metal ions that may catalyze formation of ROS [40]. In addition, PDTC influences intracellular thiol levels [53], interfere with reactive oxygen metabolism [54], and increase activity of γ -glutamylcysteine synthetase in bovine aortic endothelial cells *in vitro* [55]. In this sense, the treatment with PDTC reduced UV irradiation-induced GSH depletion (present data), and improve the antioxidant capacity demonstrated by FRAP and ABTS assay. ABTS assay has been found to correlate well with levels of endogenous glutathione, while FRAP assay accurately reflected plasma levels of ascorbic acid, uric acid and α -tocopherol [30]. In agreement, it has been demonstrated that treatment with PDTC also prevents the reduction of GSH concentration in acute hepatic injury in rats induced by LPS [52].

Although the mechanisms of action of PDTC are not completely known, they include antioxidant properties [13] and inhibition of NF- κ B [11]. Our study demonstrated *in vitro* that the PDTC inhibits the oxidative stress by scavenging free radicals, iron chelating activity and inhibition of iron-dependent and iron-independent lipoperoxidation. *In vivo*, PDTC protected against the damage caused by UVB exposure and prevented the increase of skin edema, MPO activity, level of proinflammatory cytokine IL-1 β , MMP-9 secretion/activity, the GSH depletion and antioxidant capacity of skin. Thus, these data suggest the possible usefulness of PDTC as photochemopreventive agent to prevent the deleterious inflammatory and oxidative effects of UV irradiation of the skin.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Araucária. We thank the technical assistance of Denise Duarte from Post-graduation Laboratory of UEL.

References

- [1] M. Meloni, J.F. Nicolay, Dynamic monitoring of glutathione redox status in UV-B irradiated reconstituted epidermis effect of antioxidant activity on skin homeostasis, *Toxicol. in Vitro* 17 (2003) 609-613.
- [2] F. Afaq, V.M. Adhami, H. Mukhtar, Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis, *Mutat. Res.* 571 (2005) 153-173.
- [3] J.K. Kundu, K.-S. Choi, H. Fujii, B. Sun, Y.-J. Surh, Oligonol, a lychee fruit-derived low molecular weight polyphenol formulation, inhibits UVB-induced cyclooxygenase-2 expression, and induces NAD(P)H:quinine oxidoreductase-1 expression in hairless mouse skin, *J. Funct Foods* 1 (2009) 98-108.
- [4] R. Casagrande, S.R. Georgetti, W.A. Verri Jr, D.J. Dorta, A.C. Santos, M.J.V. Fonseca, Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 84 (2006) 21-27.
- [5] L. Rittié, G.J. Fisher, UV-light-induced signal cascades and skin aging, *Ageing Res. Rev.* 1 (2002) 705-720.
- [6] N. Ahmad, H. Mukhtar, Cutaneous photochemoprevention by green tea: a brief review *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 14 (2001) 69-76.
- [7] F. Afaq, V.M. Adhami, N. Ahmad, Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 186 (2003) 28-37.
- [8] Y.M. Fonseca, C.D. Catini, F.T.M.C. Vicentini, A. Nomizo, R.F. Gerlach, M.J.V. Fonseca, Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion, *J. Ethnopharmacol.* 127 (2010) 596-601.
- [9] G. Cheng, S.N. Whitehead, V. Hachinski, D.F. Cechetto, Effects of pyrrolidine dithiocarbamate on beta-amyloid (25-35)-induced inflammatory responses and memory deficits in the rats, *Neurobiol. Dis.* 23 (2006) 140-151.
- [10] X. Chang, C. Shao, Q. Wu, Q. Wu, M. Huang, Z. Zhou, Pyrrolidine Dithiocarbamate Attenuates Paraquat-Induced Lung Injury in Rats, *J. Biomed. Biotechnol.* (2009) Article ID 619487, 8 pages doi:10.1155/2009/619487.
- [11] S. Cuzzocrea, P.K. Chatterjee, E. Mazzon, L. Dugo, I. Serraino, D. Britti, G. MAzzullo, A.P. Caputi, C. Thiemermann, Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation, *Br. J. Pharmacol.* 135 (2002) 496-510.
- [12] C.-H. Lee, S.-H. Kim, S.-M. Lee, Effect of pyrrolidine dithiocarbamate on hepatic vascular stress gene expression during ischemia and reperfusion, *Eur. J. Pharmacol.* 595 (2008) 100-107.

- [13] R. Schreck, B. Meier, D.N. Mannel, W. Droge, P.A. Baeuerle, Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor κ B activation in intact cells, *J. Exp. Med.* 175 (1992) 1181-1194.
- [14] F.T.M.C. Vicentini, T. He, Y. Shao, M.J.V. Fonseca, W.A. Verri Jr, G.J. Fisher, J. Xu, Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- κ B pathway, *J. Dermatol. Sci.* 61 (2011) 162-168.
- [15] I. Sánchez-Gonzalez, A. Jiménez-Escrig, F. Saura-Calixto, *In vitro* antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (italian, espresso and filter), *Food Chem.* 90 (2005) 133-139.
- [16] M.S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* 181 (1958) 1199-1200.
- [17] R. Casagrande, S.R. Georgetti, W.A. Verri Jr, M.F. Borin, R.F.V. Lopez, M.J.V. Fonseca, *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity, *Int. J. Pharm.* 328 (2007) 183-190.
- [18] B.J. Bolanm, R.J. Ulvik, Release of iron from ferritin by xanthine oxidase. Role of the superoxide radical, *J. Biochem.* 243 (1986) 55-59.
- [19] R. Casagrande, S.R. Georgetti, W.A. Verri Jr, J.R. Jabor, A.C. Santos, M.J.V. Fonseca, Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 7, article 10 (<http://aapspharmscitech.org>) (2006).
- [20] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, O.I. Aruoma, The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals, *Anal. Biochem.* 165 (1987) 215-219.
- [21] S.R. Georgetti, R. Casagrande, F.M.T.C. Vicentini, W.A. Verri Jr, M.F.V. Fonseca, Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different *in vitro* methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations, *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.* 64 (2006) 99-106.
- [22] K. Cain, D.N. Skilleter, Preparation and use of mitochondria in toxicological research, *J. Biochem. Toxicol.* (1987) 217-254.
- [23] A. Buege, S.D. Aust, Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol.* 52 (1978) 302-310.
- [24] R.M. Martinez, A.C. Zarpelon, V.V.M. Zimmermann, S.R. Georgetti, M.M. Baracat, M.J.V. Fonseca, F.T.M.C. Vicentini, I.C. Moreira, C.C. Andrei, W.A. Verri Jr, R. Casagrande, *Tephrosia sinapou* extract reduces inflammatory leukocyte recruitment in mice: effect on oxidative stress, nitric oxide and cytokine production, *Braz. J. Pharmacog.* 22(3) (2012) 587-597.
- [25] H. Lingnert, K. Valentin, C.E. Erickson, Measurement of antioxidative effect in model system, *J. Food Process. Pres.* 3 (1979) 87-104.

- [26] Y. Shindo, E. Witt, L. Packer, Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light, *J. Invest. Dermatol.* 100 (1993) 260-265.
- [27] N. Bathia, T.A. Demmer, A.K. Sharma, I. Elcheva, V.S. Spiegelman, Role of β -TrCP ubiquitin ligase receptor in UVB mediated responses in skin, *Arch. Biochem. Biophys.* 508 (2011) 178-184.
- [28] W.A. Verri Jr, A.T. Guerrero, S.Y. Fukada, D.A. Valerio, T.M. Cunha, D. Xu, S.H. Ferreira, F.Y. Liew, F.Q. Cunha, IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice, *P. Nat. Acad. Sci.* 105 (2008) 2723-2728.
- [29] M.S. Moron, J.W. Depierre, B. Mannervik, Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione s-transferase activities in rat lung and liver, *Biochim. Biophys. Acta.* 582, (1979) 67-78.
- [30] V. Katalinic, D. Modun, I. Music, M. Boban, Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2V-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays, *Comp. Biochem. Physiol. C*, 140 (2005) 47-52.
- [31] A. Grandjean-Laquerriere, S.C. Gangloff, R.L. Neour, C. Trentesaux, W. Hornebeck, M. Guenounou, Relative contribution of NF- κ B and AP-1 in the modulation by curcumin and pyrrolidine dithiocarbamate of the UVB-induced cytokine expression by Keratinocytes, *Cytokine* 18 (2002) 168-177.
- [32] Y. Kimura, M. Sumiyoshi, Effects of baicalein and wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis* roots on skin damage in acute UVB-irradiated hairless mice, *Eur. J. Pharmacol.* 661 (2011) 124-132.
- [33] S. Tanakaa, T. Sato, N. Akimotoa, M. Yanob, A. Itoa, Prevention of UVB-induced photoinflammation and photoaging by a polymethoxy flavonoid, nobiletin, in human keratinocytes *in vivo* and *in vitro*, *Biochem. Pharmacol.* (2004) 433-439.
- [34] A. Filip, S. Clichici, D. Daicoviciu, C. Catoi, P Bolfa, I.D. Postescu, A. Gal, I. Baldea, C. Gherman, A. Muresan, Chemopreventive effects of *Calluna vulgaris* and *Vitis vinifera* extracts on UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice, *J. Physiol. Pharmacol.* 62 (2011) 385-392.
- [35] D. Cvetkovic, D. Markovic, Lycopene control of benzophenone-sensitized lipid peroxidation, *J. Phys. Chem. A* 5 (2012) 763-774.
- [36] B.-Z. Zhu, A.C. Carr, B. Frei, Pyrrolidine dithiocarbamate is a potent antioxidant against hypochlorous acid-induced protein damage, *FEBS Lett.* 532 (2002) 80-84.
- [37] Z. Teke, B. Kabay, F.O. Aytakin, C. Yenisey, N.C. Demirkan, M. Sacar, E. Erdem, A. Ozden, Pyrrolidine dithiocarbamate prevents 60 minutes of warm mesenteric ischemia/reperfusion injury in rats, *Am. J. Surg.* 194 (2007) 255-262.

- [38] S.K. Katiyar, H. Mukhtar, Green tea polyphenol (2)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of leukocytes, depletion of antigen-presenting cells, and oxidative stress, *J. Leukocyte Biol.* 69 (2001) 719-726.
- [39] H. Hattoria, K.K. Subramaniana, J. Sakaia, Y. Jia, Y. Li, T.F. Porter, F. Loison, B. Sarraj, A. Kasorn, H. Jo, C. Blanchard, D. Zirkle, D. McDonald, S.Y. Pai, C.N. Serhan, H.R. Luo, Small molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 3546-3551.
- [40] R. Bruck, H. Aeed, R. Schey, Z. Matas, R. Reifen, G. Zaiger, A. Hochman, Y. Avnil, Pyrrolidine dithiocarbamate protects against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure in rats, *J. Hepatol.* 36 (2002) 370-377.
- [41] W.A. Verri Jr, F.O. Souto, S.M. Vieira, S.C.L. Almeida, S.Y. Fukada, D. Xu, J.C. Alves-Filho, T.M. Cunha, A.T.G. Guerrero, R.B. R.B. Mattos-Guimaraes, F.R. Oliveira, M.M. Teixeira, J.S. Silva, I.B. Mcinnes, S.H. Ferreira, P. Louzada-Junior, F.Y. Liew, F.Q. Cunha, IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy, *Ann. Rheum. Dis.* 69 (2010) 1697-1703.
- [42] F.O. Souto, A.C. Zarpelon, L.S. Ferrari, V. Fattori, R. Casagrande, M.J.V. Fonseca, T.M. Cunha, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, W.A. Verri Jr, Quercetin reduces neutrophil recruitment induced by CXCL8, LTB4, and fMLP: inhibition of actin polymerization, *J. Nat. Prod.* 74 (2011) 113-118.
- [43] C.H. Kim, J.H. Kim, S.J. Moon, C.Y. Hsu, J.T. Seo, Y.S. Ahn, Biophasic effects of dithiocarbamates on the activity of nuclear factor- κ B, *Eur. J. Pharmacol.* 392 (2000), 133-136.
- [44] C.H. Kim, J.H. Kim, C.Y. Hsu, Y.S. Ahn, Zinc is required in pyrrolidine dithiocarbamate inhibition of NF-kappa B activation, *FEBS Lett.* 449 (1999) 28-32.
- [45] C.H. Kim, J.H. Kim, S.J. Moon, K.C. Chung, C.Y. Hsu, J.T. Seo, Y.S. Ahn, Pyrithione, a zinc ionophore, inhibits NF-kappa B activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259 (1999) 505-509.
- [46] V. Staniforth, W.-C. Huang, K. Aravindaram, N.-S. Yang, Ferulic acid, a phenolic phytochemical, inhibits UVB-induced matrix metalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms, *J. Nutr. Biochem.* 23 (2012) 443-451.
- [47] S.B.A. Cau, D.A. Guimaraes, E. Rizzi, C.S. Ceron, L.L. Souza, C.R. Tirapelli, R.F. Gerdach, J.E. Tanus-Santos, Pyrrolidine dithiocarbamate down-regulates vascular matrix metalloproteinases and ameliorates vascular dysfunction and remodelling in renovascular hypertension, *Br. J. Pharmacol.* 164 (2011) 372-381.
- [48] Y.-C. Chou, J.-R. Sheu, C.-L. Chung, C.-Y. Chen, F.-L. Lin, M.-J. Hsu, Y.-H. Kuo, G. Hsiao, Nuclear-targeted inhibition of NF- κ B on MMP-9 production by human monocytic cell, *Chem. Biol. Interact.* 184 (2010) 403-412.
- [49] J.-J. Zhang, Z.-M. Xu, C.-M. Zhang, H.-Y. Dai, X.-Q. Ji, X.-F. Wang, C. Li, Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits nuclear factor- κ B pathway activation, and regulates adhesion,

migration, invasion and apoptosis of endometriotic stromal cells, *Mol. Hum. Reprod.* 17 (2011) 175-181.

[50] K.-I.S. Wu, G.W. Schmid-Schonbein, Nuclear factor kappa B and matrix metalloproteinase induced receptor cleavage in the spontaneously hypertensive rat, *Hypertens.* 57 (2011) 261-268.

[51] A. Petrova, L.M. Davids, F. Rautenbach, J.L. Marnewick, Photoprotection by honeybush extracts, hesperidin and mangiferin against UVB-induced skin damage in SKH-1 mice, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 103 (2011) 126-139.

[52] H.H. Hagar, An insight into the possible protective effect of pyrrolidine dithiocarbamate against lipopolysaccharide-induced oxidative stress and acute hepatic injury in rats, *Saudi Pharm. J.* 17 (2009) 259-267.

[53] A. Mihm, J. Ennen, U. Pessara, R. Kurth, W. Druge, Inhibition of HIV-1 replication and NF- κ B activity by cysteine and cysteine derivatives, *AIDS* 5 (1991) 497- 505.

[54] J. Satriano, D. Schlonorff, Activation and attenuation of transcription factor NF- κ B in mouse glomerular mesangial cells in response to tumor necrosis factor- α , immunoglobulin G, and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate, *J. Clin. Invest.* 94 (1994) 1629-1636.

[55] D. Moellering, J. Mcandrew, H. Jo, V.M. Darley-usmas, Effects of pyrrolidine dithiocarbamate on endothelial cells: protection against oxidative stress, *Free Radical Biol. Med.* 26 (1999) 1138-1145.

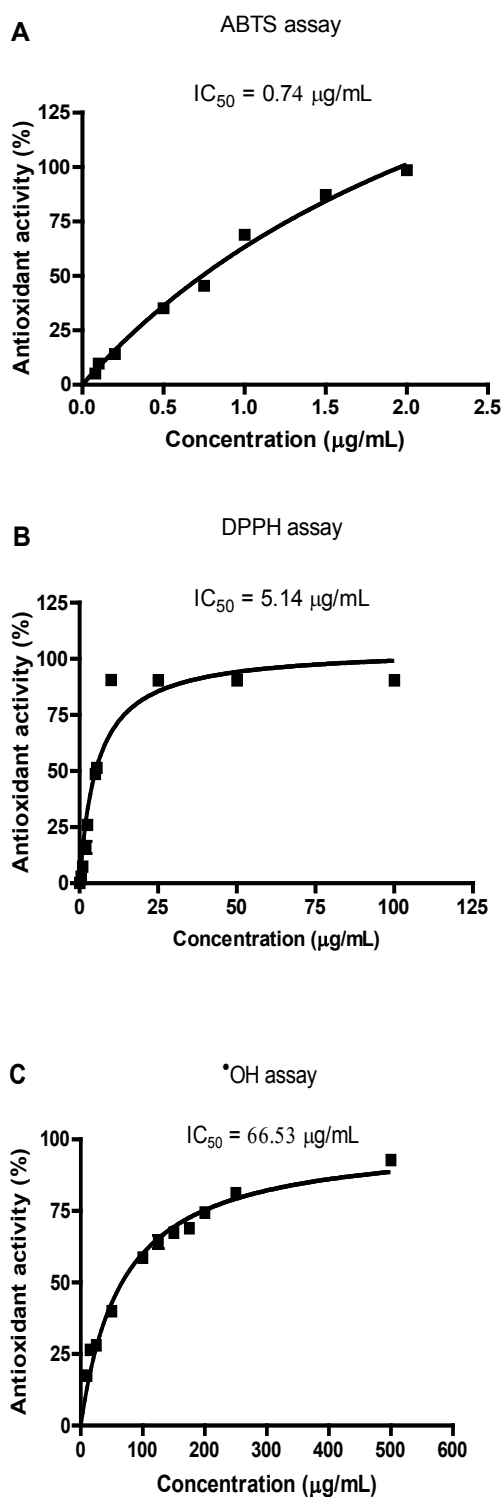


Fig. 1. Free radical scavenging activity of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC). PDTC was added at indicated concentration and assayed for scavenging the radical 2,2'-azinobis-(3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (Panel A), 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical (DPPH) (Panel B) and hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) (Panel C). Results represent means \pm SEM of triplicate values representative of three separated experiments.

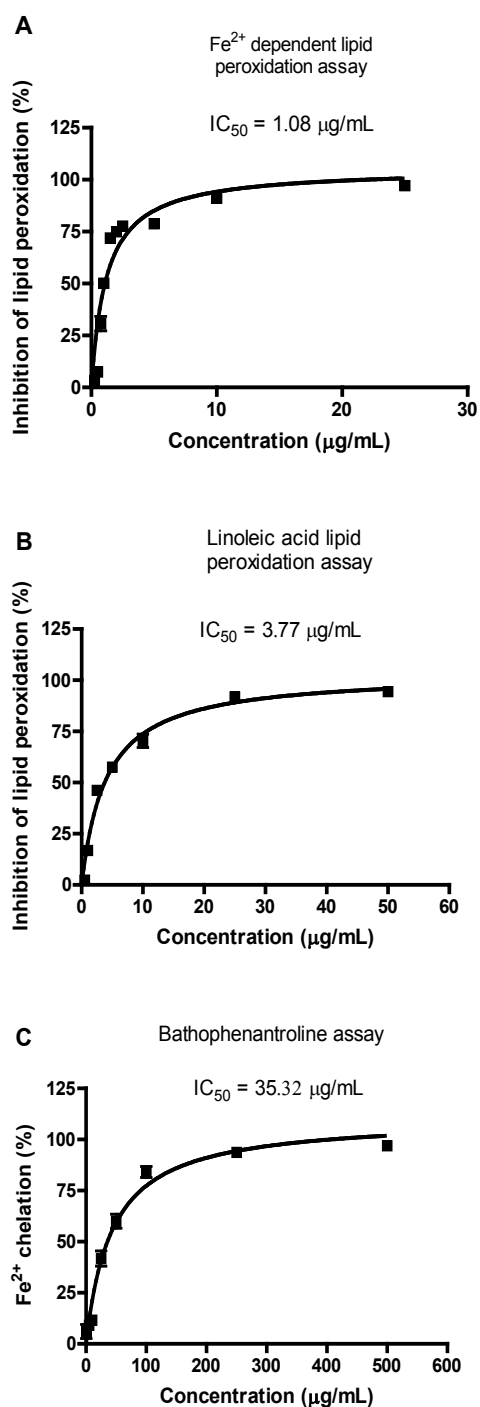


Fig. 2. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) inhibit lipid peroxidation *in vitro* at initiation, propagation, termination stages and iron chelating. PDTC was added at indicated concentration and assayed for Fe²⁺-dependent peroxidation (Panel A), Fe²⁺-independent peroxidation (Panel B) and bathophenanthroline assay to determine Fe²⁺ chelation (Panel C). Data are present as percentage of inhibition relative to control. Results represent means \pm SEM of triplicate values representative of three separated experiments.

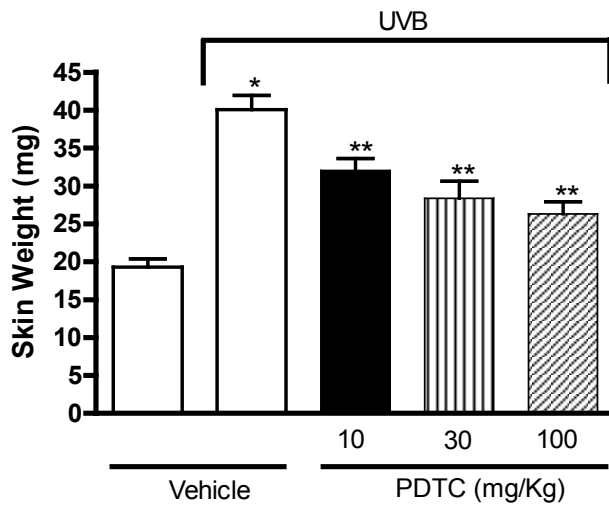


Fig. 3. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) inhibit UVB irradiation-induced skin edema in hairless mice. Values are the mean \pm SEM of 2-3 separated experiments, 5 mice per group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's t-test. * p <0.05 compared to the non-irradiated control and ** p <0.05 compared to the irradiated control.

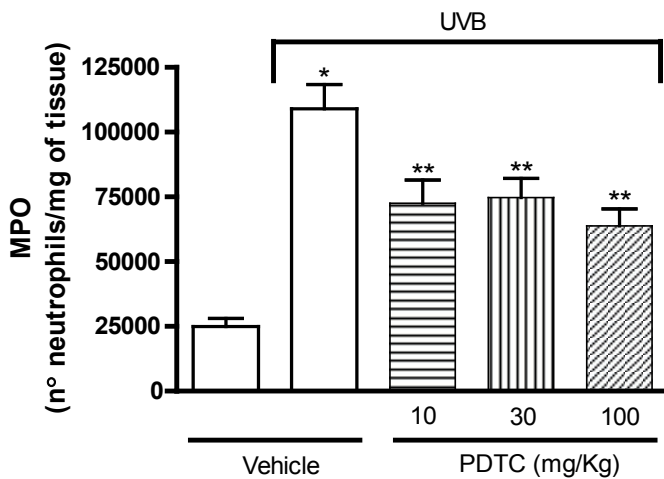


Fig. 4. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) inhibit UVB irradiation-induced increase of myeloperoxidase (MPO) activity. Results are represented by means \pm SEM of 2-3 separated experiments, 5 mice per group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's t-test. * p <0.05 compared to the non-irradiated control and ** p <0.05 compared to the irradiated control.

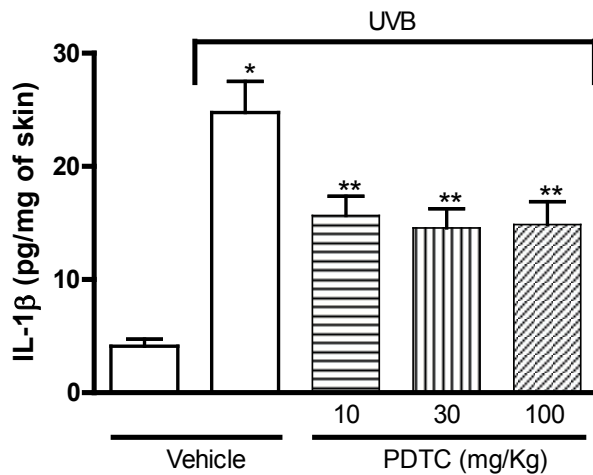


Fig. 5. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) inhibit UVB irradiation-induced cytokines IL-1 β production. Values are the mean \pm SEM of 2-3 separated experiments, 5 mice per group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's t-test. * p <0.05 compared to the non-irradiated control and ** p <0.05 compared to the irradiated control.

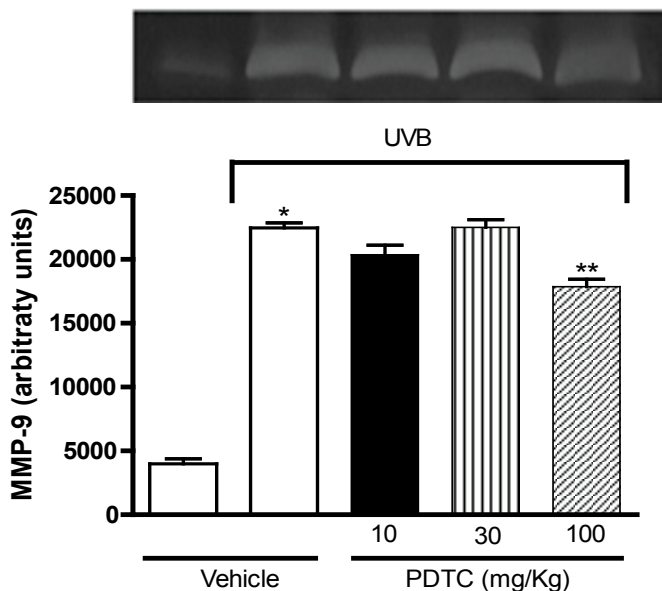


Fig. 6. Effect of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) on UVB irradiation-induced increase of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity. Results are shown as means \pm SEM of 2-3 separated experiments, 5 mice per group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's t-test. * p <0.05 compared to the non-irradiated control and ** p <0.05 compared to the irradiated control.

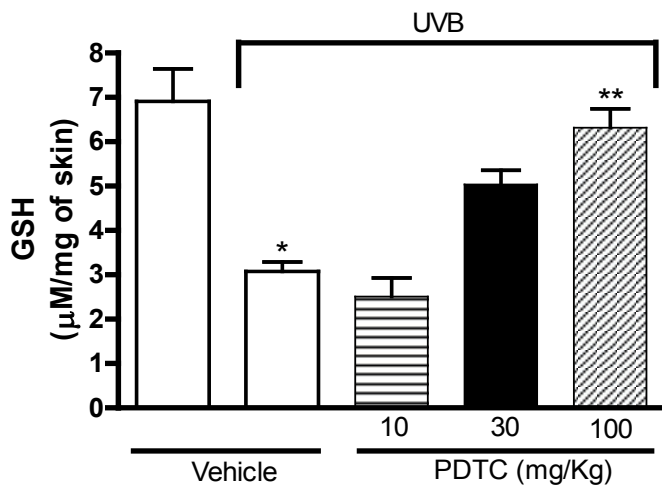


Fig. 7. Effect of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) on the decrease of endogenous reduced glutathione (GSH) levels induced by UVB irradiation. Results are shown as means \pm SEM of 2-3 separated experiments, 5 mice per group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's t-test. * p <0.05 compared to the non-irradiated control and ** p <0.05 compared to the irradiated control.

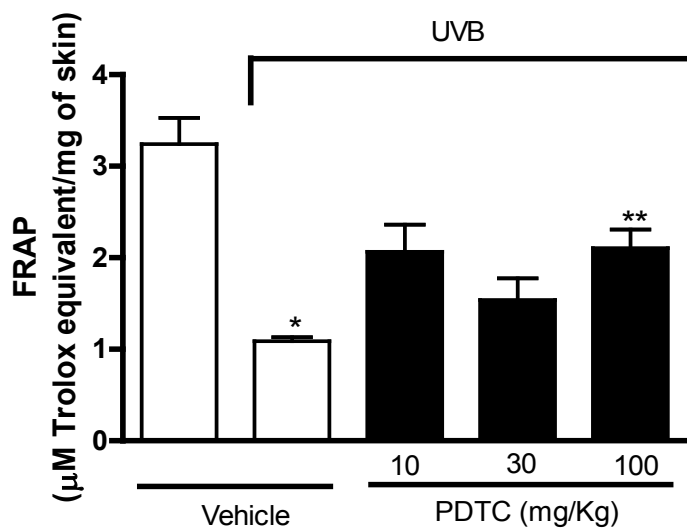


Fig. 8. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) increases the antioxidant capacity of skin after UVB irradiation in ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. Results are shown as means \pm SEM of 2-3 separated experiments, 5 mice per group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's t-test. * p <0.05 compared to the non-irradiated control and ** p <0.05 compared to the irradiated control.

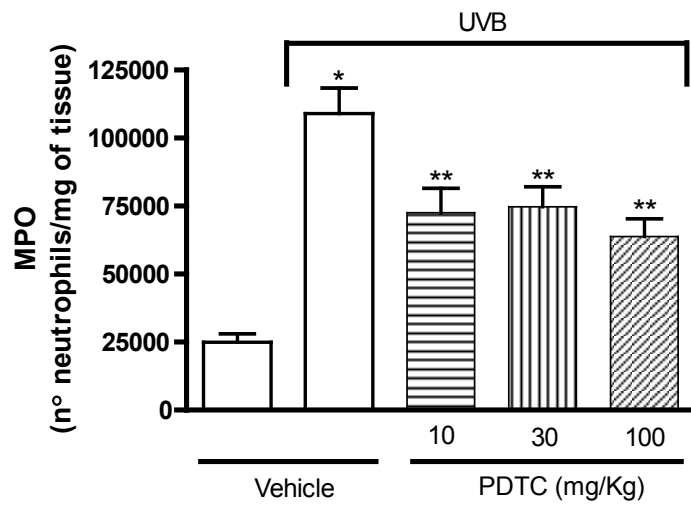


Fig. 9. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) increases the antioxidant capacity of skin after UVB irradiation in 2,2'-azinobis-(3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) assay. Results are shown as means \pm SEM of 2-3 separated experiments, 5 mice per group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's t-test. * $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control and ** $p < 0.05$ compared to the irradiated control.

4.2 Efficacy of topical formulation containing PDTC against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice skin

Journal of Dermatological Science - Letters to the Editor

Ana L. M. Ivan^a, Marcela Z. C. e Silva^a, Renata M. Martinez^a, Vitor S. Ferreira^a, Fabiana T. M. C. Vicentini^b, Fernanda M. P. Vilela^b, Ana C. Zarpelon^c, Maria J. V. Fonseca^b, Marcela M. Baracat^a, Sandra R. Georgetti^a, Waldiceu A. Verri Jr.^c, Rúbia Casagrande^{a*}

^aDepartment of Pharmaceutical Science, Health Science Center, State University of Londrina (UEL), 86038-350, Londrina, PR, Brazil

^bDepartment of Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto (USP), 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^cDepartment of Pathology, Biological Science Center, State University of Londrina (UEL), 86051-990, Londrina, PR, Brazil

*Corresponding author:

Department of Pharmaceutical Sciences, Robert Koch Avenue, 60, University Hospital.

Av. Robert Koch, 60, 86038-350 – Londrina, PR, Brazil

Phone: +55 43 33712475

Fax: +55 43 33712475

E-mail: rubiacasa@uel.br or rubiacasa@yahoo.com.br

The skin is continuously exposed to a combination of external insults and one of the main is the ultraviolet (UV) radiation causing edema, erythema, inflammation, premature skin ageing and photocarcinogenesis [1,2]. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) is an antioxidant with anti-inflammatory activity [3,4]. This study was designed to examine the therapeutic effects of topical formulation containing PDTC against damages caused by UVB exposure.

Experiments were performed using sex matched hairless mice (HRS/J) divided in to four groups (n=5): non-irradiated control, irradiated control, irradiated and treated with formulation without PDTC, irradiated and treated with formulation containing PDTC. Mice received topical treatment on the dorsal surface with 0.5 g of the formulation, 12 h, 6 h and 5 min before and 6 h after the irradiation beginning (4.14 J/cm²) session. The UVB source used was a Philips TL/12 RS 40W (Medical-Holand) with peak emission at 313 nm [1]. The animals were euthanized 12 h after the end of the irradiation session. All procedures were approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Londrina (Of. Circ. CEEA N° 160/2010 in December 17, 2010, CEEA 85/10, process n° 33631.2010.82).

The emulsion was prepared with commercially available self-emulsifying wax (Polawax[®]) 10%, triglycerides of caprylic and capric acids 5%, propylene glycol 6%, methylparaben and propylparaben 1% and water to complete 100%. PDTC (0.5%) was added or not in the formulation.

Skin edema was measured as an increase in the dorsal skin weight in a constant area determined with the aid of a mold, followed by weighing [2]. The result was express in mg of skin.

The leukocyte migration was evaluated using the myeloperoxidase (MPO) activity colorimetric assay as described previously [1]. The MPO activity of samples was compared to a standard curve of neutrophils. The results are presented as MPO activity (number of total neutrophils per mg of skin).

Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) substrate-embedded enzymography was used to detect matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). The assay was conduced as described previously [5]. Zone of enzyme activity was analyzed by comparing the groups in the ImageJ Program (NIH, Bethesda, MD, USA).

The reduced glutathione (GSH) levels were determined by the 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) [6]. The standard curve was prepared with GSH 0-150 µM. The results are presented as µM of GSH per mg of skin.

The ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-azinobis-(3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) assays were used to determine the skin antioxidant

capacity. The assays were previously described [7]. For both assays the standard curve was prepared with trolox on concentration range of 0.5-20 μM to FRAP and 1-25 μM to ABTS. The results are presented as μM trolox equivalent per mg of skin.

Data were expressed as means \pm SEM of 2 separated experiments and were analyzed using Bonferroni's t test and considered significantly different when $p < 0.05$ was obtained.

Acute exposure of the skin to UVB-radiation has been shown to produce excessive generation of reactive oxygen species (ROS), which are responsible for photodamage of the skin [1,2]. The ROS produced activate the nuclear factor- κB (NF- κB), an oxidative stress sensitive factor that, plays a crucial role in the activation of multiple target genes involved in the expression of several pro-inflammatory molecules [1,3].

The emulsion containing PDTC reduced the UVB radiation-induced skin edema (Fig. 1A) and leukocyte migration (Fig. 1B). Corroborating, PDTC inhibited the intestinal edema induced by ischemia/reperfusion in rats, which is a model of disease involving free radical mediated inflammation [4]. The myeloperoxidase (MPO) activity is commonly used as a measure of total infiltrating neutrophil content found in inflamed tissues [1,2]. Consistent with the present data, PDTC reduced the MPO activity in superior mesenteric ischemia/reperfusion model in rats [4] and acute inflammatory carrageenan-induced pleurisy in mice [3].

After UVB exposure, ROS trigger the release of proinflammatory cytokines and growth factors that regulate the expression of matrix metalloproteinases (MMPs), including MMP-9 by a NF- κB dependent mechanism. UVB radiation is responsible for overexpression of MMP in the skin that contributes to skin cancer and acceleration of photoaging [1,8]. Treatment with PDTC reduced UV irradiation-induced secretion/activity of MMP-9 (Fig. 1C). These findings support those from previous studies showing that PDTC down-regulates vascular MMPs and ameliorates vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertension in rats [8].

Several reports indicate that tissue injury induced by UVB radiation results in reduced glutathione (GSH) depletion. Within the skin, GSH concentrates mainly in the epidermis, which is considered our first line of defense in the skin [1]. Once again, the formulation containing PDTC inhibited the UVB irradiation-induced depletion of GSH (Fig. 2A). In agreement, it has been demonstrated that treatment with PDTC also prevents the reduction of GSH concentration in acute hepatic injury in rats induced by LPS [9]. The antioxidant capacity of the skin after UVB radiation, tested by FRAP and ABTS assay, improved on group treated with PDTC when compared with vehicle group and positive control irradiation group (Fig. 2B and C).

All findings support the view that formulation containing PDTC attenuates the acute inflammation and the oxidative stress induced by UVB radiation in hairless mice. Although the mechanisms of action of PDTC are not completely understood, studies demonstrate that PDTC inhibits I κ B- α degradation thus inhibiting NF- κ B activation and possess antioxidant properties [3,10]. In general, antioxidants are known to exhibit beneficial effects during inflammation. The biological effects of PDTC include the interference with reactive oxygen metabolism, the chelation of metals ions and its influence on intracellular thiol levels [3]. Especially, inhibition of ROS generated by xanthine oxidase are possibly involved in the protective effect of PDTC [4]. PDTC functions as an antioxidant scavenging of ROS by the dithiocarboxy group and chelating activity for heavy metal ions [9,10].

Thus, the topical treatment with PDTC reduced the UVB irradiation-induced skin inflammation and oxidative stress. Therefore, the present study suggests topical formulations containing PDTC as possible treatment of skin photo-inflammation and -oxidative stress, which merits further pre-clinical and clinical investigation.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Araucária. We thank the technical assistance of Denise Duarte from Post-graduation Laboratory of UEL.

REFERENCES

- [1] Casagrande R, Georgetti SR, Verri WAJr, Dorta DJ, Santos AC, Fonseca MJV. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *J Photochem Photobiol B: Biol* 2006; 84:21-27.
- [2] Afaq F, Adhami VM, Ahmad N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 186:28-37.
- [3] Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Britti D, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 496-510.
- [4] Teke Z, Kabay B, Aytakin FO, Yenisey C, Demirkan NC, Sacar M, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate prevents 60 minutes of warm mesenteric ischemia/reperfusion injury in rats. *Am J Surg* 2007; 194: 255-62.
- [5] Fonseca YM, Catini CD, Vicentini FTMC, Nomizo A, Gerlach RF, Fonseca MJV. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *J Ethnopharmacol* 2010; 127:596-601.
- [6] Srinivasan P, Sabitha KE, Shyamaladevi CS. Attenuation of 4-Nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols. *Life Sci* 2007; 80:1080-6.
- [7] Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2V-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp. Biochem. Physiol. C* 2005; 140:47-52.
- [8] Cau SBA, Guimarães DA, Rizzi E, Ceron CS, Souza LL, Tirapelli CR, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate down-regulates vascular matrix metalloproteinases and ameliorates vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertension. *Br J Pharmacol* 2011; 164:72-381.
- [9] Hagar HH, An insight into the possible protective effect of pyrrolidine dithiocarbamate against lipopolysaccharide-induced oxidative stress and acute hepatic injury in rats. *Saudi Pharm J* 2009; 17:259-267.
- [10] Bruck R, Aeed H, Schey R, Matas Z, Reifen R, Zaiger G, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate protects against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure in rats. *J Hepatol* 2002; 36:370-7.

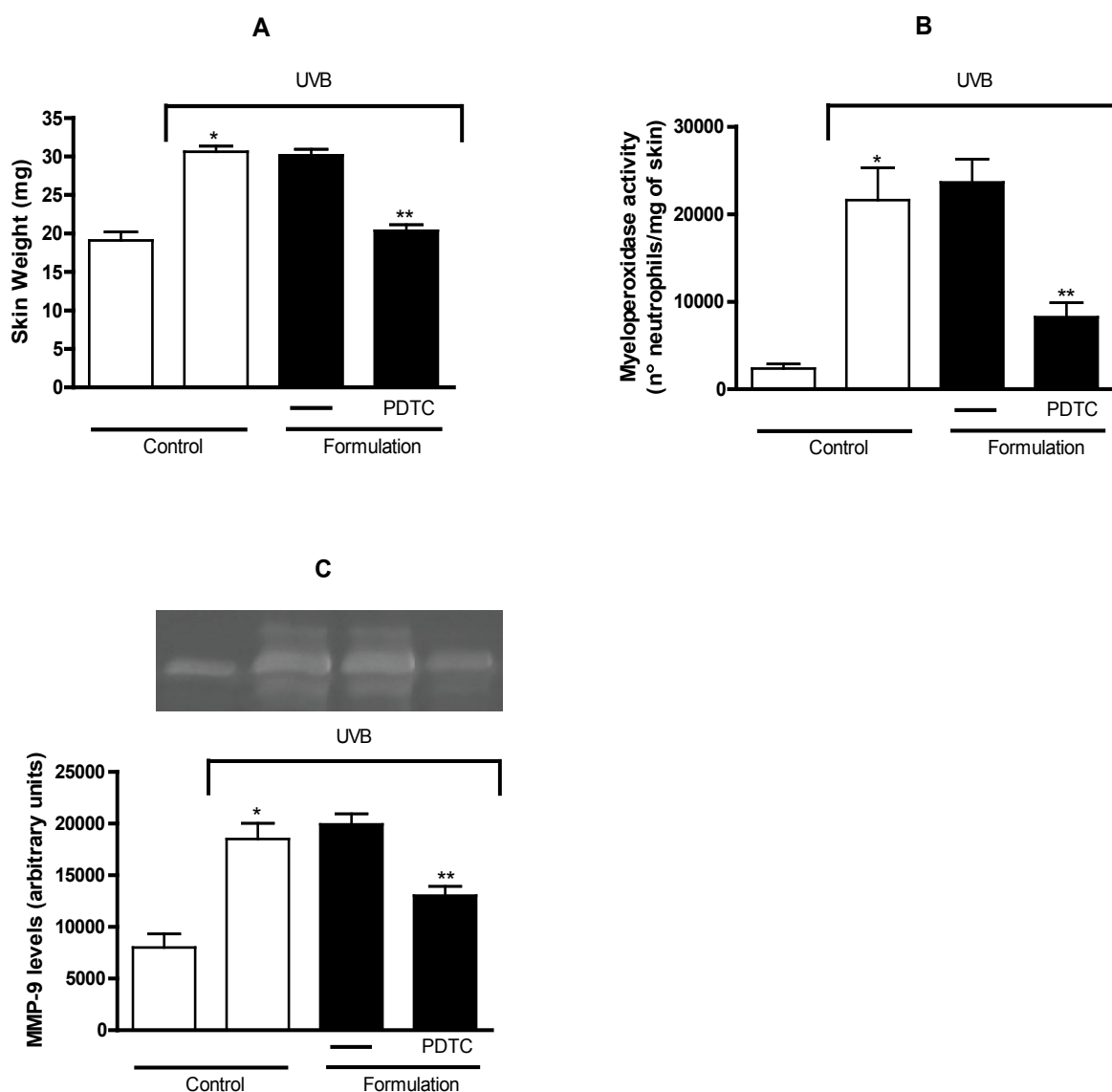


Fig. 1. Formulation containing pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) reduces UVB radiation-induced skin inflammation. Mice groups were naïve, UVB radiated, and UVB irradiated treated with control formulation or PDTC containing formulation 12 h, 6 h and 5 min before and 6 h after irradiation. At 12 h after UVB radiation skin samples were collected for skin edema (A), myeloperoxidase (MPO) activity (B) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) assay (C). Results are represented as mean \pm SEM of 2 separated experiments, 5 mice per group experiment. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's t-test. * $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control and ** $p < 0.05$ compared to the irradiated control.

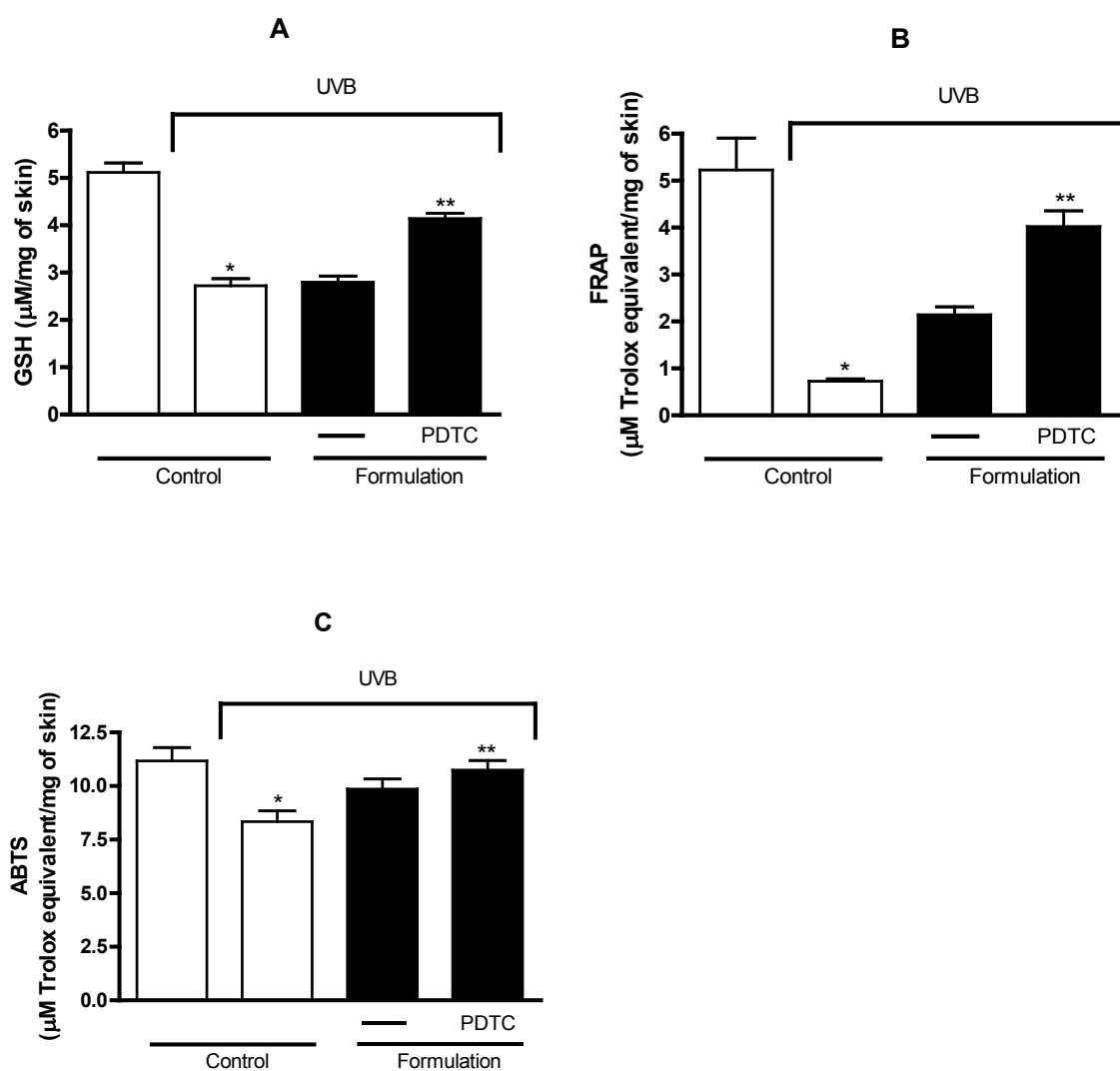


Fig. 2. Formulation containing pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) maintained the antioxidant capacity of skin. Mice groups were as described in figure 1. At 12 h after UVB radiation skin samples were collected for reduced glutathione (GSH) (A), ferric reducing antioxidant power (FRAP) (B) and 2,2'-azinobis-(3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (C) assays. Results are shown as means \pm SEM of 2 separated experiments, 5 mice per group per experiment. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's t-test. * $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control and ** $p < 0.05$ compared to the irradiated control.

5 CONCLUSÕES

Os resultados *in vitro* obtidos nesse estudo comprovam que o PDTC é um potente antioxidante e nos mostra que este pode agir por diferentes mecanismos.

In vivo, os resultados demonstram que o tratamento com PDTC por ambas as vias foi eficaz na melhora dos parâmetros inflamatórios e na manutenção da capacidade antioxidante da pele após a irradiação UVB.

Este estudo fornece os primeiros resultados pré-clínicos do uso de PDTC na proteção contra a inflamação/estresse oxidativo induzido por radiação UVB. Sendo necessários estudos pré-clínicos e moleculares complementares para melhor elucidação de todo o processo.

REFERÊNCIAS

AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation Research**, v. 571, p. 153-173, 2005.

AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; AHMAD, N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 186, p. 28-37, 2003.

ALTURA, B. M.; GEBREWOLD, A. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates alcohol-induced leucocyte-endothelial cell interaction and cerebral vascular damage in rats: possible role of activation of transcription factor NF- κ B in alcohol brain pathology. **Alcohol**, v. 16, n. 1, p.25-28, 1998.

ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, v. 523-524, p. 9-20, 2003.

ARUOMA, O. I. Free radicals, antioxidants and international nutrition. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 8 (1), p. 53-63, 1999.

ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 75, n. 2, p. 199-212, 1998.

ATHAR, M.; AN, K. P.; TANG, X.; MOREL, K. D.; KIM, A. L.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R. Photoprotective effects of sulindac against ultraviolet B-induced phototoxicity in the skin of SKH-1 hairless mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, p. 370-378, 2004.

BATHIA, N.; DEMMER, T. A.; SHARMA, A. K.; ELCHEVA, I.; SPIEGELMAN, V. S. Role of β -TrCP ubiquitin ligase receptor in UVB mediated responses in skin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 508, p. 178-184, 2011.

BATISTA, L. F. Z.; KAINA, B.; MENEGHINI, R.; MENCK, C. F. M. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. **Mutation Research**, ARTICLE IN PRESS, 2008.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BOLANM, B. J.; ULVIK, R. J. Release of iron from ferritin by xanthine oxidase. Role of the superoxide radical. **Journal of Biochemistry**, v. 243, p. 55-59, 1987.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D, ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRUCK, R.; AEED, H.; SCHEY, R.; MATAS, Z.; REIFEN, R.; ZAIGER, G.; HOCHMAN, A.; AVNIL, Y. Pyrrolidine dithiocarbamate protects against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure in rats. **Journal of hepatology**, v. 36, p. 370-377, 2002.

BUEGE, A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52c, p. 302-310, 1978.

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. **Journal of Biochemical Toxicology**, p. 217-254, 1987.

CARINI, M.; ALDINI, G.; PICCONE, M.; FACINO, R. M. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **II Farmaco**, v. 55, p. 526-534, 2000.

CASAGRANDE, R. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo quercetina: controle físico-químico e avaliação da eficácia *in vivo***. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A. Jr.; DORTA, D. J.; SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, p. 21-27, 2006.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI, W.A., JR; BORIN, M.F.; LOPEZ, R.F.V.; FONSECA, M.J.V. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 183-190, 2007.

CHANG, X.; SHAO, C.; WU, Q.; WU, Q.; HUANG, M.; ZHOU, Z. Pyrrolidine Dithiocarbamate Attenuates Paraquat-Induced Lung Injury in Rats. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Article ID 619487, 8 pages doi:10.1155/2009/619487, 2009.

CHEN, S. -H.; LIN, J. -K.; LIANG, Y. -C.; PAN, M.-H.; LIU, S. -H.; LIN-SHIAU, S. -Y. Involvement of activating transcription factors JNK, NF- κ B, and AP-1 in apoptosis induced by pyrrolidine dithiocarbamate/Cu complex. **European Journal of Pharmacology**, v. 594, p. 9-17, 2008.

CHENG, G; WHITEHEAD, S. N.; HACHINSKI, V.; CECHETTO, D. F. Effects of pyrrolidine dithiocarbamate on beta-amyloid (25-35)-induced inflammatory responses and memory deficits in the rats. **Neurobiology and disease**, v. 23, p. 140-151, 2006.

CHOU, Y-C.; SHEU, J-R.; CHUNG, C-L.; CHEN, C-Y.; LIN, F-L.; HSU, M-J.; KUO, Y-H; HSIAO, G. Nuclear-targeted inhibition of NF- κ B on MMP-9 production by human monocytic cell. **Chemio-Biological Interactions**, v. 184, p. 403-412, 2010.

CUZZOCREA, S.; CHATTERJEE, P. K.; MAZZON, E.; DUGO, L.; SERRAINO, I.; BRITTI, D.; MAZZULLO, G.; CAPUTI, A. P.; THIEMERMANN, C. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 496-510, 2002.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 153-158, 2007.

FONSECA, Y. M. **Avaliação da atividade fotoquimiopreventiva do extrato de calêndula**. Tese de doutorado – Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

FONSECA, Y. M.; CATINI, C. D.; VICENTINI, F. T. M. C.; NOMIZO, A.; GERLACH, R. F.; FONSECA, M.J.V. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 596-601, 2010.

FUCHS, J.; HUFLEJT, M. E.; ROTHFUSS, L. M.; WILSON, D. S.; CARCAMO, G.; PACKER, L. Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 87, p. 769-773, 1989.

FUCHS, J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol-L-ascorbic L-ascorbic acid and b-carotene in cutaneous photoprotection. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, n. 7, p. 848-873, 1998.

GORNALL, A. G.; BARDILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reactions. **Journal of Biological Chemistry**, p. 177-751, 1949.

GRANDJEAN-LAQUERRIERE, A.; GANGLOFF, S. C.; NEOUR, R. L.; TRENTESAUX, C.; HORNEBECK, W.; GUENOUNOU, M. Relative contribution of NF- κ B and AP-1 in the modulation by curcumin and pyrrolidine dithiocarbamate of the UVB-induced cytokine expression by Keratinocytes. **Cytokine**, v. 18, n. 3, p. 168-177, 2002.

HALLIDAY, G. M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. **Mutation Research**, v. 571, p. 107-120, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C., ARUOMA, O. I. The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical Biochemistry**, v. 165, p. 215-219, 1987.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**: Pergamon Press, 3rd ed., p. 936, 1999.

HECK, D. E.; GEREEKE, D. R.; VETRANO, A. M.; LASKIN, J. D. Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, p. 288-297, 2004.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, Revisão, 2008.

KATALINIC, V.; MODUN, D.; MUSIC, I.; BOBAN, M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2V-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 140, p. 47-52, 2005.

KAUR, I. P.; KAPILA, M.; AGRAWAL, R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. **Ageing Research Review**, v. 6, p. 271-288, 2007.

KIM, C. H.; KIM, J. H.; MOON, S. H.; HSU, C. Y.; SEO, J. T.; AHN, Y. S. Biophasic effects of dithiocarbamates on the activity of nuclear factor- κ B. **European Journal of Pharmacology**, v. 392, p. 133-136, 2000.

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

KOSTER, M.I. e ROOP, D.R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. **European Journal of Cellular Biology**, v. 83, p. 625-629, 2004.

LEE, C. -H.; KIM, S. -H.; LEE, S. -M. Effect of pyrrolidine dithiocarbamate on hepatic vascular stress gene expression during ischemia and reperfusion. **European Journal of Pharmacology**, v. 595, p. 100-107, 2008.

LINGNERT, H.; VALENTIN, K.; ERICKSON, C.E. Measurement of antioxidative effect in model system. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 3, p. 87-104, 1979.

MAHER, P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. **Ageing Research Reviews**, v. 4, p. 288-314, 2005.

MARTINEZ, M. A. R.; FRANCISCO, G.; CABRAL, L. S.; RUIZ, I. R. G.; NETO, C. F. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 81, n. 5, p. 405-419, 2006.

MEISNER, M.; SHMIDT, J.; SCHYWALSKY, M.; TSCHAIKOWSKY, K. Influence of pyrrolidine dithiocarbamate on the inflammatory response in macrophages and mouse endotoxin shock. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 22, p. 83-90, 2000.

MELONI, M.; NICOLAY, J. F. Dynamic monitoring of glutathione redox status in UV-B irradiated reconstituted epidermis effect of antioxidant activity on skin homeostasis. **Toxicology in Vitro**, v. 17, p. 609-613, 2003.

MOELLERING, D.; MCANDREW, J.; JO, H.; DARLEY-USMAS, V. M. Effects of pyrrolidine dithiocarbamate on endothelial cells: protection against oxidative stress. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1138-1145, 1999.

MORON, M. S.; DEPIERRE, J. W.; MANNERVIK, B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione s-transferase activities in rat lung and liver. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 582, p. 67-78, 1979.

NAVARRO, V. P.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L. A. B.; FREITAS, A. C. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiológicos da cavidade bucal. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, p. 233-248, 2006.

NICUOLO, F. D.; SERINI, S.; BONINSEGNA, A.; PALOZZA, P.; CALVIELLO, G. Redox regulation of cell proliferation by pyrrolidine dithiocarbamate in murine thymoma cells transplanted in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, p. 1424-1431, 2001.

PAZ, M. L.; FERRARI, A.; WEILL, F. S.; LEONI, J.; MAGLIO, D. H. G. Time-course evaluation and treatment of skin inflammation immune response after ultraviolet B irradiation. **Cytokine**, v. 44, p. 70-77, 2008.

PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINKUS, R.; WEINER, L. M.; DANIEL, V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione s-transferase gene expression. **Journal of biological chemistry**, v. 271, p. 13422-13429, 1996.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 1603-1616, 2010.

RITTIÉ, L.; FISHER, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 1, p. 705-720, 2002.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; WOOLF, C. J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 115, p. 1265-1275, 1995.

SÁNCHEZ-GONZALEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. *In vitro* antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, v. 90, p. 133-139, 2005.

SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 100, 1993.

SRINIVASAN, P.; SABITHA, K. E.; SHYAMALADEVI, C. S. Attenuation of 4-Nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols. **Life Sciences**, v. 80, p. 1080-1086, 2007.

STANIFORTH, V.; HUANG, W. -C.; ARAVINDARAM, K.; YANG, N. -S. Ferulic acid, a phenolic phytochemical, inhibits UVB-induced matrix metalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, p. 443-451, 2012.

VERRI, W.A., JR; GUERRERO, A.T.; FUKADA, S.Y.; VALERIO, D.A. CUNHA, T.M.; XU, D.; FERREIRA, S.H.; LIEW, F.Y.; CUNHA, F.Q. IL-33 mediates antigen-induced

cutaneous and articular hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, v. 105, p. 2723-2728, 2008.

VICENTINI, F. T. M. C.; HE, T.; SHAO, Y; FONSECA, M. J. V; VERRI JÚNIOR, W. A.; FISHER, G. J.; XU, J. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- κ B pathway. **Journal of Dermatological Science**, v. 61, p. 162-168, 2011.

ZHU, B. -Z.; CARR, A. C.; FREI, B. Pyrrolidine dithiocarbamate is a potent antioxidant against hypochlorous acid-induced protein damage. **FEBS Letters**, v. 532, p. 80-84, 2002.

ANEXO A: Avaliação tempo-resposta de todos os ensaios realizados *in vivo*

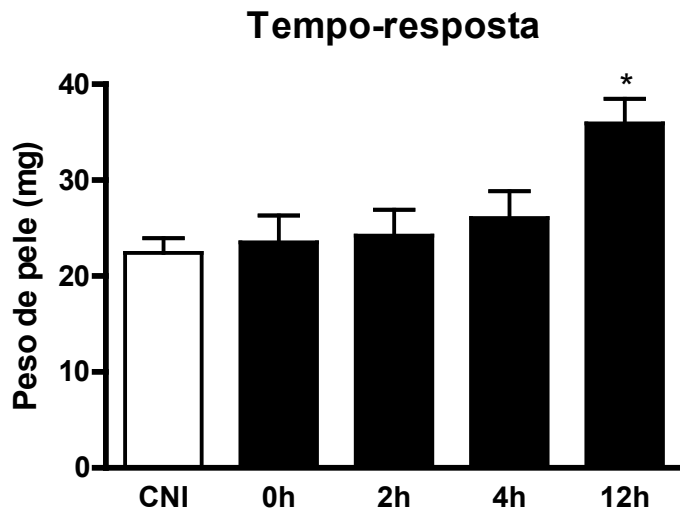


Fig. 1'. Avaliação tempo-resposta do edema cutâneo induzido por radiação UVB em camundongos sem pelo. Os resultados são apresentados como média \pm EPM de 2-3 experimentos separados, com 5 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado com o controle não irradiado.

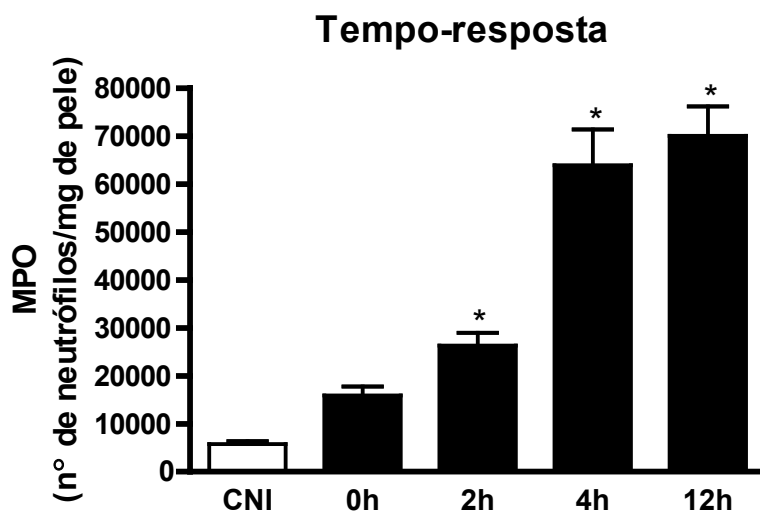


Fig. 2'. Avaliação tempo-resposta do aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) induzida pela radiação UVB em camundongos sem pelo. Os resultados são apresentados como média \pm EPM de 2-3 experimentos separados, com 5 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado com o controle não irradiado.

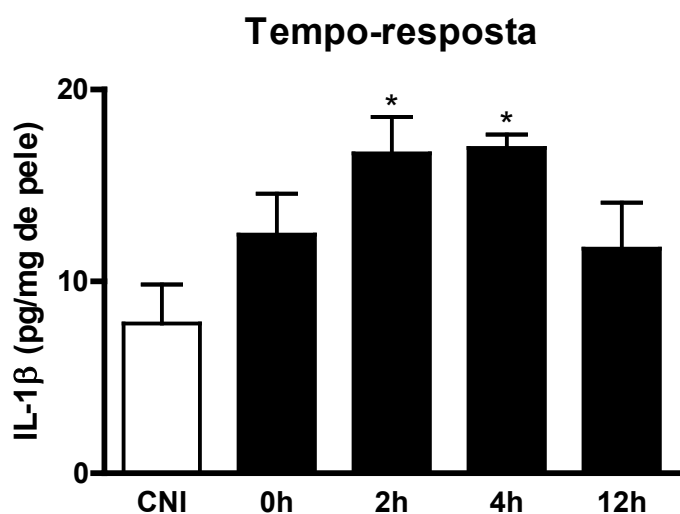


Fig. 3'. Avaliação tempo-resposta do aumento da produção de IL-1 β induzida pela radiação UVB em camundongos sem pelo. Os resultados são apresentados como média \pm EPM de 2-3 experimentos separados, com 5 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado com o controle não irradiado.

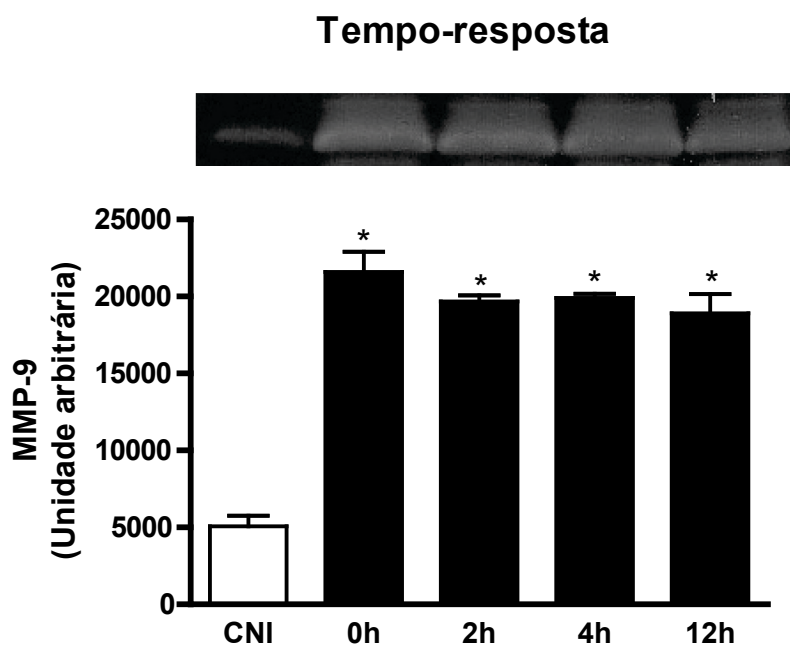


Fig. 4'. Avaliação tempo-resposta do aumento da atividade de matriz metaloproteinase-9 (MMP-9) induzida pela radiação UVB em camundongos sem pelo. Os resultados são apresentados como média \pm EPM de 2-3 experimentos separados, com 5 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado com o controle não irradiado.

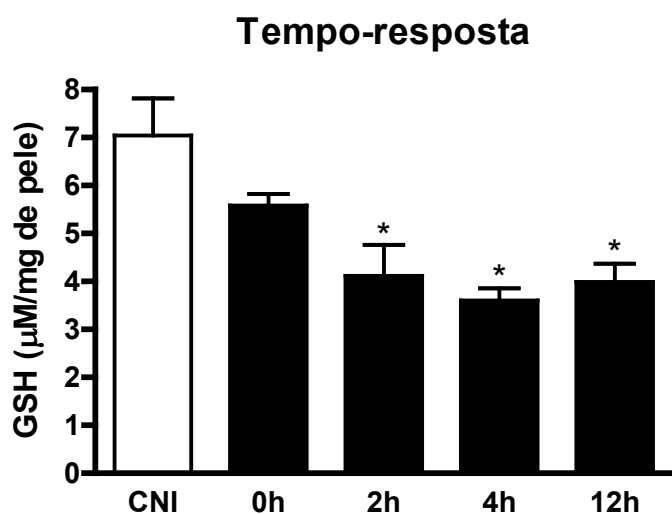


Fig. 5'. Avaliação tempo-resposta da diminuição do antioxidante endógeno glutathiona reduzida (GSH) induzido pela radiação UVB em camundongos sem pelo. Os resultados são apresentados como média \pm EPM de 2-3 experimentos separados, com 5 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado com o controle não irradiado.

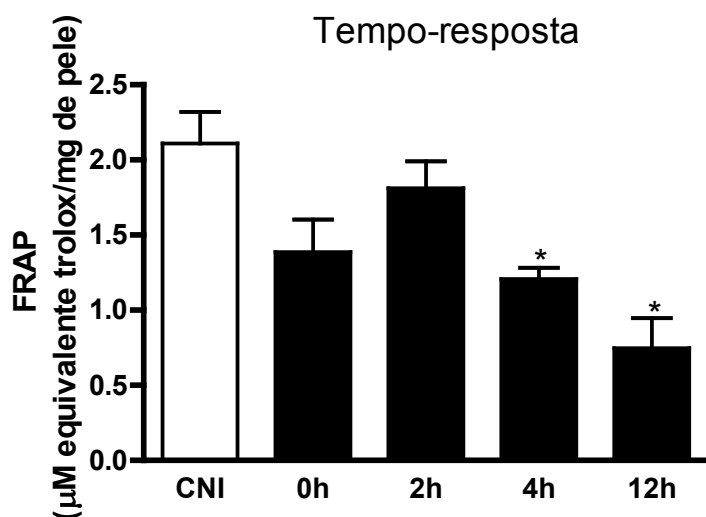


Fig. 6'. Avaliação tempo-resposta da diminuição da capacidade antioxidante da pele através do ensaio do poder antioxidante de redução férrica (FRAP). Os resultados são apresentados como média \pm EPM de 2-3 experimentos separados, com 5 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado com o controle não irradiado.

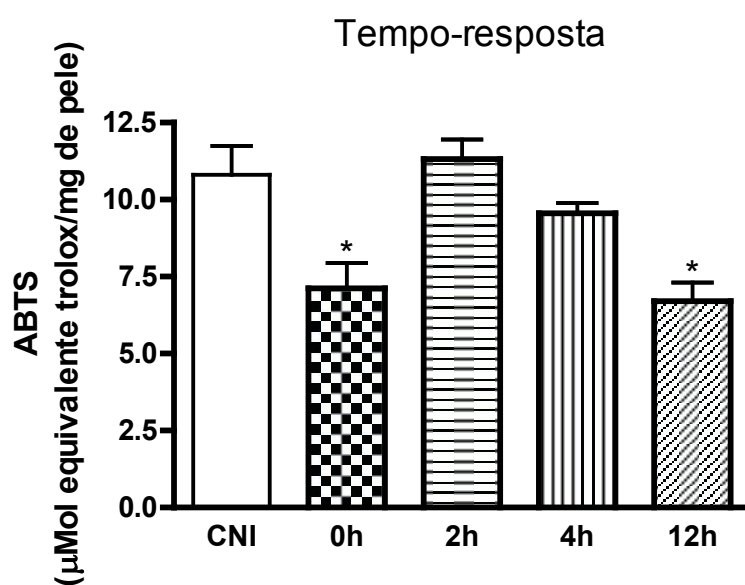


Fig. 7'. Avaliação tempo-resposta da diminuição da capacidade antioxidante da pele através do ensaio 2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS). Os resultados são apresentados como média \pm EPM de 2-3 experimentos separados, com 5 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado com o controle não irradiado.

ANEXO B: Guia para autores - The Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

INTRODUCTION

The *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (JPPB) welcomes Invited review articles and original papers not previously published

The journal provides a forum for the publication of papers relating to the various aspects of photobiology, as well as a means for communication in this multidisciplinary field. The scope includes:

- bioluminescence
- chronobiology
- DNA repair
- environmental photobiology
- nanotechnology in photobiology
- photocarcinogenesis
- photochemistry of biomolecules
- photomedicine
- photomorphogenesis
- photomovement
- photoreception
- photosensitization
- photosynthesis
- phototechnology
- spectroscopy of biological systems
- UV and visible radiation effects
- vision

This journal is cited by the following Abstracting Services: BIOSIS, Cambridge Scientific Abstracts, Chemical Abstracts, Current Contents, Elsevier BIOBASE/Current Awareness in Biological Sciences, EMBASE/Excerpta Medica, Embiology, Engineering Index, Medlar's System, Metals Abstracts, PASCAL/CNRS, Physics Abstracts, Physikalische Berichte, Polymer Contents, Research Alert™, Science Citation Index, Scopus.

Contact Details for Submission

Authors are requested to submit their article to the Editor responsible for the topic involved:

Dr. Laszlo Matyus: Biophysics, Biomolecular spectroscopy, Photodynamic Therapy, Dermatology, Photomedicine.

Dr. Robert Carpentier: Photosynthesis, Environmental photobiology, Photosensitisers, Oxygen radicals, DNA repair, UV/VIS effects.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by

the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

For submitting your manuscript to JPPB please go to our Elsevier Editorial System (EES) Website at: <http://ees.elsevier.com/jphotochem/> For technical questions related to your submission contact: authorsupport@elsevier.com. For general questions, contact Dr. Robert Carpentier (Robert.Carpentier@uqtr.ca), Dr. Laszlo Matyus (lmatyus@med.unideb.hu), or Dr. Dominic Robinson (d.robinson@erasmusmc.nl).

Referees

Please submit, with the manuscript, the names and addresses of 5 potential referees. The referees should not be editorial board members or from the same institute or geographical region as the authors.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsarticle', or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier 'elsarticle' LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and Units

Nomenclature and units. Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). The only exception is the use of min, h, d and a as units for elapsed time, though never when combined algebraically with other units. If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. Consult the IUPAC "Glossary of Terms Used in Photochemistry" for the correct terminology (source: The Spectrum, Bowling Green, Vol.16, 1, 2003, p 16), (online: www.bgsu.edu/departments/photochem), (cited link: http://www.aspjournals.com/auth_instruct.html) UV ranges. The official UV ranges as defined by the CIE must be used:

UV-A: 400-315nm

UV-B: 315-280nm

UV-C: 280-100nm

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. Further, high-resolution graphics files must be provided separately whether or not the graphics are embedded. See further under Electronic artwork.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference Style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual Authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result...."

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] B.K. Armstrong, A. Kricker, The epidemiology of UV induced skin cancer, J. Photochem. Photobiol.B 63 (2001) 8-18.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, third ed., Macmillan, New York, 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing, Inc., New York, 1994, pp. 281-304.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

ANEXO C: Guia para autores - Journal of Dermatological Science

The Official Journal of the Japanese Society for Investigative Dermatology

Submission of Manuscript.

Authors are requested to submit their paper and figures online via the Elsevier Editorial System (EES): <http://ees.elsevier.com/desc>. EES is a web-based submission and review system. Authors may submit manuscripts and track their progress through the system to publication. From 1 January 2005, the editor can only accept web-based submissions. For technical submission problems, please contact Elsevier Author Support authorsupport@elsevier.com. Email submissions are not allowed.

For inquiries about manuscripts please contact:

JDS Editorial office

Editor-in-Chief, Akimichi Morita
Journal of Dermatological Science (JDS) Editorial Office
Department of Geriatric and Environmental Dermatology
Nagoya City University
Graduate School of Medical Sciences
Nagoya 467-8601, Japan
Email: jdsci@med.nagoya-cu.ac.jp

Type of Contribution.

Original papers, letters to the Editor and review articles are welcomed. All manuscripts must be typed in English and must not be in submission or have been or be published in any other journal. The entire manuscript text should be typed double spaced, including the abstract, footnotes, references, legends and tables, with 3-cm margins. Any changes should not be included in the manuscript file (as tracked changes).

Authors must submit an article submission checklist with their manuscript:

- 1 Full Length Article
- 1 Review Article
- 1 Letter to the Editor

Original Papers.

Basic and clinical scientific studies should be organized as follows: Title Page (including the name of the corresponding author and their e-mail address), Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Legends, Tables and Figures. All pages should be numbered consecutively starting with the title page as page one. Trade names must have an initial capital; the trivial name for a compound may be used if the formal, chemical name (as established by international convention) is given after the first use.

Letters to the Editor.

These will report original data or may discuss published articles. Submission requirements for Letters to the Editor are the same as for regular manuscripts. Letters must be less than 1000 words in length, and cannot include more than 10 references and two figures (including tables). A single Figure or Table can be made but should contain no more than 8 separate panels labeled from (a) to (h). One panel may be composed of multiple figures with

annotation around individual panels to make viewing easier. An abstract and subheadings should not be included in letters to the editor.

Comments may be solicited from authors if the letter refers to a particular article in the journal. Letters that report original data will be reviewed. All letters to the Editor are subject to editing and possible abridgement. Letters to the Editor will be included in the Medline database.

Review Articles.

A specific field is reviewed through classical and up-dated literature. Review articles are usually invited: however, submitted review articles will be considered. Review articles should not exceed 3750 words, 5 figures and contain no more than 50 references, except in exceptional circumstances. An abstract is required.

Title page.

List the title of the paper, authors' names, department and name of institution of origin, city and country. Include an address to which proofs and reprint requests should be mailed. Author's names should be written such that the last name follows the first name. For original papers please include a short or running title of no more than 75 characters (including spaces). Letters to the Editor should be clearly marked as such on this page.

Structured abstracts.

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in shortened form. Abstracts should be no longer than 250 words. In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Background; (2) Objective; (3) Methods; (4) Results; (5) Conclusion

Author comments to the Editor.

Authors should enter their comments to the Editor on the EES website, including the following information: 1) The manuscript has not been submitted for publication elsewhere. 2) All authors have significantly contributed to the manuscript and all agree with its contents. 3) Authors do not have any relevant financial interests in the findings from this manuscript.

Footnotes.

Footnotes should be listed consecutively at the bottom of the page on which they appear, and be designated by superscripted numerals.

References.

References should be typed double-spaced on a separate page. They should be individually numbered in the order of appearance in the text. In the text, they should be referred to by these numbers in square brackets. Example: Earlier studies in this laboratory [7 9]. . . When the authors' names are mentioned in the text, list no more than two authors. When three or more authors are listed only the first name followed by "*et al.*" and the reference number. Example: Jones *et al.* [7]. In the reference list, include all authors' names and initials, but in case of six or more authors, list only the first six authors, then use "et al". and these references be typed on a separate page, double spaced and numbered in the order of appearance. Use only abbreviations of journal titles conforming to those adopted by Index Medicus.

Reference Management Software.

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com>) and Reference Manager (<http://www.refman.com>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Journal Abbreviation Source.

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Periodicals.

Should be referenced as follows: [1] Hashimoto K, Matsumoto K, Higashiyama M, Nishida Y, Yoshikawa K: Growth inhibitory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on normal and psoriatic keratinocytes. *Br J Dermatol* 123: 93 98,1993.

Multi-author volumes.

Should be referenced as follows: [1] Hashimoto K, Matsumoto K, Yoshikawa K: The effect of D3 on human keratinocytes and its metabolism. In *the Biology of the Epidermis*. Edited by A Ohkawara, J McGuire. Elsevier Publishers BV, Amsterdam, 1992, pp. 123 131.

Monograph.

Should be referenced as follows: [1] Siegel SS: *Nonparametric Statistics for the Behavior Science*. McGraw-Hill, New York, 1956. References may be made to material "in press" as follows: Jensen CV; *Nature* (in press). Do not include references to personal communications, unpublished data or manuscripts either in preparation or submitted for publication. If essential, such material may be incorporated at the appropriate place in the text. Authors are responsible for bibliographic accuracy.

Tables.

Tables with legends must be typed (double-spaced) on separate sheets. The table number (in Arabic numerals) should be in the order of appearance in the text and a short title must be supplied. Footnotes in the table are designated by superscript a, b, c, etc.

Figures and Legends.

For textural placement all figures should be numbered in the order of appearance. Parts of the figure, such as A, B, etc., should be labeled on the figure. Legends should be submitted on a separate sheet of paper, according to the following example: Fig 1. A short title. A brief explanation may also be given.

Color Figures.

The color reproduction printing costs of figures are free of charge, subject to the Editor's discretion. Please note that only figures for which color printing is essential will be considered. For instructions on production of figure files, please refer to section Artwork instructions

Preparation of Supplementary Data.

Elsevier now accepts electronic supplementary material (e-components) to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect at <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at the Author Gateway at www.elsevier.com/artworkinstructions.

Requirements for clinical research trials.

Human subject studies must have been approved by the authors' Institutional Review Board (IRB) or its equivalent. Authors will be asked to upload their IRB approval during the article submission process.

Ethics.

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent which should be documented in your paper. Patients have a right to privacy. Therefore identifying information, including patients' images, names, initials, or hospital numbers, should not be included in videos, recordings, written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and you have obtained written informed consent for publication in print and electronic form from the patient (or parent, guardian or next of kin where applicable). If such consent is made subject to any conditions, Elsevier must be made aware of all such conditions. Written consents must be provided to Elsevier on request. Even where consent has been given, identifying details should be omitted if they are not essential. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note. If such consent has not been obtained, personal details of patients included in any part of the paper and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Proofs.

These will be sent to the named corresponding author. Where no corresponding author is specified the first named author will receive the proofs. They should be carefully checked and returned by airmail within 2 days of receipt. Only printing errors may be corrected at this proofing stage: no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed at this stage.

Referees.

Authors may suggest 3 referees (full names, addresses, phone and fax numbers must be supplied). You are also allowed to suggest names who you would like to exclude from being a referee. The final choice of referees will be at the discretion of the Editorial Board.

Reprints.

From the 15th of May 2006, JDS will provide authors with free electronic reprints of their article. An Author Reprint Order Form will be sent to the author together with the proofs, enabling hard copy reprints to be ordered at the prices listed on the form. Post acceptance and Copyright transfer. For authors who wish to know more about our copyright policies,

proofreading procedures, and how to purchase offprints, please refer to the section 'Copyright Information' at www.elsevier.com/authors

Author Services.

For queries relating to the general submission of manuscripts (including electronic text and artwork) and the status of accepted manuscripts, please email: authors@elsevier.co.uk or Fax: +44 (0)1865 843905.

Language Editing.

The following individual/s have expressed interest in helping authors of manuscripts submitted to the Journal of Dermatological Science with English editing. Authors may contact these individuals or services directly by mail, phone, fax, or e-mail. All financial arrangements are strictly between the two parties. The Journal of Dermatological Science neither endorses nor recommends any specific individual or service. Professional editing, while often recommended by reviewers, does not ensure acceptance or publication of a manuscript.

Karin Mesches, Ph.D., SciTechEdit International, 7012 East Mountain Brush Circle, Highlands Ranch, CO 80130, USA; fax: 303-773-6660; e-mail: editor@scitechedit.com; Web page: <http://www.scitechedit.com>

Language Polishing

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission, please visit <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor take responsibility for any products, good or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions <http://www.elsevier.com/termsconditions>

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.