



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

WILLIAN HIDEKI CHINEN

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RESOLVINA D5 (RVD5)
SOBRE A CICATRIZAÇÃO EM MODELO MURINO DE
LESÃO CUTÂNEA EM DORSO**

Londrina
2023

WILLIAN HIDEKI CHINEN

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RESOLVINA D5 (RVD5)
SOBRE A CICATRIZAÇÃO EM MODELO MURINO DE
LESÃO CUTÂNEA EM DORSO**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dra. Rubia Casagrande.

Londrina
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de
Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Chinen, Willian Hideki .

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RESOLVINA D5 (RVD5) SOBRE A
CICATRIZAÇÃO EM MODELO MURINO DE LESÃO CUTÂNEA EM DORSO /
Willian Hideki Chinen. - Londrina, 2024.
65 f.

Orientador: Rubia Casagrande.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual
de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Resolvina D5 - Tese. 2. Inflamação - Tese. 3. Cicatrização - Tese. I.
Casagrande, Rubia . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da
Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDU 61

WILLIAN HIDEKI CHINEN

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RESOLVINA D5 (RVD5)
SOBRE A CICATRIZAÇÃO EM MODELO MURINO DE
LESÃO CUTÂNEA EM DORSO**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Rubia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Renata Micheli Matinez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Ana Carla Zarpelon Schutz
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Londrina, 10 de maio de 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Rubia Casagrande por aceitar-me como seu orientado, proporcionando conhecimento científico e auxiliando totalmente no projeto.

Agradeço ao meu pai, minha mãe e minha irmã por terem me apoiado e auxiliado nessa jornada de mestrado, pois sem eles, não teria sido possível a conclusão;

Agradeço aos meus colegas de laboratório do CEPPOS e LPG pela ajuda e ensinamentos.

Agradeço a Soraia Mendes e Patricia R pelo auxílio, ajuda e ensinamentos. Foram momentos cansativos, porém gratificantes ao ter o experimento terminado.

Agradeço aos colegas do LABDOR por toda a paciência e ensinamentos em diversos momentos e o acompanhamento dos resultados.

RESUMO

CHINEN, Willian Hideki. **Avaliação dos efeitos da resolvina D5 (RvD5) sobre a cicatrização em modelo murino de lesão cutânea em dorso**. 2024. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

A pele é o maior órgão do corpo humano. Ela é a principal barreira contra agressores externos. Por ser a principal, ela é susceptível a lesões formando feridas e processos inflamatórios. A má cicatrização é responsável por diversas complicações em pacientes e pelos índices elevados de mortalidade. Nesse contexto, a utilização de um mediador lipídico pró resolutivo resolvina D5 (RvD5) para reduzir o tempo de cicatrização e diminuir os efeitos inflamatórios é promissor. As resolvinas de maneira geral são capazes de inibir a produção de mediadores inflamatórios e mediar a dor causada por processo inflamatório. O objetivo desse estudo foi analisar os efeitos e os mecanismos de ação do mediador lipídico pró-resolutivo RvD5 sobre a cicatrização em modelo murino de lesão cutânea em dorso (LCD). Nesse estudo, foi feita a indução de duas lesões cutâneas no dorso de camundongos hairless e pós tratamento intraperitoneal com RvD5 durante 7 dias. O tratamento com 100pg/ animal de RvD5 acelerou o processo de cicatrização através do fechamento da lesão, manteve-se o número de neutrófilos, diminuiu o infiltrado inflamatório, diminuiu a expressão de mRNA para iL-10, VEGF e FGF. Aumentou a síntese de colágeno, diminuindo metaloproteinases do tipo 2(MMP-2) e do tipo 9(MMP-9) e diminuindo a quantidade de antioxidantes em relação ao grupo não tratado. O presente estudo sugere a RvD5 como uma abordagem terapêutica promissora no tratamento de feridas cutâneas.

Palavras-chave: Cicatrização de feridas; MLPR; RvD5; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

CHINEN, Willian Hideki. **Assessment of the effects of resolvin D5 (RvD5) on healing in a murine model of dorsal skin lesions**. 2024. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

The skin is the largest organ of the human body. It is the main barrier against external aggressors. As it is the main one, it is susceptible to injuries, forming wounds and inflammatory processes. Poor healing is responsible for several complications in patients and high mortality rates. In this context, the use of a pro-resolving lipid mediator reresolvin D5 (RvD5) to reduce healing time and reduce inflammatory effects is promising. Resolvins in general are capable of inhibiting the production of inflammatory mediators and mediating pain caused by an inflammatory process. The objective of this study was to analyze the effects and mechanisms of action of the pro-resolving lipid mediator RvD5 on healing in a murine model of dorsal skin lesion (LCD). In this study, two skin lesions were induced on the back of hairless mice after intraperitoneal treatment with RvD5 for 7 days. Treatment with 100pg/animal of RvD5 accelerated the healing process by closing the lesion, increased the number of neutrophils, decreased the inflammatory infiltrate, and decreased the expression of mRNA for iL-10, VEGF and FGF. It increased collagen synthesis, decreasing metalloproteinases type 2 (MMP-2) and type 9 (MMP-9) and decreasing the amount of antioxidants in relation to the untreated group. The present study suggests RvD5 as a promising therapeutic approach in the treatment of cutaneous wounds.

Key-words: Wound healing; Specialized Pro-resolving Mediators (SPMs); RvD5; oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Escala de tempo típica e fases dos estágios agudos até sua completa cicatrização de feridas em humanos adultos jovens.....	16
Figura 2 – Biossíntese e estruturas de SPM	21
Figura 3 – Molécula de Resolvina D5.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de primers	29
Tabela 2 – Constituintes do gel de separação e do gel de concentração.	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COX	Ciclooxigenase
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FGF	
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase de matriz
MPO	Mieloperoxidase
NAG	N-acetil-glucosamina
NF-κB	Factor nuclear kappa B
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
RvD5	Resolvina D5
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	PELE	14
2.2	FERIDAS	14
2.3	CICATRIZAÇÃO	15
2.4	FASES DA CICATRIZAÇÃO	16
2.4.1	Hemostasia	16
2.4.2	Fase Inflamatória	17
2.4.3	Fase Proliferativa	18
2.4.4	Fase de Remodelamento	19
2.5	TRATAMENTOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA CICATRIZAÇÃO	20
2.6	LIPÍDEOS PRÓ-RESOLUÇÃO	20
2.7	RESOLVINA D5	21
3	JUSTIFICATIVA	23
4	OBJETIVOS	24
4.1	OBJETIVOS GERAIS	24
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5	MATERIAIS E MÉTODOS	25
5.1	MATERIAIS	25
5.1.1	PREPARO DO MEDIADOR LIPÍDICO RvD5	25
5.2	MÉTODOS	25
5.2.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	25
5.2.2	Avaliação da eficácia da RvD5 em camundongos via ip	25
5.2.3	Medida e avaliação do fechamento das lesões	27
5.2.4	Análise hispatológica	27
5.2.5	Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO)	27
5.2.6	RT- Qpcr	28
5.2.7	Zimografia para MMP-2 e MMP-9	29

5.2.8	Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno GSH.....	31
5.2.9	Determinação da atividade antioxidante global pelos ensaios de FRAP e ABTS	32
5.2.10	Análise estatística	32
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6.1	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	35
7	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56
	ANEXOS	60
	ANEXO A – Comitê de Ética no Uso de Animais	61

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior do órgão do corpo humano e desempenha funções como proteção, regulação e sensações. A pele é composta por duas camadas: epiderme, derme (OKTAY,2014). A pele por funcionar como uma barreira, ela está suscetível à lesões por agentes agressores externos que são responsáveis por desencadear várias reações físico-químicas, ativando o sistema imune, liberando mediadores, gerando mudanças estruturais nas células e nos tecidos, consequentemente, promovendo a cicatrização (KOLIMI et al 2022).

As feridas cutâneas são classificadas como feridas agudas, as quais são geralmente curadas dentro de um processo de reparo organizado e apropriado, por meio da capacidade que a própria pele tem em restaurar sua integridade funcional e anatômica através cicatrização ou em feridas crônicas, as quais evoluem de forma inadequada ou deixam de cicatrizar, levando a alteração da função do local (KOLIMI, et al. 2022). Estima-se que as feridas representem quase 3% dos custos totais do sistema de saúde – aproximadamente 5 mil milhões de libras esterlinas anualmente, de acordo com dados do Reino Unido. A maior parte deste custo está relacionada com o tempo de internamento hospitalar e de enfermagem para tratar pacientes em casa ou em clínicas, enquanto materiais como pensos representam uma pequena parte do custo total. Nos EUA, relata-se que mais de US\$ 25 bilhões são gastos anualmente no tratamento de feridas crônicas, (FRYKBERG, BANKS,2015; RUIZ,2022). afetando a qualidade de vida dos pacientes e o aumento da morbimortalidade, estas representam um imenso desafio econômico e social para os sistemas de saúde em todo o mundo (KOLIMI et al, 2022)

O mecanismo de cicatrização de feridas ainda não foi totalmente elucidado e seu tratamento é meticulosamente longo e requer assistência médica especializada. (UCHIDA; BRUSCHI, 2023). Diante disso, é importante a compreensão dos mecanismos de reparo tecidual para o desenvolvimento de novas terapias que atendam demandas específicas, minimize os efeitos adversos presentes em terapias atuais, como a utilização de antibióticos e que acelerem o processo de reparo tecidual, diminuindo o número

A resolução da inflamação é mediada pela síntese local endógena de

mediadores lipídicos pró-resolução (MLPR). Os MLPR compõem uma classe de moléculas derivadas da transformação dos ácidos graxos essenciais. Até o momento foram descritas quatro famílias: as lipoxinas, as resolvinas (série D e E), as protectinas e as maresinas. Estes mediadores apresentam funções analgésicas, anti-inflamatórias e atuam na defesa do hospedeiro contra infecções (SERHAN, et al., 2014).

Na literatura não há evidências do papel da RvD5 na cicatrização de feridas cutâneas, no entanto alguns trabalhos evidenciam a o papel da RvD5 no controle da inflamação na cicatrização. Mas alguns estudos mostraram a inibição da produção de mediadores inflamatórios como a IL-6 e CCL5 em células THP-1. Outro estudo demonstrou a inibição da dor neuropática e inflamatória (LUO et al,2019).

Desta forma, esse trabalho teve como o objetivo avaliar os efeitos do mediador lipídico pró- resolução RvD5 administrado via intraperitoneal no processo de cicatrização em modelo murino de lesão cutânea em dorso (LCD).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Pele

A pele é o maior do órgão do corpo humano e desempenha funções como proteção, regulação e sensações. A pele é composta por duas camadas e o tecido subcutâneo: epiderme, derme e o tecido subcutâneo (OKTAY,2014).

A epiderme é a camada mais externa e, portanto, a principal barreira de proteção do corpo contra os estressores ambientais, como patógenos infecciosos, agentes químicos e a radiação ultravioleta (D'ORAZIO et al., 2013; CHAVKIN; ELLIS,2011), sendo que as principais células presentes são os queratinócitos. Ela é formada por várias subcamadas, sendo: camada córnea, camada granulosa e camada basal. A camada córnea é composta por células mortas e serve como barreira protetora contra o meio ambiente. A camada granulosa é responsável pela produção de queratina, uma proteína que confere resistência à pele. A camada basal é a mais profunda e contém células que se dividem continuamente para formar novas células da pele (LAWTON, 2019).

A derme é localizada entre a epiderme e o tecido subcutâneo, caracterizada por derme papilar e reticular, sendo tecido conjuntivo frouxo na primeira e denso não modelado na segunda. O principal constituinte da derme é o colágeno, uma proteína estrutural fibrilar, que proporciona resistência mecânica a pele (KHAVKIN; ELLIS,2011). Além disso, a derme abriga estruturas cutâneas, incluindo folículos pilosos, nervos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. A derme também é rica em células imunes e fibroblastos, que participam ativamente de muitas respostas fisiológicas da pele (HART et al., 1998a)

O tecido subcutâneo está localizado abaixo da camada reticular da derme e é constituído por um tecido conjuntivo. Geralmente, transforma-se em tecido adiposo subcutâneo. As células adiposas formam uma camada de espessura variável, variando conforme o sexo e do estado nutricional. O tecido adiposo contribui para o isolamento térmico e armazenamento de energia, além de atuar como amortecedor (OKTAY,2014).

A pele por funcionar como uma barreira, ela está suscetível a lesões por agentes agressores externos que são responsáveis por desencadear várias reações físico-químicas, ativando o sistema imune, liberando mediadores, gerando mudanças estruturais nas células e nos tecidos, conseqüentemente, promovendo a cicatrização (KOLIMI et al 2022).

2.2 Feridas

Feridas são ocasionadas pela ruptura da estrutura na pele ou em órgão decorrente de um resultado de trauma ou incisão cirúrgica. O processo de cicatrização de feridas pode ser definido como respostas fisiológicas pelas quais o corpo substitui e restaura a função dos tecidos danificados. Na pele normal, a epiderme e a derme

existem em equilíbrio estável, formando uma barreira protetora contra o meio externo. Danificando a barreira protetora, o processo fisiológico normal de cicatrização da ferida é imediatamente iniciado, sendo um processo dinâmico e complexo que depende de fatores locais e sistêmicos que afetam a saúde do paciente. (NAWAZ; BENTLEY, 2011).

As feridas são podem ser classificadas em dois tipos: feridas agudas e feridas crônicas. As feridas agudas são ocasionadas por vários agentes externos como ferramentas, produtos químicos. Elas também são classificadas pelo seu tamanho e profundidade. Elas possuem um tempo de cicatrização entre 4 a 12 semanas com restauração da integridade funcional e anatômica da pele pelo processo normal e organizado de cicatrização de feridas. As feridas crônicas são lesões classificadas como mais difíceis de cicatrizar decorrente de condições patológicas anteriores, como diabetes, doença autoimune ou estase venosa. Elas demoram mais tempo para cicatrizar, devido a inflamação persistente e uma longa fase inflamatória, levando ao atraso para a cicatrização. Além disso, presença de inflamação anterior, tumor ou a presença de um agente físico, podem causar feridas crônicas. Elas possuem baixa atividade mitogênica devido aos níveis mais elevados de citocinas e proteases, baixa secreção de fatores de crescimento, superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), presença de metaloproteases de matriz e destruição da Matriz Extracelular (MEC) (KOLIMI et al 2022).

Um processo de cicatrização inadequado pode levar a formação de cicatrizes hipertróficas ou queloides que são tipos de cicatrizações anormais, as quais resultam em uma cicatriz elevada e espessa, podendo causar desconforto, coceira e afetar a aparência estética (FERGUSON; O'KANE 2004). Portanto uma cicatrização excessiva devido a um desequilíbrio entre biossíntese e degradação, a qual é mediada por apoptose e degradação da matriz extracelular (MEC), levando a uma fase inflamatória persistente, uma fase de proliferação prolongada e remodelação reduzida, pode gerar cicatrizes hipertróficas, quando não se estendem além da área da lesão, ou a queloides, que são uma forma mais grave de cicatrização anormal, na qual o tecido cicatricial se estende além dos limites da ferida original, podendo ser mais dolorosas e pruriginosas do que as cicatrizes hipertróficas (TOTTOLI et al. 2020)

2.3 Cicatrização

O processo normal de cicatrização de feridas é bem orquestrado e regulado que consiste em uma série de eventos (Figura 1) como hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento da MEC (CHOUHAN et al., 2019).

A modulação da resposta do organismo ao trauma é afetada pela extensão do dano celular, tipo de tecido afetado e intensidade de lesão. A cicatrização envolve elementos celulares e humorais que são atraídos para a lesão de acordo com a

necessidade em cada momento, e é dividida em etapas. Ela ocorre em uma sequência, o qual ocorrem vários eventos concomitantemente, resultando na cicatrização- completo preenchimento com tecido fibroso cicatricial e cobertura epitelial, promovendo estabilidade estrutural e recuperação parcial da função.

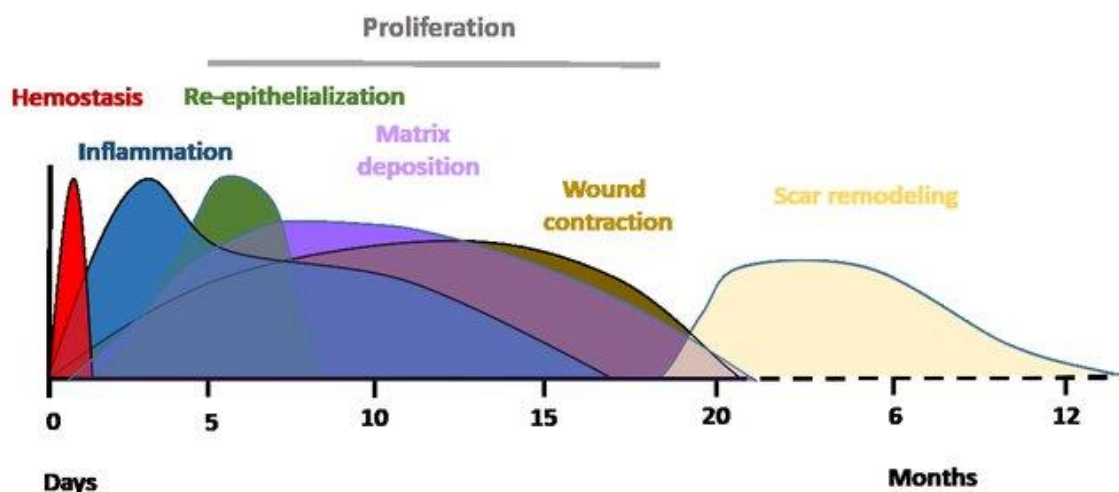


Figura 1: Escala de tempo típica e fases dos estágios agudos até sua completa cicatrização de feridas em humanos adultos jovens (El Mohtadi et al. 2021)

2.4 Fases da cicatrização

2.4.1 Hemostasia

A hemostasia ocorre imediatamente após uma lesão. Para prevenir o sangramento, ocorre concomitantemente a vasoconstrição e as plaquetas sofrem ativação, adesão e agregação no local da lesão. A vaso constrição ocorre a ação da endotelina, a qual é liberada pelas células endoteliais danificadas, em conjunto com o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), as catecolaminas, como a adrenalina e noradrenalina, as prostaglandinas liberadas pelas células lesionadas, bradicinina, fibrinopeptídios, serotonina e tromboxano (RODRIGUES et. al. 2019). As plaquetas são ativadas quando expostas ao colágeno extravascular (como o colágeno tipo IV), que detectam por meio de receptores específicos de integrina, receptores de superfície celular que medeiam as interações de uma célula com a matriz extracelular. Uma vez em contato com o colágeno, as plaquetas liberam mediadores solúveis

(fatores de crescimento e AMP cíclico) e glicoproteínas adesivas, que sinalizam para que se tornem pegajosas e agregadas. As principais glicoproteínas liberadas pelos grânulos alfa das plaquetas incluem fibrinogênio, fibronectina, trombospondina e fator de von Willebrand. À medida que a agregação plaquetária prossegue, os fatores de coagulação são liberados, resultando na deposição de um coágulo de fibrina no local da lesão. O coágulo de fibrina serve como matriz provisória. As plaquetas agregadas ficam presas na teia de fibrina e constituem a maior parte do coágulo. Suas membranas fornecem uma superfície na qual as proteases das enzimas de coagulação inativas se ligam, são ativadas e aceleram a cascata de coagulação (Schultz et al.2011). Além disso, as plaquetas, , liberam fatores de crescimento como PDGF, fator de crescimento transformador beta ($TGF-\beta$), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e citocinas, mais intensamente nas primeiras horas após a lesão, mas continuam a secretar esses mediadores por até 7 dias (RODRIGUES et al.,2019)

2.4.2 Fase inflamatória

A fase inflamatória ocorre após a hemostasia da ferida, no período das primeiras 24 horas após a lesão, podendo durar até 2 semanas em feridas normais. Os mastócitos liberam grânulos cheios de enzimas, histamina e outras amins ativas, que são responsáveis pelos sinais característicos de inflamação, rubor, calor, tumor e dor ao redor do local da ferida. Neutrófilos, monócitos e macrófagos são as células-chave durante a fase inflamatória. Eles limpam a ferida de infecções e detritos e liberam mediadores solúveis, como citocinas pró-inflamatórias (incluindo IL-1, IL-6, IL-8 e $TNF-\alpha$) e fatores de crescimento (como PDGF, $TGF-\beta$, $TGF-\alpha$, IGF-1 e FGF) que estão envolvidos no recrutamento e ativação de fibroblastos e células epiteliais na preparação para a próxima fase da cicatrização.(LANDÉN et al., 2016).

Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a responder aos mediadores solúveis liberados pelas plaquetas e pela cascata de coagulação. Eles servem como a primeira linha de defesa contra infecções, fagocitando e eliminando bactérias, além de remover materiais estranhos e tecidos desvitalizados. Durante o processo de extravasamento de células inflamatórias para uma ferida, ocorrem interações importantes entre moléculas de adesão (selectinas, moléculas de adesão celular (CAMs) e caderinas) e receptores (integrinas) que estão associados às membranas plasmáticas dos leucócitos circulantes e das células endoteliais vasculares. Inicialmente, os leucócitos aderem fracamente às paredes das células endoteliais através de suas moléculas de selectina, o que faz com que eles desacelerem e comecem a rolar na superfície das células endoteliais. Enquanto rolam, os leucócitos podem ser ativados por quimioatraentes (citocinas, fatores de

crescimento ou produtos bacterianos). Após a ativação, os leucócitos aderem firmemente às células endoteliais como resultado da ligação entre seus receptores de integrina e ligantes como VCAM e ICAM que são expressos em células endoteliais ativadas. Os sinais quimiotáticos presentes fora da vênula induzem os leucócitos a se comprimirem entre as células endoteliais da vênula e a migrarem para o tecido ferido usando seus receptores de integrina para reconhecer e se ligar aos componentes da matriz extracelular. As células inflamatórias liberam elastase e colagenase para ajudá-las a migrar através da membrana basal das células endoteliais e a migrar para a matriz extracelular (MEC) no local da ferida. Os neutrófilos também produzem e liberam mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-1, que recrutam e ativam ainda mais fibroblastos e células epiteliais. Depois que os neutrófilos migram para o local da ferida, eles geram radicais livres de oxigênio, que matam as bactérias fagocitadas, e liberam altos níveis de proteases (elastase de neutrófilos e colagenase de neutrófilos) que removem componentes da matriz extracelular que foram danificados pela lesão. A presença persistente de bactérias numa ferida pode contribuir para a cronicidade através do recrutamento contínuo de neutrófilos e da sua liberação de proteases, citocinas e espécies reativas de oxigênio. Geralmente os neutrófilos são esgotados na ferida após 2 a 3 dias pelo processo de apoptose e são substituídos por monócitos teciduais. (SCHULTZ et al.2011).

Os macrófagos classicamente ativados são induzidos por estímulos pró-inflamatórios, como LPS e interferon-gama (IFN- γ), e promovem a inflamação pela liberação de ERO, citocinas inflamatórias (por exemplo, IL-1, IL-6 e TNF- α) e fatores de crescimento (por exemplo, fator de crescimento endotelial vascular, VEGF e PDGF). Esses macrófagos fagocitam neutrófilos apoptóticos, substituindo-os como principal mediador inflamatório. Os estágios posteriores da inflamação são caracterizados por uma transição para a ativação alternativa, que ocorre através da neodiferenciação de monócitos recentemente recrutados, ou através da mudança de macrófagos existentes *in situ* para um fenótipo anti-inflamatório. Essa mudança fenotípica pode ser estimulada por citocinas, como também fatores de transcrição e moduladores de receptores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. (WILKINSON, HARDMAN,2020)

[

2.4.3 Fase proliferativa

A fase proliferativa ocorre com a substituição da matriz provisória de fibrina por uma nova matriz de fibras de colágeno, proteoglicanos e fibronectina para restaurar a estrutura e função do tecido. Ela é a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa. Essa etapa envolve a proliferação e migração coordenada de células epiteliais, dérmicas, vasculares e nervosas. (Schultz et al.2011). Esse processo é regulado por fatores de crescimento que possibilita a alteração na adesão celular, permitindo que as células se desprendam da membrana basal e das células vizinhas, avançando em direção a ferida. (RODRIGUES et al., 2019). Esse processo de proliferação é autorregulado por mediadores como óxido nítrico, citocinas e fatores de

crescimento, incluindo o EGF, FGF, NGF, VEGF e IGF-1.(LANDÉN ET AL., 2016)

Os fibroblastos migram para dentro da ferida em resposta a múltiplos mediadores solúveis liberados inicialmente pelas plaquetas e posteriormente pelos macrófagos. A migração de fibroblastos na matriz extracelular depende do reconhecimento preciso e da interação com componentes específicos da matriz. Os fibroblastos na derme normal são tipicamente quiescentes e esparsamente distribuídos, enquanto na matriz provisória do local da ferida e no tecido de granulação são bastante ativos e numerosos. A sua migração e acumulação no local da ferida exige que alterem a sua morfologia e produzam e secretem proteases para abrir caminho para o seu movimento da MEC para o local da ferida(Schultz et al.2011).

Os fibroblastos têm uma variedade de funções durante a cicatrização de feridas. Eles são recrutados para a deposição e reorganização da MEC, produzem fatores de crescimento e citocinas, imuno modulam e contraem a ferida. Durante esse processo, eles secretam MMPs para degradar a matriz provisória, enquanto produzem diversos componentes da MEC, incluindo colágeno, elastina, glicoproteínas, proteoglicanos, fibronectina e ácido hialurônico. Gradualmente, a MEC é substituída pelo tecido de granulação, que é composto por uma rede frouxa formada pelos produtos dos fibroblastos, macrófagos e vasos sanguíneos neoformados. Esse tecido é edemaciado, friável e facilmente rompido. Conforme os fibroblastos proliferam, tornam-se as células predominantes durante a substituição do tecido de granulação pelo tecido cicatricial, aumentando a síntese de colágeno até a formação de um tecido conjuntivo mais resistente. Os fibroblastos das margens da lesão, por ação do TGF-1, passam a expressar actina (smooth muscle actin – SMA) e tornam-se miofibroblastos, com ação contrátil semelhante à musculatura lisa. Eles se ligam às fibrilas colágenas e de fibronectina e as tracionam para a posição perpendicular à borda, causando a contração da ferida com o objetivo de aproximar as bordas. Embora continuem a sintetizar MMPs e seus respectivos inibidores, os miofibroblastos são células transitórias e serão eliminados da ferida por apoptose uma vez que a integridade tecidual tenha sido suficientemente recuperada (POTEKAEV et al, 2021).

Os macrófagos atingem o pico de infiltração da ferida 72 h após a lesão em camundongos (BAUM; ARPEY, 2005), exercem a eferocitose, removendo os neutrófilos indicando o início da resolução da inflamação. Esse evento estimula a mudança de fenótipo para anti-inflamatório com ação resolutive (LANDÉN et al., 2016). São células predominantes na ferida neste momento e atuam também no estímulo à angiogênese, proliferação de fibroblastos e deposição de MEC, através da produção de IL-10 e fatores de crescimento, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), TGFβ e IGF1. Eles também atuam na produção de MLPR, como as maresinas (MaRs), resolvinas (Rvs) e protectinas (LEONI et al., 2015).

2.4.4 Fase de remodelamento

A remodelação é a fase final do processo de cicatrização na qual o tecido de granulação amadurece em cicatriz e a resistência à tração do tecido aumenta,

semelhante ao tecido original (LADÉN,2016) A maturação do tecido de granulação também envolve uma redução no número de capilares através da agregação em vasos maiores e uma diminuição na quantidade de glicosaminoglicanos e da água associada aos glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos. A densidade celular e a atividade metabólica no tecido de granulação diminuem durante a maturação. Também ocorrem alterações no tipo, quantidade e organização do colágeno, o que aumenta a resistência à tração (Schultz et al.2011). Inicialmente, o colágeno tipo III foi sintetizado em níveis elevados, mas ocorre a reconstituição do tecido conjuntivo por tecido cicatricial, lise do colágeno tipo III e a síntese do colágeno tipo I (TOTTOLI et al. 2020). Os miofibroblastos provocam a contração da ferida devido à sua forte adesão ao colágeno, auxiliando na cicatrização da ferida. Além disso, os processos antigênicos e o fluxo sanguíneo no leito da ferida diminuem, a actividade metabólica aguda da ferida abrande e eventualmente para, levando à formação de cicatrizes maduras. A formação de cicatrizes é o ponto final fisiológico do reparo de feridas em mamíferos. (TOTTOLI et al. 2020, FERGUNSON,2004)

2.5 Tratamentos descritos na cicatrização de feridas cutâneas

As práticas convencionais de tratamento de feridas incluem vários procedimentos cirúrgicos, terapias não cirúrgicas e regimes de tratamento baseados em agentes farmacológicos para reparo de feridas na pele. O procedimento de tratamento cirúrgico para cicatrização de feridas inclui desbridamento, enxertos de pele e retalhos cutâneos, enquanto as terapias não cirúrgicas incluem formulações tópicas, curativos para feridas e substitutos de pele. Apesar dos avanços no desenvolvimento de diversos tratamentos, a avaliação clínica e o manejo de feridas crônicas continuam sendo um desafio (KOLMI et al. 2022).

Atualmente, o foco do tratamento das feridas vai além de facilitar a resolução da lesão, restaurar a integridade e a função da pele, é necessário que isso ocorra rapidamente e que minimize os impactos sociais e estéticos. As estratégias inovadoras para cicatrização de feridas são: curativos responsivos a estímulos, terapia baseada em fatores de crescimento, engenharia de tecidos da pele, substitutos da pele humana produzidos por bioengenharia, terapia genética, nanoterapêutica e terapia com células-tronco. Além disso, com o avanço de tecnologias, novas terapias como bioimpressão 3D, terapia com plasma rico em plaquetas (PRP) e as abordagens baseadas em ECM abriram caminho para a cicatrização personalizada de feridas (KOLMI et al. 2022;).

2.6 Lipídios pró resolução

O processo de resolução da inflamação, antes considerado um processo passivo, decorrente da ativação e mediadores inflamatórios, com a identificação dos MLPR, é conhecida atualmente como um processo ativo que promove a restauração

da homeostasia, através de mediadores lipídicos, conhecidos como mediadores lipídicos pró-resolução especializados (MLPR). (FATTORI et al., 2020).

Os MLPR são biossintetizados (Figura 3) ativamente a partir do ácido araquidônico (AA) e das moléculas de ácidos graxos ômega-3, como o ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA). Os MLPRs contribuem para a resolução da inflamação, bloqueando a infiltração de neutrófilos e alterando o fenótipo dos macrófagos de M1 para M2. Para promover a indução da resolução da inflamação e a regeneração tecidual, a administração exógena de diferentes MLPR regula negativamente as citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

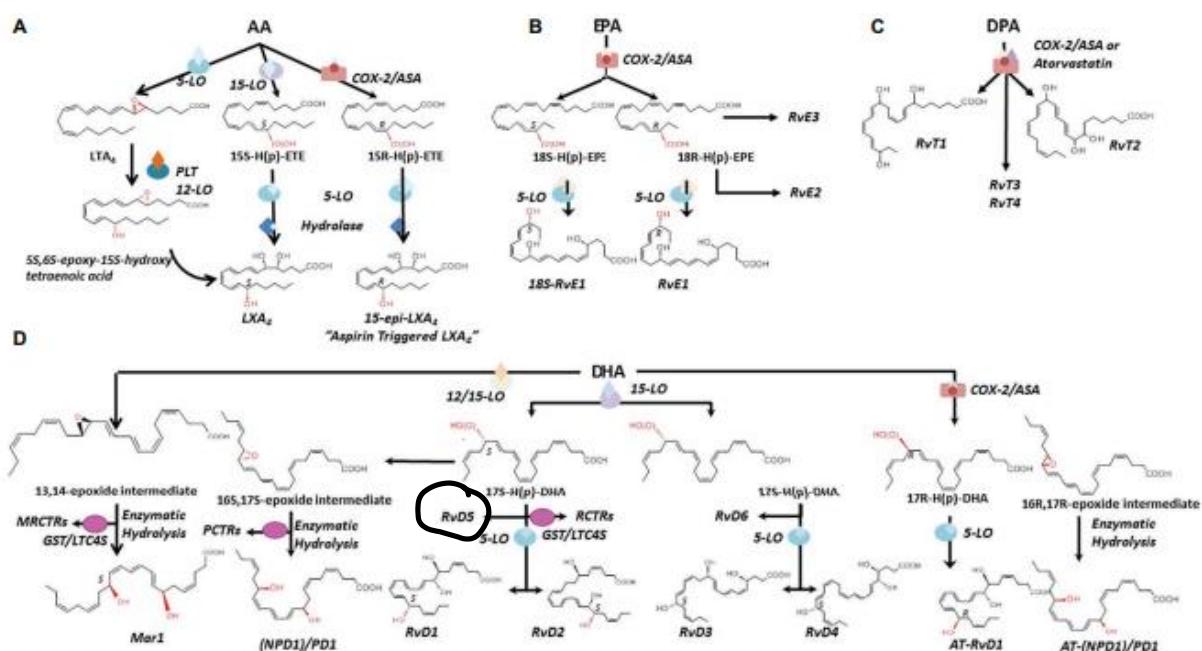


Figura 2: Biossíntese e estruturas de SPM (RECCHIUTI, MATTOSCO, ISOPI, 2019).

Os MLPR são ativos em doses de picogramas a nanogramas e têm ações variadas que promovem o controle da inflamação, encurtam o intervalo de tempo para resolução, promovendo a cura e aliviando sintomas inflamatórios, como a dor (DUVALL; LEVY, 2016). Trabalhos indicam que a produção de MLPR é alterada e frequentemente diminuída nos tecidos afetados e na circulação em um espectro de doenças inflamatórias crônicas (SERHAN; LEVY, 2018)

2.7 Resolvin D5

A Resolvin D5 (RvD5) -figura 2- é um metabólito do ácido docosahexaenóico com atividade anti-inflamatória que ainda não foi completamente investigada devido à sua baixa disponibilidade biológica. Uma rota sintética para RvD5 opticamente ativo foi desenvolvida através da montagem do aldeído C1-C10, do sal de fosfônio C11-C13 e dos blocos de construção do aldeído C14-C22. (OGAWA et al., 2017)

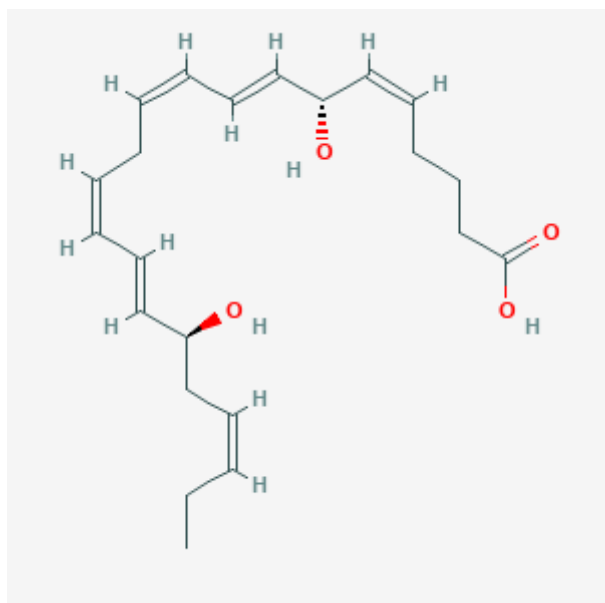


Figura 3: Molécula de Resolvin D5 (National Center for Biotechnology Information ,2024).

A RvD5 produz suas ações benéficas por meio de receptores específicos acoplados a proteína G, como o GPR32. Além disso, receptores específicos adicionais para RvD5 podem existir em células imunes (por exemplo, macrófagos) que medeiam a redução da dor induzida por processo inflamatório. Notadamente, a RvD5 é uma importante resolvin produzida por macrófagos M2 humanos (LUO et al., 2019; WERZ et al., 2018). O estudo mostrou que a RvD5 foi capaz de inibir a produção induzida por LPS nas células THP-1 de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6 e enzimas induzíveis como a ciclooxigenase (COX-2 em monócitos e macrófagos, modulados via ativação do fator de transcrição NF- κ B. (CHUN et al., 2020).

A Resolvin D5 inibiu a fosforilação de ERK estimulada por LPS e a translocação de p65 e p50 para o núcleo, resultando na inibição da produção de IL-6 e CCL5, indicando que exerce efeitos anti-inflamatórios em células THP-1 tratadas com LPS, regulando a fosforilação de ERK e a translocação nuclear de NF- κ B. (CHUN et al. 2020). Outros estudos mostraram a RvD5 inibindo a dor neuropática e inflamatória em camundongos (LUO,2019)

Outro estudo constatou que a RvD5 acelerou a resolução da infecção, pois aumentou a fagocitose de *E. coli* por neutrófilos polimorfonucleares humanos (PMN) e macrófagos pela ativação do receptor GPR32, além de contra-regular os genes pró-inflamatórios, incluindo NF- κ B e TNF- α (CHIANG et al., 2012). Além disso, Cardoso et al constatou a redução de danos renais causados por endotoxemia de LPS (CARDOSO et al, 2022)

3 JUSTIFICATIVA

Considerando que a má cicatrização de feridas é responsável por diversas complicações resultando em elevados índices de mortalidade, sendo que esse agravante aumenta significativamente em pacientes portadores de diabetes mellitus.

Considerando que as feridas crônicas tem em impacto na qualidade de vida, apresentando custos na gestão de infecções, sendo feridas cirúrgicas ou úlceras diabéticas. (SEM,2021) e o gasto no sistema de saúde é estimado de 6,41 bilhões de dólares e afeta pelo menos 3% da população mundial (QUENN, HARDING, 2023)

Considerando que o processo de cicatrização é complexo e a compreensão sobre tal ainda não é completamente conhecida, com isso, a busca e testes sobre novos compostos cicatrizantes é constante (SEN et al. 2009; SEN, 2009; SINGER & CLARK, 1999).

Considerando que a RvD5 induz um fenótipo de macrófago que mantém a atividade microbicida, não causa aumento da inflamação e ainda induz a regeneração. E que para o reparo tecidual em feridas cutâneas são necessários princípios ativos que reduzam a inflamação e previnam infecções, uma vez que estas prolongam o processo de reparo tecidual e dependendo da sua extensão podem ocasionar infecções sistêmicas levando à sepse, justificamos a seleção da RvD5 como mediador lipídico anti-inflamatório e pró-resolução para o desenvolvimento desse estudo.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Avaliar os mecanismos de ação e efeitos do mediador lipídico RvD5 sobre a cicatrização em modelo murino de lesão cutânea em dorso (LCD).

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a dose-resposta da RvD5 no processo de cicatrização em modelo de LCD;
- Avaliar o infiltrado inflamatório e a concentração de mieloperoxidase (MPO)
- Avaliar o efeito da RvD5 na expressão de RNAm para, IL-10, VEGF e FGF por reação em cadeia de polimerase quantitativa (RT-qPCR) em modelo de LCD;
- Quantificar a quantidade de colágeno e os níveis de metaloproteínas tipo 2 e tipo 9
- Investigar o efeito da RvD5 sobre os parâmetros de estresse oxidativo, como: níveis de glutatona reduzida (GSH) submetidos a indução da LCD, FRAP e ABTS.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

5.1.1 Preparo do mediador lipídico RvD5

O mediador lipídico RvD5 (pureza maior que 95%) foi disponibilizado comercialmente pela Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA.

Alíquotas de solução de RvD5 foi preparada em etanol absoluto e armazenada em -80°C até o uso. No dia dos experimentos, alíquotas da solução de RvD5 foram dissolvidas em salina para que 100 μL (quantidade usada para aplicação intraperitoneal) contivessem 10pg ou 30pg ou 100pg.

5.2 Métodos

5.2.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos sem pelo da linhagem HRS/J, dos sexos masculino e feminino, adultos, pesando em média 25g. Os camundongos foram mantidos no Biotério do Centro de Ciências da Saúde/UEL onde foi utilizado ciclo claro/escuro (12/12 h) com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e livre acesso a água e ração. Os animais estavam em gaiolas de polipropileno padrão medindo 30 x 19,5 x 13 cm (Insight®) e foram adaptados aos ambientes e condições experimentais com pelo menos 1 hora de antecedência em relação ao experimento. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina e os experimentos foram realizados segundo suas normas (Protocolo CEUA no. 15654.2019.33).

5.2.2 Avaliação da eficácia da RvD5 em camundongos via intraperitoneal

Primeiramente foi feito a avaliação da dose resposta da RvD5. Para isso, os camundongos Hairless foram colocados aleatoriamente em seis grupos contendo 6 animais em cada grupo sendo:

- Grupo sham: sem lesão e sem tratamento
- Grupo Lesão: lesão e tratado com salina
- Grupo 10pg: lesão e tratado com 10pg/ animal de RvD5
- Grupo 30pg: lesão e tratado com 30pg/ animal de RvD5
- Grupo100pg: lesão e tratado com 100pg/ animal de RvD5

Os animais foram tratados com diclofenaco de sódio (8mg/kg, via oral), antes da indução da LCD e 12h após. A anestesia foi realizada com a combinação de cetamina/xilazina (80mg/kg e 10mg/kg, respectivamente), em seguida a LCD foi realizada com o auxílio de um punch de biópsia circular com 5 mm de diâmetro (com área total de 0,1963cm²). Os animais foram tratados diariamente com a RvD5, via intraperitoneal, conforme a dose de tratamento de cada grupo ou com o veículo salina, no caso do grupo com a lesão sem tratamento, durante 7 dias. A dose de RvD5 (100 pg/animal) foi utilizada para os experimentos seguintes baseada na sua melhor resposta na avaliação do fechamento das lesões.

Para os estudos subsequentes, os grupos variaram de 6 a 8 animais e eventualmente continham o grupo sham, sem lesão e sem tratamento, apenas com a administração do diclofenaco de sódio no primeiro dia antes de induzir e 12 horas após a lesão. Nos dias subsequentes era feita a administração entre os 3 grupos, sham, lesão sem tratamento e lesão tratados diariamente com RvD5 100 pg/animal do segundo dia ao oitavo dia, totalizando 7 dias de tratamento. Quando o grupo sham não exercia influência na análise dos dados para as análises histopatológicas, onde não havia alteração na pele, comparou-se apenas os animais lesionados sem tratamento e tratados diariamente com RvD5 100 pg/animal. Para cada experimento, os animais foram anestesiados e eutanasiados (isoflurano 5% seguido de decapitação), a pele foi coletada com punch de biópsia de 6 mm e processada de acordo com protocolo de cada análise.

5.2.3 Medida e avaliação do fechamento das lesões

As lesões foram fotografadas e medidas no camundongo com o auxílio de um escalímetro no momento da indução da lesão e 7 dias depois, antes da coleta das amostras. Foram feitas duas medidas utilizando o diâmetro da lesão, uma vertical e uma horizontal da lesão e analisadas individualmente, utilizando a média entre essas duas lesões em centímetros

5.2.4 Análise histopatológica

As amostras de pele foram coletadas e fixadas em formaldeído (10%) por 24 h em seguida foram processadas para inclusão em parafina. Seções longitudinais (5 μ m) foram preparadas e coradas pelo tricômio de Masson e HE. As imagens das seções histológicas foram adquiridas digitalmente e analisadas por um experimentador cego ao tratamento utilizando um microscópio de luz na objetiva de 10x (Olympus CX31RTSF, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital de alta-resolução. As análises de colágeno foram realizadas através do software ImageJ 1.53 para Windows (software em domínio público: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) usando a ferramenta threshold e executadas em imagens RGB sem tratamento adicional. O colágeno foi determinado pela intensidade de marcação por % de área demarcada e

5.2.5 Avaliação da atividade de Mieloperoxidase (MPO)

A MPO é uma das principais enzimas presentes nos grânulos dos neutrófilos. O método baseia-se na oxidação catalisada pela MPO do substrato o-dianisidina com detecção espectrofotométrica em 450nm (XIA; ZWEIER, 1997). O ensaio para dosagem da MPO permite inferir indiretamente o número de neutrófilos presentes no local.

As amostras de pele foram coletadas em microtubos e mantidas a - 80 °C até

o momento da realização do ensaio, quando foram diluídas com tampão de fosfato de potássio (K_2HPO_4) (pH 6,0), contendo 0,5% brometo de hexadecil trimetil amônio (HTAB) e homogeneizadas com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370). O homogenato foi centrifugado por 2 minutos a 16.100g em temperatura de 4°C e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Em microplacas de 96 poços foram depositados 30 μ L do sobrenadante e 200 μ L de solução tampão de fosfato 50 mM em pH 6,0, contendo 0,167 mg/ml de dihidroclorato de o-dianisidina e 0,015% de peróxido de hidrogênio. A curva padrão foi preparada na mesma placa, colocando 100 μ L de tampão fosfato 0,05 M e solução com 800.000 neutrófilos no primeiro poço (A1), fazendo a diluição seriada até o décimo primeiro poço (A11). No décimo segundo poço (A12) foi depositado apenas 200 μ L de água deionizada, sendo utilizado como controle negativo (branco). Após 20 minutos a reação colorimétrica foi determinada em espectrofotômetro a 450 nm (Spectra MAX 3 250, Molecular Devices) e a atividade da MPO das amostras comparada com a curva padrão. Os resultados foram apresentados como número de neutrófilos $\times 10^4$ /mg por pele.

5.2.6 RT- Qpcr

As amostras de pele foram coletadas no 7° dia após a indução da lesão, trituradas com nitrogênio líquido em reagente TRIzol® (Life Technologies) com o auxílio de um pistilo e homogeneizadas, o RNAm total foi isolado de acordo com as instruções do fabricante. A pureza do RNA foi confirmada pela razão 260/280 (VERRI, 2008). Todas as reações foram realizadas em triplicatas utilizando as seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 60 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O RT-PCR e PCR quantitativo foram realizados usando GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega) em um StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). A Tabela 1 apresenta as sequências dos primers. Foi verificado previamente que alguns genes que são utilizados como controle para a reação de PCR têm sua expressão alterada na ferida cutânea (TURABELIDZE et al., 2010). Nós não conhecemos um gene que possa ser utilizado sozinho como controle de expressão normal no modelo de ferida cutânea. Para minimizar esta dificuldade, utilizamos a média geométrica de três genes controles sem

o grupo controle negativo de tecido normal, porque os genes controles usuais são alterados no grupo ferida cutânea em relação ao grupo controle negativo de tecido normal. Esses 3 genes (GAPDH, TUB α e TBP) foram recomendados após análise de expressão em modelo de ferida cutânea (KARNAM et al., 2020; TURABELIDZE et al., 2010).

Tabela 1. Sequência dos primers.

Gene	Primer sense	Primer antisense
IL-10	CAGTGCCCAACTGAGAATTTGG	ACTACTAAGGCTTCTTGGGAA
VEGF	GCACATAGAGAGAATGAGCTTCC	CTCCGCTCTGAACAAGGC T
FGF	GGCGTGGACAGTGGACTCTACCTC	TTCCCATCCAAGCCTCCATCATAC
TUB α	TGGAACCCACAGTCATTGATGA	TGATCTCCTTGCCAATGGTGTA
TBP	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC
GAPDH	GCCATCAACGACCCCTTCATTG	TGCCAGTGAGCTTCCCGTTC

5.2.7 Zimografia para MMP-2 e MMP-9,

Para avaliação da atividade da MMP-9, foi utilizada a técnica de zimografia em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS), método utilizado para detecção de proteases. A análise detecta enzimas que degradam a gelatina presente no gel (FONSECA et al., 2011^a; KIM et al., 2007).

Foi feito um *pool* das amostras de pele de cada grupo e armazenadas em eppendorfs. As amostras foram homogeneizadas com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370), na proporção 1:4 em tampão fosfato Tris/HCl 50mM (pH 7,4) com cloreto de cálcio (CaCl₂) e 1% de inibidores de proteinases (fenantrolina, fluoreto de fenilmetilsulfonila e N-etilmaleimida).

Os homogenatos foram centrifugados duas vezes a 12.000 *g* por 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram submetidos ao ensaio de zimografia. Alíquota de 50 µL do sobrenadante foi diluída em 10 µL de tampão Tris/HCl (pH 6,8) contendo 20% de glicerol, 4% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,001% de azul de bromofenol. Em seguida estas amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C durante 8 minutos imediatamente antes de ser aplicada no gel de eletroforese. A espessura do gel utilizado foi de 1 mm, composto por um gel de separação e um gel de concentração, preparado conforme Tabela 2.

Tabela 2: Constituintes do gel de separação e do gel de concentração.

Substância	Quantidade (µL)	
	Gel de separação	Gel de concentração
Água miliQ	5870	4060
Tampão Tris/HCl 1 M (pH 8,8) com 0,4% SDS	3750	-
Tampão Tris/HCl 0,5 M (pH 6,8) com 0,4% SDS	-	1670
Acrilamida: bis-acrilamida (30:0,8)	5000	860
Gelatina 10%	375	-
Persulfato de amônio 10%	50	33
Temed 20%	10	6,6
N-butanol	150	-

Após a finalização da solução do gel de separação e de concentração, os mesmos foram aplicados no aparato específico do sistema de eletroforese mini vertical (Bio-RAD®).

O interior da cuba de eletroforese foi preenchido com tampão Tris/glicina 190 mM (pH 8.3) contendo 0,1% de SDS. Em seguida, foram aplicados 20 µL de cada amostra. Durante a eletroforese a corrente aplicada foi de 10 mA para o gel de concentração e 13 mA para o gel de separação, sendo que a última corrente foi mantida constante por 15 minutos após a saída do corante do gel de separação.

Ao término da eletroforese o gel de poliacrilamida foi lavado por 1 hora com solução de Triton X-100 2% sob constante agitação, posteriormente o gel foi incubado por 16 horas a 37 °C em tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7,4) contendo CaCl₂ 10 mM. 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 miliQ. Para visualização das bandas o gel foi descorado com ácido acético 20% . A atividade proteolítica foi analisada por meio da comparação das diferenças de densidades de cor entre as bandas de cada grupo pelo programa ImageJ® (NIH, Bethesda, MD, USA).

5.2.8 Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno GSH

O GSH desempenha um papel importante na proteção de células da pele contra o dano oxidativo. O dano induzido pela radiação UVB é medido pelo aumento da geração de EROS que resultam no estresse oxidativo que, por sua vez, levam a depleção de antioxidantes endógenos. A perda de viabilidade celular mediada pela radiação UVB está associada a uma diminuição acentuada do conteúdo de GSH que pode predispor a célula a uma defesa menor contra o estresse oxidativo (HALLIWELL, 2009; ZAID et al., 2007).

As amostras de pele (aproximadamente 0,1g) foram diluídas (1:4) em EDTA 0,02M e trituradas utilizando o Tissue-Tearor (Biospec 985370). Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 50% na proporção de 1:0,2 de EDTA e TCA, respectivamente. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 2.700 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e recentrifugado a 2.700 g por mais 15 minutos a 4°C. O sobrenadante final foi retirado para análise. Para o ensaio, foram utilizados 50 µl do sobrenadante da amostra, 100 µl de tampão Tris 0,4 M pH 8,9 e 5µl de uma solução de 1,9 mg/mL de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) em metanol. A absorvância foi determinada em espectrofotômetro (EnSpire, Perkin Elmer) após 5 minutos de incubação, em 405 nm. A curva padrão foi preparada com 0 a 150 µM de

GSH. Os resultados foram expressos em μM de GSH/mg de pele.

5.2.9 Determinação da atividade antioxidante global pelos ensaios de FRAP E ABTS

A atividade antioxidante global da amostra foi determinada por dois diferentes métodos: 1) Determinação da atividade doadora de elétrons ao radical ABTS; 2) determinação do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP).

As amostras de pele dos animais foram homogeneizadas com o triturador Tissue-Tearor, Biospec em 400 μL de KCl (1,15%) e, logo após, centrifugadas a 1.000g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado para a análise. Para o FRAP foram utilizados 30 μL do sobrenadante das amostras e 150 μL do reagente FRAP preparado previamente (2,5 mL de uma solução 10 mM de 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ) em HCl 40 mM, 2,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH 3.6) incubada a 37 °C por 30 min). A leitura foi realizada em espectrofotometro a 595 nm.

Para a reação de ABTS, foi utilizado 7 μL do sobrenadante das amostras e 200 μL de solução de ABTS diluída previamente. A solução de ABTS foi preparada reagindo 7 mM da solução de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. A mistura foi armazenada em frasco âmbar a temperatura ambiente por 16 horas antes do uso. A solução ABTS foi diluída com tampão fosfato (pH 7.4) até atingir uma absorbância de 730nm. A reação foi incubada por 6 min e a leitura das amostras foi também realizada a 730 nm.

Os resultados foram expressos como nmol de equivalente de Trolox/mg de pele

5.2.10 Análise estatística

A homogeneidade foi considerada a partir das características da amostra. Os dados foram analisados pelos testes adequados a cada experimento e de acordo com a normalidade, verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, a homogeneidade verificada pelo teste de Barlett's, seguido por teste de Tukey, Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney para amostras não paramétricas e teste *one way* ANOVA ou teste-t para amostras

paramétricas. Os resultados comparativos são apresentados pela média $\pm$ erro padrão da média (EPM) para análises paramétricas e mediana com distribuição para análises não paramétricas de mensurações feitas com 6-8 animais em cada grupo por experimento. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism Versão 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$. [*] Representa diferença estatisticamente significativa do grupo sham, e [#] representa diferença estatisticamente significativa do grupo controle (lesão sem tratamento).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer, da Universidade Estadual de Londrina e segue as normas da revista *Journal of Dermatological Science* (<https://www.sciencedirect.com/journal/journal-of-dermatological-science/publish/guide-for-authors>).

Assessment of the effects of Resolvin D5 (RvD5) on healing in a murine model of dorsal skin lesions

Willian Hideki Chinen¹, Rubia Casagrande^{a, 2*}

^a Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

1 Aluno de mestrado do Centro de Ciências Farmacêuticas

2 Doutora em Ciências Farmacêuticas; Professora Orientadora do Programa de Ciências da Saúde

* Author correspondence

Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas.

Rodovia Celso Garcia Cid Pr 445 Km 380. Campus Universitário 86051-990 - Londrina, PR - Brasil - Caixa-postal: 6001

Telefone: (43) 33714565

rubiacasa@uel.br

Abstract

The skin is the largest organ of the human body. It is the main barrier against external aggressors. As it is the main one, it is susceptible to injuries, forming wounds and inflammatory processes. Poor healing is responsible for several complications in patients and high mortality rates. In this context, the use of a pro-resolving lipid mediator reresolvin D5 (RvD5) to reduce healing time and reduce inflammatory effects is promising. Resolvins in general are capable of inhibiting the production of inflammatory mediators and mediating pain caused by an inflammatory process. The objective of this study was to analyze the effects and mechanisms of action of the pro-resolving lipid mediator RvD5 on healing in a murine model of dorsal skin lesion (LCD). In this study, two skin lesions were induced on the back of hairless mice after intraperitoneal treatment with RvD5 for 7 days. Treatment with 100pg/animal of RvD5 accelerated the healing process by closing the lesion, increased the number of neutrophils, decreased the inflammatory infiltrate, and decreased the expression of mRNA for iL-10, VEGF and FGF. It increased collagen synthesis, decreasing metalloproteinases type 2 (MMP-2) and type 9 (MMP-9) and decreasing the amount of antioxidants in relation to the untreated group. The present study suggests RvD5 as a promising therapeutic approach in the treatment of cutaneous wounds.

Keywords: wound healing, resolving inflammation, Specialized Pro-resolving Mediators (SPMs), oxidative stress.

Introduction

The skin is the largest organ in the human body and performs functions such as protection, regulation and sensations. The skin is made up of two layers: epidermis and dermis [1] Because the skin functions as a barrier, it is susceptible to injury by external aggressors that are responsible for triggering various physicochemical reactions, activating the immune system, releasing mediators, generating structural changes in cells and tissues, consequently promoting healing. [2]

Skin wounds are classified as acute wounds, which are generally healed within an organized and appropriate repair process, through the ability of the skin itself to restore its functional and anatomical integrity through healing, or chronic wounds, which evolve inadequately or stop healing, leading to changes in the site's function [2] Wounds are estimated to account for almost 3% of total healthcare costs – approximately £5 billion annually, according to UK data. Most of this cost is related to hospital and nursing time to treat patients at home or in clinics, while materials such as dressings represent a small part of the total cost. In the USA, it is reported that more than US\$25 billion is spent annually on the treatment of chronic wounds, [3] affecting patients' quality of life and increasing morbidity and mortality, these represent an immense economic and social challenge for healthcare systems around the world [2]

The wound healing mechanism has not yet been fully elucidated and its treatment is meticulously long and requires specialized medical assistance. [4] Therefore, it is important to understand the mechanisms of tissue repair for the development of new therapies that meet specific demands, minimize the adverse effects present in current therapies, such as the use of antibiotics and that accelerate the tissue repair process, reducing the number

Resolution of inflammation is mediated by endogenous local synthesis of pro-resolving lipid mediators (MLPR). MLPR make up a class of molecules derived from the transformation of essential fatty acids. To date, four families have been described: the lipoxins, the ursoins (series D and E), the protectins and the maresins. These mediators have analgesic, anti-inflammatory functions and act in the host's defense against infections [5]

In the literature there is no evidence of the role of RvD5 in the healing of skin wounds, however some studies demonstrate the role of RvD5 in controlling inflammation during

wound healing. But some studies have shown inhibition of the production of inflammatory mediators such as IL-6 and CCL5 in THP-1 cells. Another study demonstrated the inhibition of neuropathic and inflammatory pain [6]

Therefore, this work aimed to evaluate the effects of the pro-resolving lipid mediator RvD5 administered intraperitoneally on the healing process in a murine model of dorsal skin lesions (LCD).

Material and Methods

Animals

Hairless mice of the HRS/J lineage, male and female, adults, weighing an average of 25g, were used. The mice were kept in the vivarium of the Health Sciences Center/UEL where a light/dark cycle (12/12 h) was used with controlled temperature ($22 \pm 22^{\circ}\text{C}$) and free access to water and food. The animals were in standard polypropylene cages measuring 30 x 19.5 x 13 cm (Insight®) and were adapted to the experimental environments and conditions at least 1 hour before the experiment. The project was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the State University of Londrina and the experiments were carried out in accordance with its standards (CEUA Protocol no. 15654.2019.33).

Experimental Procedures

Measurement and evaluation of lesion closure

The lesions were photographed and measured with the aid of a scalemeter at the time of injury induction and 7 days later, before sample collection. Two measurements were taken using the diameter of the lesion and analyzed individually.

Histological analysis

After 7 days the dorsal skin from lesion was dissected, fixed in 10% formaldehyde prior to embedding in paraffin and then processed for MassonTrichrome. The images were digitally acquired using a conventional light

microscope (10x objective) (Olympus CX31RTSF, Tokyo, Japan) coupled to a high-resolution digital camera. Analyses were performed on ImageJ 1.53 software for Windows (Software in the public domain: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) using the threshold tool and performed on RGB images without further treatment. The collagen was determined by the intensity of staining per % of the delimited area

Myeloperoxidase activity assay

The indirect quantity of neutrophils presence was evaluated through colorimetric assay of myeloperoxidase (MPO). Skin samples were collected in microtubes and kept at - 80°C until assay time, when they were diluted with potassium phosphate buffer (K₂HPO₄) (pH 6.0) containing 0.5% hexadecyl trimethyl ammonium bromide (HTAB) and homogenized using the Tissue-Tearor tissue homogenizer (Biospec 985370). The homogenate was centrifuged for 2 min at 16,100g at 4°C and the supernatant was used for the assay. In 96-well microplates, 30 µL of the supernatant and 200µL of 50 mM phosphate buffer solution at pH 6.0, containing 0.167 mg/mL o-dianisidine dihydrochloride and 0.015% hydrogen peroxide were deposited. After 20 minutes the colorimetric reaction was determined in a spectrophotometer at 450 nm (Spectra MAX 3 250, Molecular Devices) and the MPO activity of the samples was compared with the standard curve. The results were presented as number of neutrophils x 10⁴/mg skin.

RT-qPCR

Skin samples were collected at the 7th day after lesion induction, ground with liquid nitrogen in TRIzol® reagent (Life Technologies) with the aid of a pestil and homogenized. Total RNA was extracted by using the SV Total RNA Isolation System (Promega). The purity of total RNA was measured using a spectrophotometer (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland) and the wavelength absorption relationship (260/280) was between 1.8 and 2.0 for all preparations. Reverse transcription of total RNA to cDNA and qPCR was carried out using GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega) and specific primers. The qPCR reaction was performed in a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). The relative gene expression was measured using the

comparative 2-($\Delta\Delta C_q$) method relative to wound healing group. Table 1 shows the primer sequences. Since the expression of house-keeping genes are also affected in wound healing model. The geometric mean of the expression of 3 genes (GAPDH, TUB α and TBP) were used for normalization.

Table 2. Primer sequences for RT-qPCR.

Gene	Primer sense	Primer antisense
IL-10	CAGTGCCAACTGAGAATTTGG	ACTACTAAGGCTTCTTGGGAA
VEGF	GCACATAGAGAGAATGAGCTTCC	CTCCGCTCTGAACAAGGC T
FGF	GGCGTGGACAGTGGACTCTACCTC	TTCCCATCCAAGCCTCCATCATAC
TUB α	TGGAACCCACAGTCATTGATGA	TGATCTCCTTGCCAATGGTGTA
TBP	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC
GAPDH	GCCATCAACGACCCCTTCATTG	TGCCAGTGAGCTTCCCGTTC

Matrix metalloproteinase (MMP)-9 and (MMP)-2 activity measurement

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) substrate-embedded zymography was performed as described previously [12]. After electrophoresis, the gels were washed with 2.5% Triton X-100 with 0.05 M Tris-HCl (pH 7.4) for 1h on a rotary shaker to remove SDS and allow proteins to renature. The gels were then incubated in 0.01 M CaCl₂ overnight at 37 °C, and stained with Brilliant Blue R. After destaining in 20% acetic acid, the proteolytic activity was analyzed by comparing the intensities of the bands of each group using the Image J Program. We analyzed 5 gels in total, and each one presented the results of pools of 6 mice per group (NIH, Bethesda, MD, USA).

Assessment of endogenous antioxidant GSH levels

Skin samples (approximately 0.1g) were diluted (1:4) in 0.02M EDTA and

crushed using the Tissue-Tearor (Biospec 985370). 50% trichloroacetic acid (TCA) was added to the homogenate in a ratio of 1:0.2 of EDTA and TCA, respectively. Then, the mixture was centrifuged at 2,700 g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was removed and recentrifuged at 2,700 g for an additional 15 minutes at 4°C. The final supernatant was removed for analysis. For the assay, 50 µl of the sample supernatant, 100 µl of 0.4 M Tris buffer pH 8.9 and 5 µl of a 1.9 mg/mL solution of 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) in methanol. Absorbance was determined using a spectrophotometer (EnSpire, Perkin Elmer) after 5 minutes of incubation, at 405 nm. The standard curve was prepared with 0 to 150 µM GSH. The results were expressed in µM GSH/mg of skin.

Total antioxidant capacity: FRAP and ABTS assays

For FRAP and ABTS assays, skin samples were dissected, homogenized into buffer containing 1.15% KCl, centrifuged (1,000 g in 4 °C for 10 min), and total antioxidant capacity was determined as described previously. Reading was performed at 595 and 794 nm in a spectrophotometer reader (ENSPIRE, PERKIN ELMER). The results were expressed as nmol Trolox equivalent per mg of skin tissue. All results were compared to a standard curve of Trolox (concentration ranging between 0.01–20 nmol)

Statistical Analysis

Data was tested for normality and statistical analyses were performed using T test, Mann-Whitney test, One-way ANOVA followed by Tukey or Kruskal-Wallis as appropriate, using GraphPad Prism® software package Version 8.0. Results were obtained from different animals and expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) and represent two separated experiments. P value <0.05 was the threshold for significance. [*] Represents significant difference from sham, and [#] represents significant difference from control wound group.

Results

RvD5 accelerates the healing process by reducing wound size in HRS/J (hairless) mice

To evaluate the effects of RvD5 on wound healing, animals were subjected to a dorsal skin lesion (DSL) using a 5 mm diameter circular biopsy punch (with a total area of 0.1963cm²) and treated daily with RvD5 via intraperitoneal at doses of 3; 10; 30 and 100 pg/animal or saline vehicle in the case of the group with the untreated lesion; for 7 days (Fig. 1). The dose of 100 pg/animal demonstrated significant wound area reduction compared to the untreated group. The dose of 100 pg/animal was chosen for continuity of the experiments.

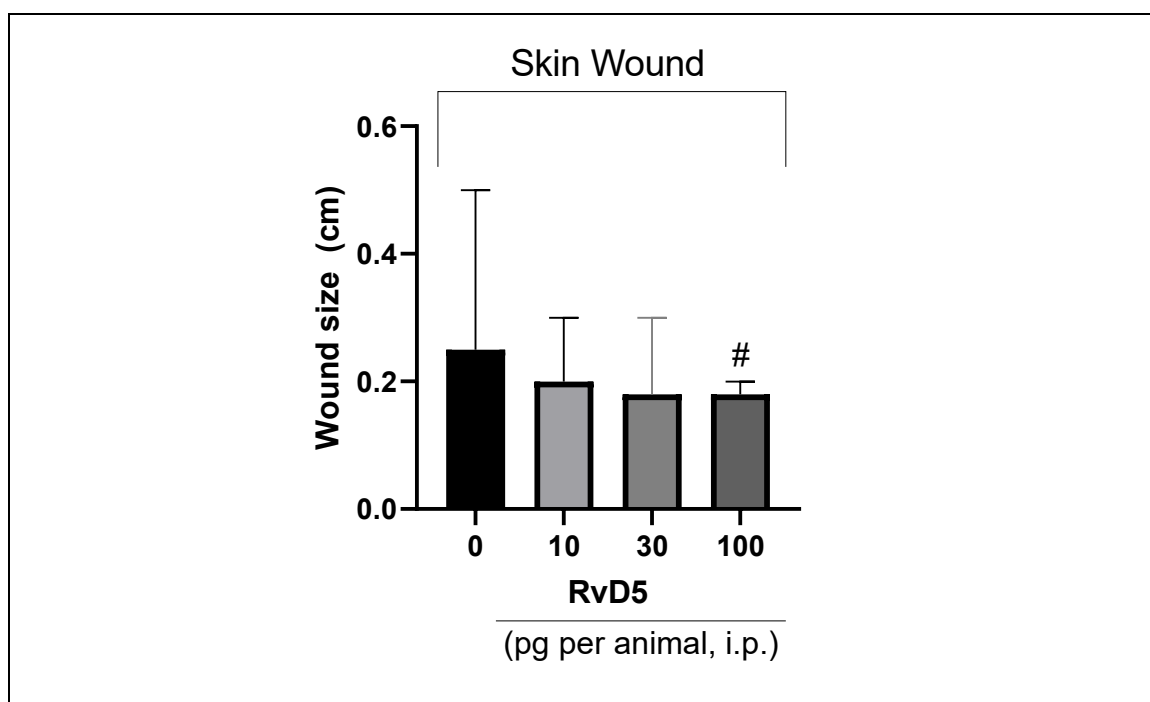
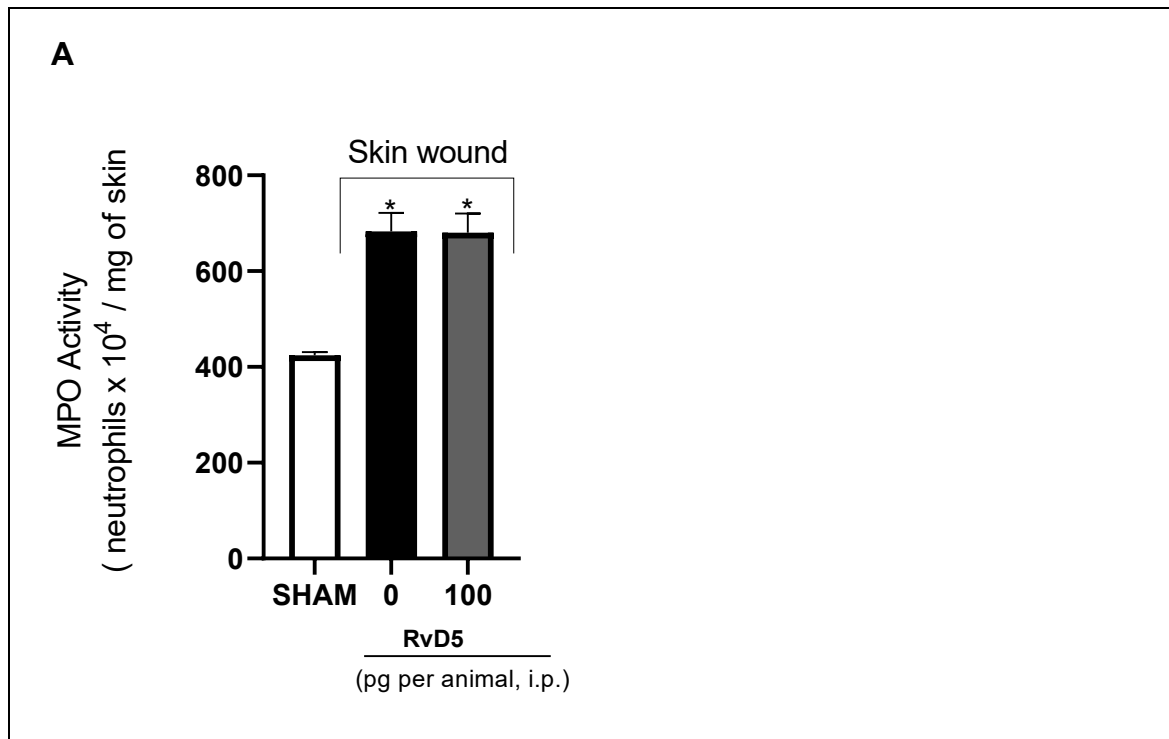


Fig 1. RvD5 accelerates *healing process*. The lesion on dorsum was induced with a 5 mm diameter punch. The animals were treated daily for 7 days via intraperitoneal (i.p.) with RvD5 at doses of 10, 30 and 100 pg/animal. The lesion area was photographed on the day of lesion induction and after 7 days of treatment. The lesions were taken with scalemeter. Results are presented as the median with range, n = 8 (#p < 0.05 compared to control wound without treatment group; one-way ANOVA, followed by Kruskal-wallis-test).

RvD5 increases MPO activity and reduce leukocyte infiltrate in the dorsal skin lesion

Neutrophils were assessed using myeloperoxidase activity (Fig 2A). The results were the statistical difference between the sham group and the 0 pg/animal and 100pg/animal groups. There was no difference between the 0 pg and 100 pg groups. Considering the healing cells, the leukocyte infiltrate was assessed.

The skin samples from lesion were stained with hematoxylin-eosin (HE), histopathological leukocyte recruitment to the local of the lesion was assessed. RvD5 100 pg/animal reduced leucocyte infiltration (Fig. 2B).



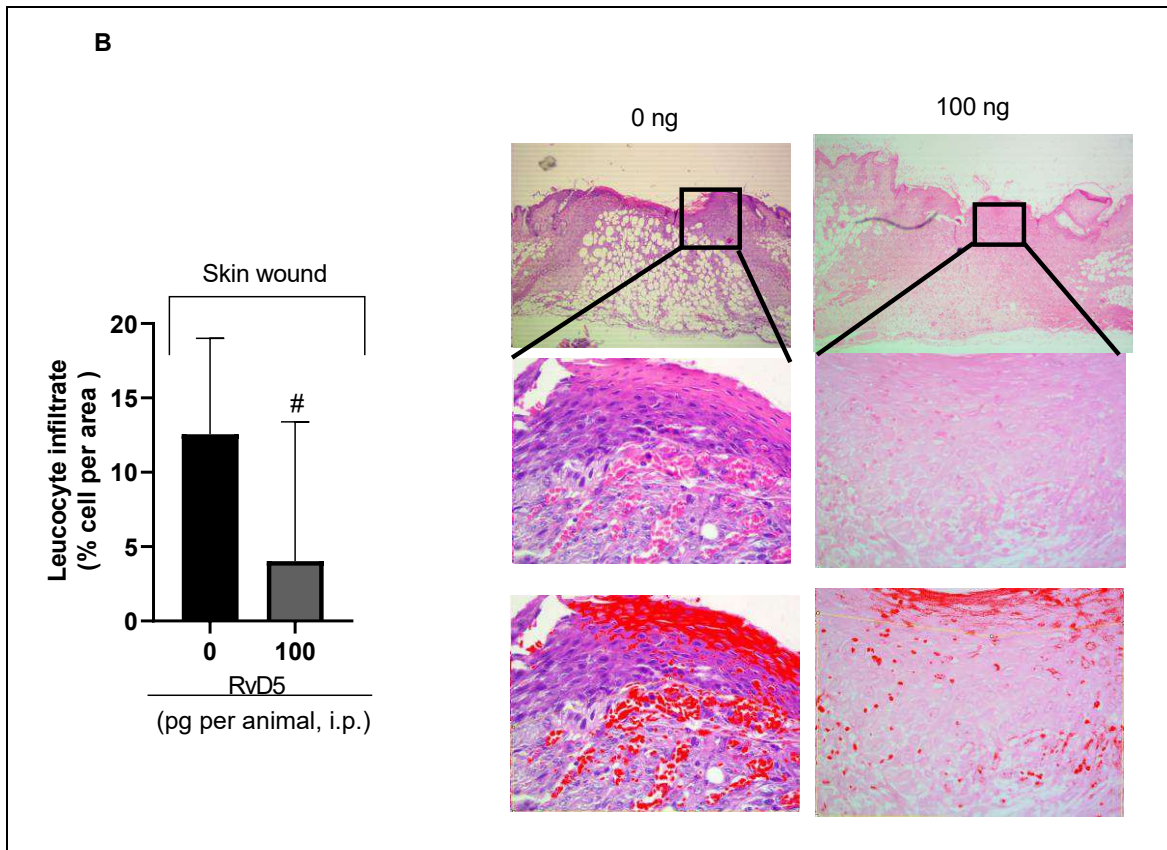
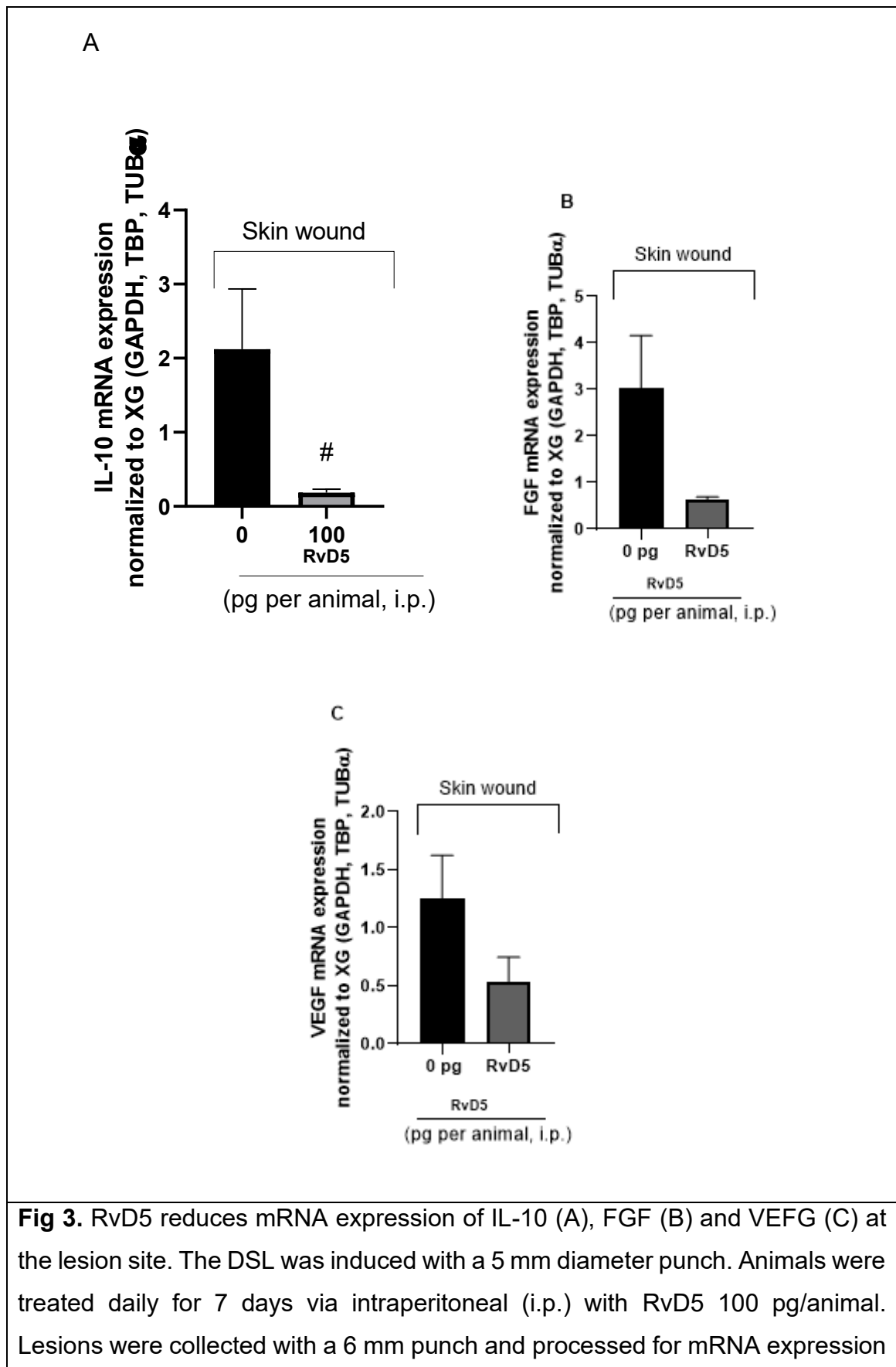


Fig 2. RvD5 increases MPO(Myeloperoxidase) activity(A) and increases leukocytes at the lesion site(B). The DSL was induced with a 5 mm diameter punch. Animals were treated daily for 7 days via intraperitoneal (i.p.) with RvD5 100 pg/animal. Lesions were collected with a 6 mm punch and processed for MPO activity and histology assay. Results are presented as the median with range, n = 8 for MPO and n= 6 for HE ([#]p < 0.05 control wound without treatment group; one-way ANOVA, followed by Kruskal-wallis-test).

RvD5 reduce mRNA expression of IL-10 but does not affect VEGF and FGF

To our knowledge, there is no gene that can be used alone as a control for normal expression in the skin wound model. To minimize this difficulty, we used the geometric mean of three control genes without the negative control group of normal tissue, again, because the usual control genes are altered in the skin wound group compared to the negative control group of normal tissue. These 3 genes were recommended after expression analysis in skin wound model [7,8]. In the analysis of mRNA expression for il-10(Fig 3A), FGF (Fig 3B) and VEGF (Fig 3C), we observed that on day 7 after the induction of DSL, these parameters were decreased in the group treated with RvD5

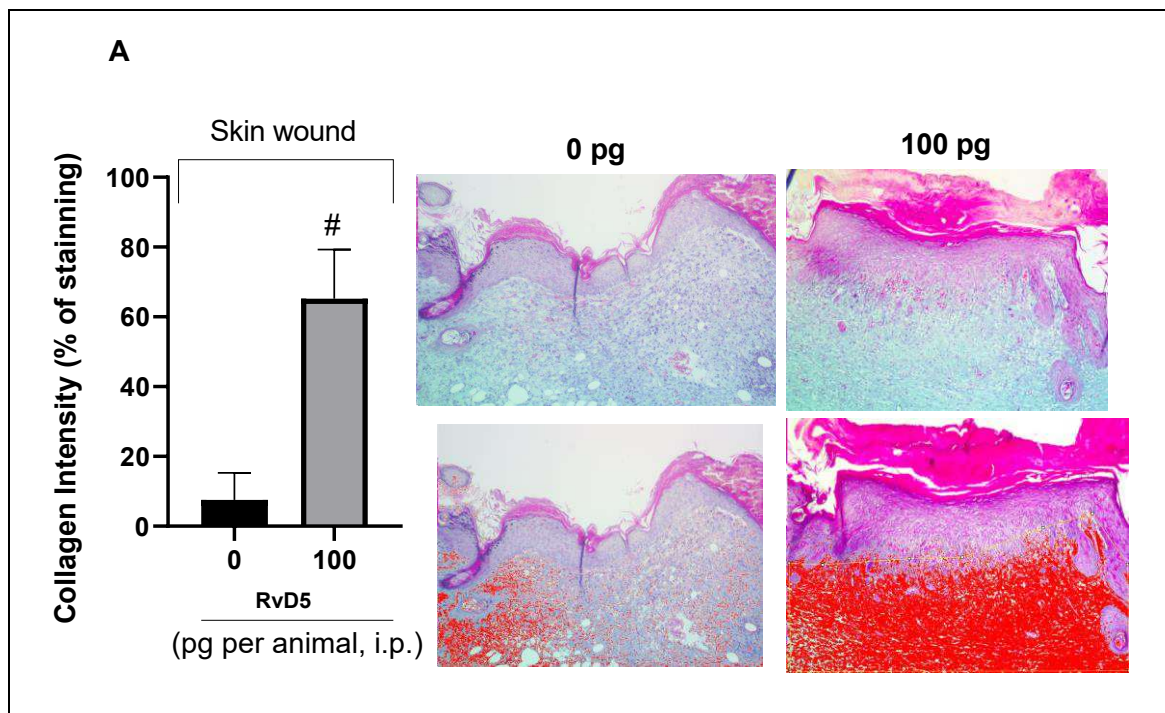
100 pg/animal compared to the animal treated with saline vehicle (Fig 3A).

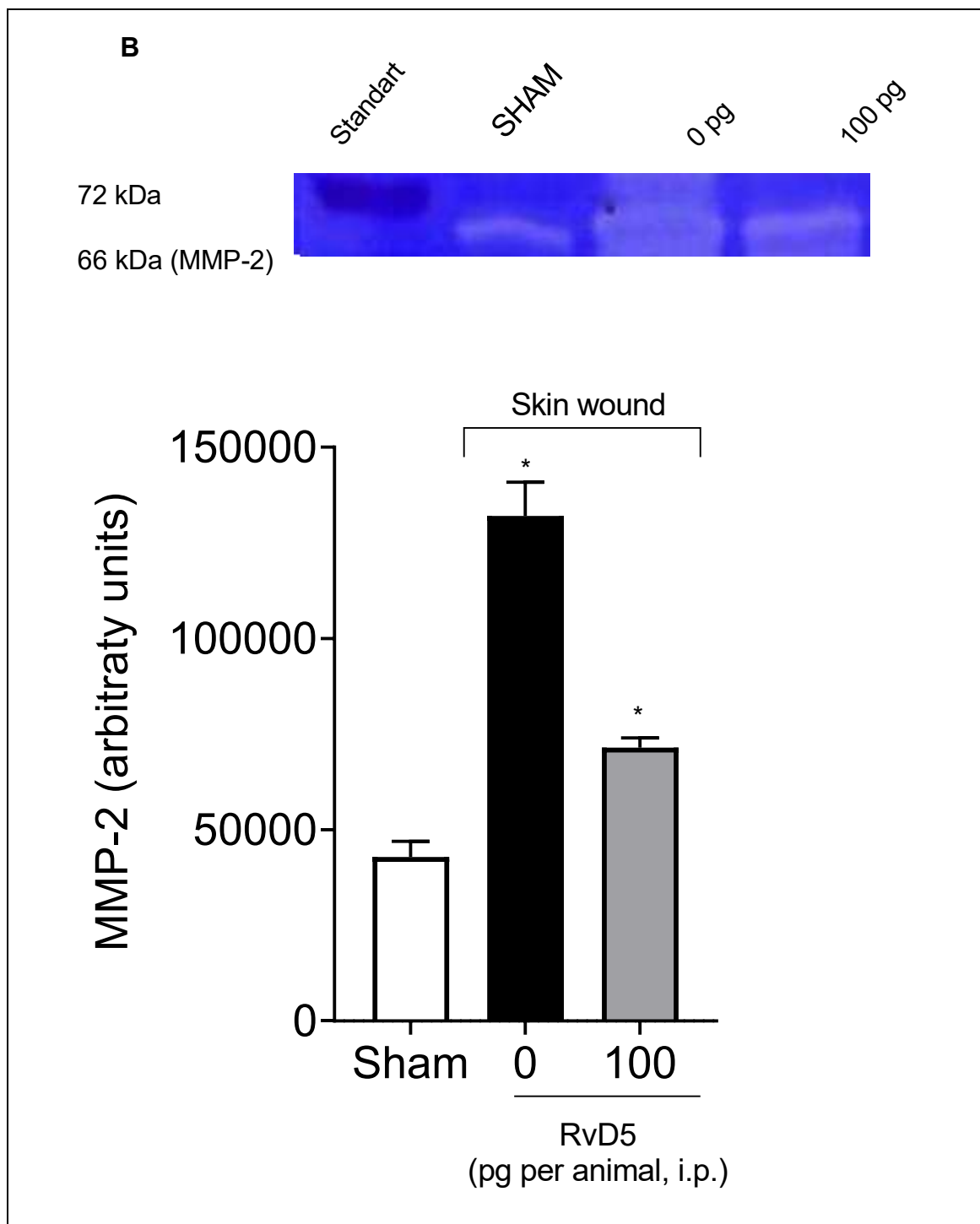


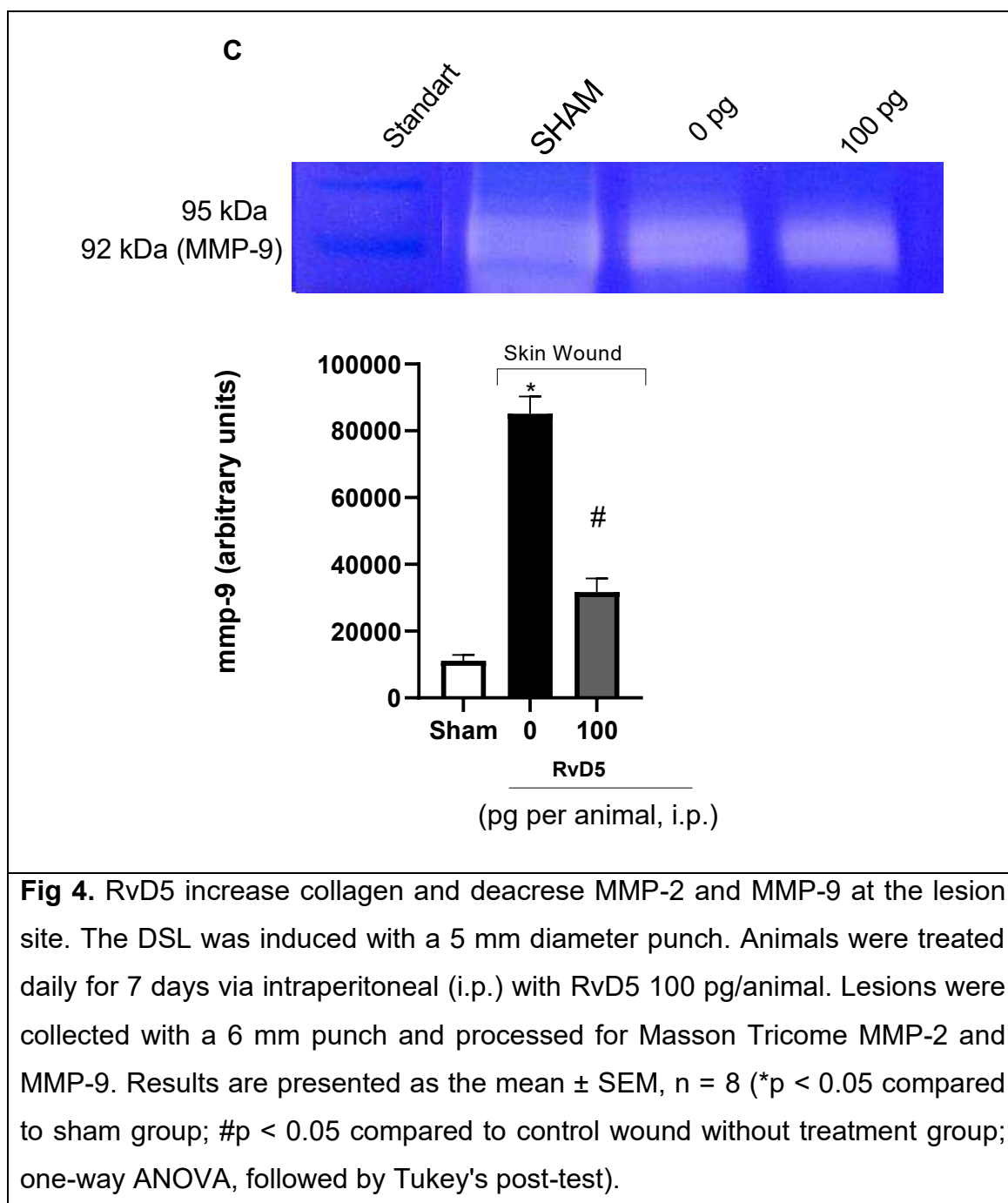
assay. Results are presented as the mean $\pm$ SEM, $n = 6$ (* $p < 0.05$ compared to sham group; one-way ANOVA, followed by Tukey's post-test).

RvD5 increase collagen and reduce MMP-2 and MMP-9

Collagens are a structural component of the ECM that contributes to skin flexibility, in addition to stabilizing growth factors and regulating cell adhesion and signaling between cells and the ECM. In the wound healing process, as the wound tissue undergoes remodeling over the years, the wound becomes like the original skin. Scarring is a consequence of altered levels of the same molecules that normally constitute the ECM, i.e. collagen I and III, fibronectin and laminin are abnormally elevated in scar tissue [9]. To check the presence of collagen in the wound, we use Mallory trichrome to quantify collagen in the healing process. RvD5 100pg (Fig4-A) increased collagen levels in the lesion after 7 days of treatment.

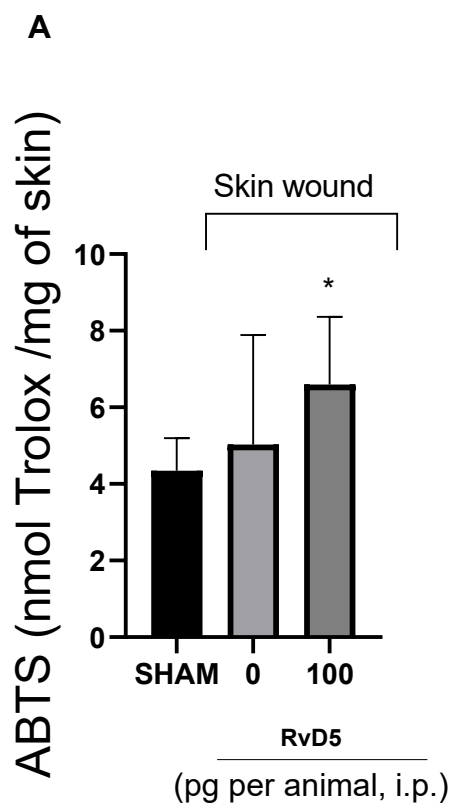






RvD5 changes antioxidant parameters -ABTS, GSH and FRAP

In the test to evaluate antioxidant parameters activity (Fig 5), there was an increase compared to the sham group. In the ABTS test (Fig 5A), the group that received 100 pg treatment compared to all groups. The GSH test (Fig 5B) decreased in relation to the saline group, correlating with the FRAP test (Fig 5C), with statistical significance.



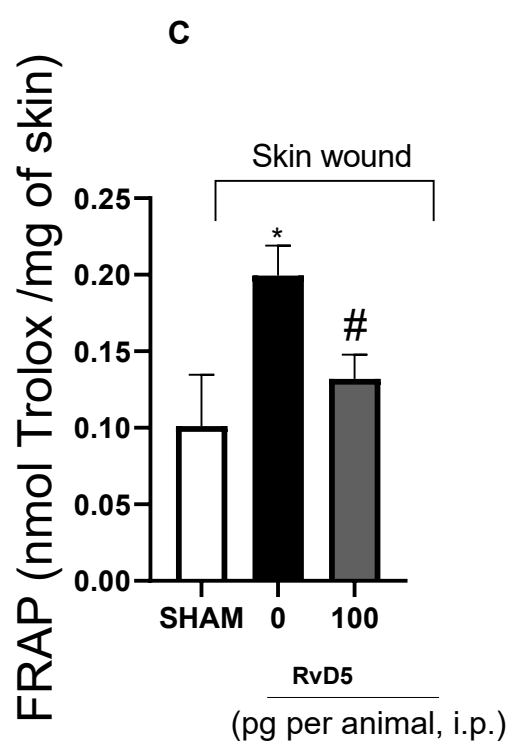
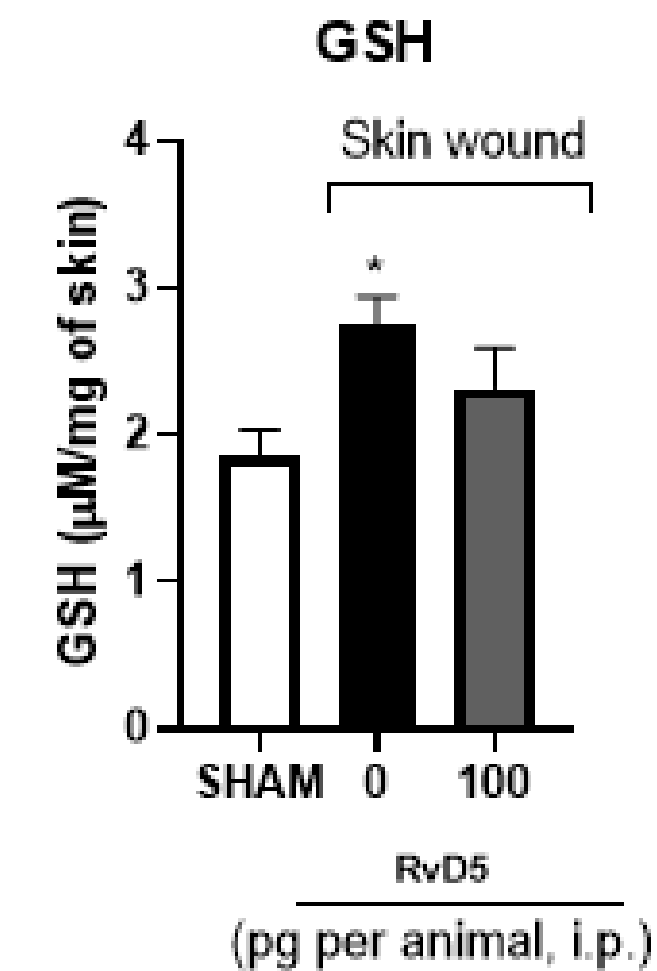


Fig 5. Effect of RvD5 on antioxidant capacity on the lesion site. The DSL was induced with a 5 mm diameter punch. Animals were treated daily for 7 days via intraperitoneal (i.p.) with RvD5 100 pg/animal. Lesions were collected with a 6 mm punch and processed for ABTS (A), GSH (B) and FRAP (C). Results are presented as median with range for ABTS and the mean $\pm$ SEM for GSH and FRAP, n = 8 (*p < 0.05 compared to sham group; #p < 0.05 compared to control wound without treatment group; one-way ANOVA, followed by Tukey's post-test for parametric and Kruskal-wallis-test for non-parametric).

Discussion

Studies in wound healing have demonstrated that resolvins [9], members of the SPMs family, improve skin wound healing. RvD5 demonstrated resolving and anti-inflammatory action in Female mice with renal damage caused by LPS endotoxemia [10].

One of the parameters for evaluating cicatrization is the presence of collagen type III, and healing is impaired with an increase in this cell population [2]. In shomita's study, he shows that scar tissue has a greater presence of collagen [11]

In our study, different doses of RvD5 were analyzed by macroscopic evaluation of lesion size and the dose 100 pg/animal demonstrated a statistically significant difference when compared to the lesion group treated with saline vehicle. Treatment with RvD5 not only accelerated the repair process, showing greater wound closure, but also collagen type III indicating that the healing process is in a stage closer to resolution.

The resolution of inflammation, enabling tissue repair, was demonstrated by the decrease in IL-10 mRNA expression. In the proliferative phase, after the inflammatory phase, the production of inflammatory cytokines begins to decline while the production of anti-inflammatory cytokines begins to increase. In the study, IL-10 facilitates the transition from the inflammatory phase to the proliferative phase by modulating the type and number of responding primary immune cells that migrate to a site of injury and regulating cytokine expression. Evidence that IL-10 plays a role in ECM

remodeling during injury comes from studies showing how healing is caused by the transformation of fibroblasts into myofibroblasts, resulting from collagen deposition and a reduction in MMP activity.[12] Furthermore, this is also evidenced by the decreased expression of FGF and VEGF mRNA[13]

Matrix metalloproteinases (MMPs) are enzymes responsible for the degradation of extracellular matrix (ECM) components, such as collagen [14]. The activity of MMPs can be controlled using specific inhibitors, known as tissue inhibitors of MMPs (TIMPs). The regulation between the production of MMPs and TIMPs represents a crucial point to maintain the balance between the production and degradation of the extracellular matrix. The reduction in both MMP-2 and MMP-9 indicates the final healing process, suggesting different phases for those who received treatment compared to those who did not.

The reduction of antioxidants by the FRAP and ABTS tests indicates the resolution of inflammation, reaching levels close to the levels of the group that did not suffer the injury[15].

Conclusion

Through the present data, we suggest that RvD5 accelerates the tissue repair process in a murine model of dorsal skin injury. Treatment with RvD5 decreased the size of the lesion, decreased inflammatory parameters, such as inflammatory infiltrate, decreased the mRNA expression of cytokines and growth factors, in addition to increasing collagen synthesis, decreasing metalloproteinases and altering antioxidant parameters. These combined results indicate that RvD5 can be considered a promising therapeutic approach in the treatment of cutaneous wounds, especially in patients with diseases that interfere with the healing process, such as diabetes. Furthermore, the lipid mediator being an endogenous molecule and low concentration may present fewer adverse effects when applied in a pharmaceutical form. Its low dosage leads to less costs and faster treatments for chronic patients. However, more research is needed to fully understand the mechanism of action of RvD5 and evaluate its efficacy and safety in clinical settings. If the therapy is validated in future studies, it could represent a significant advance in the treatment of skin lesions and potentially contribute to improving the quality of life of patients with wounds in various medical settings.

Acknowledgments

This work is supported by grants from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) and Wilian Hideki Chinen acknowledges master degree scholarship from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] OKTAY Arda, NADIR Göksügür, YALÇIN Tüzün, Basic histological structure and functions of facial skin, *Clinics in Dermatology*, Volume 32, Issue 1, 2014, Pages 3-13, ISSN 0738-081X, <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.021>.
- [2] KOLIMI, Praveen et al. Innovative treatment strategies to accelerate wound healing: trajectory and recent advancements. *Cells*, v. 11, n. 15, p. 2439, 2022.
- [3] FRYKBERG RG, Banks J. Challenges in the treatment of chronic wounds. *Adv Wound Care* (New Rochelle). 2015;4(9):560–82. doi: <http://dx.doi.org/10.1089/wound.2015.0635>
- [4] UCHIDA, Denise Tiemi; BRUSCHI, Marcos Luciano. 3D Printing as a Technological Strategy for the Personalized Treatment of Wound Healing. *AAPS PharmSciTech*, v. 24, n. 1, p. 41, 2023.
- [5] SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, v. 510, n. 7503, p. 92–101, 2014.
- [6] LUO, Xin; GU, Yun; TAO, Xueshu; SERHAN, Charles Nicholas; JI, Ru-Rong. Resolvin D5 Inhibits Neuropathic and Inflammatory Pain in Male But Not Female Mice: Distinct Actions of D-Series Resolvins in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], 2019. DOI: 10.3389/fphar.2019.00745.
- [7] K. Karnam, K. Sedmaki, P. Sharma, G. Routholla, S. Goli, B. Ghosh, V.V.K. Venuganti, O.P. Kulkarni, HDAC6 inhibitor accelerates wound healing by inhibiting

tubulin mediated IL-1 β secretion in diabetic mice, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1866 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165903>

[8] A. Turabelidze, S. Guo, L.A. Dipietro, Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model, *Wound Repair and Regeneration.* 18 (2010) 460–466. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00611.x>

[9] Mathew-Steiner, S. S., Roy, S., & Sen, C. K. (2021). Collagen in Wound Healing. *Bioengineering* (Basel, Switzerland), 8(5), 63. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063>

[10] R. Menon, P. Krzyszczyk, F. Berthiaume, Pro-Resolution Potency of Resolvins D1, D2 and E1 on Neutrophil Migration and in Dermal Wound Healing, *Nano Life.* 07 (2017) 1750002. <https://doi.org/10.1142/s1793984417500027>

[11] Cardoso, R. D. R., Chambo, S. D., Zaninelli, T. H., Bianchini, B. H. S., Silva, M. D. V. D., Bertozzi, M. M., Saraiva-Santos, T., Franciosi, A., Martelossi-Cebinelli, G., Garcia-Miguel, P. E., Borghi, S. M., Casagrande, R., & Verri, W. A. (2022). Resolvin D5 (RvD5) Reduces Renal Damage Caused by LPS Endotoxemia in Female Mice. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(1), 121. <https://doi.org/10.3390/molecules28010121>

[12] Singampalli, K. L., Balaji, S., Wang, X., Parikh, U. M., Kaul, A., Gilley, J., Birla, R. K., Bollyky, P. L., & Keswani, S. G. (2020). The Role of an IL-10/Hyaluronan Axis in Dermal Wound Healing. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 636. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00636>

[13] Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2000;5(1):40-46. doi:10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x

[14] M.J. Bae, F. Karadeniz, B.N. Ahn, C.S. Kong, Evaluation of effective MMP inhibitors from eight different brown algae in human fibrosarcoma HT1080 cells, *Prev Nutr Food Sci.* 20 (2015) 153–161. <https://doi.org/10.3746/pnf.2015.20.3.153>

[15] Fitzmaurice SD, Sivamani RK, Isseroff RR. Antioxidant therapies for wound healing: a clinical guide to currently commercially available products. *Skin Pharmacol Physiol.* 2011;24(3):113-126. doi:10.1159/000322643

7. CONCLUSÃO

Através dos presentes dados, sugerimos que a RvD5 acelera o processo de reparo tecidual em modelo murino de lesão cutânea dorsal. O tratamento com RvD5 diminuiu o tamanho da lesão, diminuiu os parâmetros inflamatórios, como o infiltrado inflamatório, diminuiu a expressão de mRNA de citocinas e fatores de crescimento, além aumentar a síntese de colágeno, diminuindo as metaloproteinases e alterando os parâmetros antioxidantes. Estes resultados combinados indicam que a RvD5 pode ser considerado uma abordagem terapêutica promissora no tratamento de feridas cutâneas, principalmente na aplicação de pacientes com doenças que interferem no processo de cicatrização como as diabetes. Além disso, o pelo mediador lipídico ser uma molécula endógena e baixa concentração pode apresentar menos efeitos adversos na aplicação em uma forma farmacêutica. Sua baixa dosagem leva a menos custos e tratamentos mais rápidos para pacientes crônicos. No entanto, são necessárias mais pesquisas para compreender completamente o mecanismo de ação do RvD5 e avaliar a sua eficácia e segurança em ambientes clínicos. Caso a terapia seja validada em estudos futuros, poderá representar um avanço significativo no tratamento de lesões cutâneas e potencialmente contribuir para a melhoria da qualidade de vida de pacientes com feridas em diversos ambientes médicos.

REFERÊNCIAS

- Cardoso RDR, Chambo SD, Zaninelli TH, et al. Resolvin D5 (RvD5) Reduces Renal Damage Caused by LPS Endotoxemia in Female Mice. *Molecules*. 2022;28(1):121. Published 2022 Dec 23. doi:10.3390/molecules28010121
- CHOUHAN, Dimple et al. Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances. *Biomaterials*, v. 216, p. 119267, 2019.
- CHUN, Hyun Woo; LEE, Jintak; PHAM, Thu Huyen; LEE, Jiyon; YOON, Jae Hwan; LEE, Jin; OH, Deok Kun; OH, Jaewook; YOON, Do YoungFER. **Journal of microbiology and biotechnology**, [S. l.], 2020. DOI: 10.4014/jmb.1907.07033.
- D'ORAZIO, John; JARRETT, Stuart; AMARO-ORTIZ, Alexandra; SCOTT, Timothy. UV radiation and the skin *International Journal of Molecular Sciences*, 2013. DOI: 10.3390/ijms140612222.
- DUVALL, M. G., LEVY, B. D. DHA-and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation. **European Journal of Pharmacology**. v.785, p144-155, 2016.
- El Mohtadi, Mohamed & Whitehead, Kathryn & Dempsey-Hibbert, Nina & Belboul, Amina & Ashworth, Jason. (2021). Estrogen deficiency - a central paradigm in age-related impaired healing? *EXCLI journal*. 20. 99-116. 10.17179/excli2020-3210.
- FATTORI, Victor et al. Maresin 2 is an analgesic specialized pro-resolution lipid mediator in mice by inhibiting neutrophil and monocyte recruitment, nociceptor neuron TRPV1 and TRPA1 activation, and CGRP release. *Neuropharmacology*, v. 216, p. 109189, 2022.
- FERGUSON, Mark WJ; O'KANE, Sharon. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1445, p. 839-850, 2004.
- FRYKBERG RG, Banks J. Challenges in the treatment of chronic wounds. *Adv Wound Care* (New Rochelle). 2015;4(9):560–82. doi: <http://dx.doi.org/10.1089/wound.2015.0635> PubMed PMid: 26339534.
- » <http://dx.doi.org/10.1089/wound.2015.0635>
- HALLIWELL, Barry. The wanderings of a free radical *Free Radical Biology and Medicine*, 2009. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.008.

HART, P. H.; GRIMBALDESTON, M. A.; SWIFT, G. J.; JAKSIC, A.; NOONAN, F. P.; FINLAY-JONES, J. J. Dermal mast cells determine susceptibility to ultraviolet B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice. *J Exp Med*, [S. l.], v. 187, n. 12, p. 2045–2053, 1998. DOI: 10.1084/jem.187.12.2045. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9625764.

FERGUSON, Mark WJ; O'KANE, Sharon. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 359, n. 1445, p. 839-850, 2004.

KHAVKIN, Jeannie; ELLIS, David A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 2011. DOI: 10.1016/j.fsc.2011.04.003

KOLIMI, Praveen et al. Innovative treatment strategies to accelerate wound healing: trajectory and recent advancements. *Cells*, v. 11, n. 15, p. 2439, 2022.

LANDÉN, N. X.; LI, D.; STÄHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 73, n. 20, p. 3861–3885, 1 out. 2016.

LAWTON, S. Skin 1: the structure and functions of the skin. *Nurs. Times*, v. 115, p. 30-33, 2019.

LUO, Xin; GU, Yun; TAO, Xueshu; SERHAN, Charles Nicholas; JI, Ru-Rong. Resolvin D5 Inhibits Neuropathic and Inflammatory Pain in Male But Not Female Mice: Distinct Actions of D-Series Resolvins in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], 2019. DOI: 10.3389/fphar.2019.00745.

Monavarian, M., Kader, S., Moeinzadeh, S., & Jabbari, E. (2019). Regenerative Scar-Free Skin Wound Healing. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 25(4), 294–311. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2018.0350>

National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 16061139, Resolvin D5. Retrieved January 25, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resolvin-D5>.

NAWAZ, Zuhair; BENTLEY, George. Surgical incisions and principles of wound healing. *Surgery (Oxford)*, v. 29, n. 2, p. 59-62, 2011.

Ogawa, N., Sugiyama, T., Morita, M., Suganuma, Y., & Kobayashi, Y. (2017). Total Synthesis of Resolvin D5. *The Journal of organic chemistry*, 82(4), 2032–2039. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b02870>

Oktay Arda, Nadir Göksügür, Yalçın Tüzün, Basic histological structure and functions of facial skin, *Clinics in Dermatology*, Volume 32, Issue 1, 2014, Pages 3-13, ISSN 0738-081X, <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.021>.

POTEKAEV, Nikolai N. et al. The role of extracellular matrix in skin wound healing. *Journal of Clinical Medicine*, v. 10, n. 24, p. 5947, 2021.

Queen, D., & Harding, K. (2023). What's the true costs of wounds faced by different healthcare systems around the world?. *International wound journal*, 20(10), 3935–3938. <https://doi.org/10.1111/iwj.14491>

Recchiuti, Antonio & Mattoscio, Domenico & Isopi, Elisa. (2019). Roles, Actions, and Therapeutic Potential of Specialized Pro-resolving Lipid Mediators for the Treatment of Inflammation in Cystic Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*.

RODRIGUES, M. et al. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev*, v. 99, p. 665–706, 2019.

SERHAN, Charles N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, v. 510, n. 7503, p. 92-101, 2014.

Schultz GS, Chin GA, Moldawer L, et al. Princípios de cicatrização de feridas. In: Fitridge R, Thompson M, editores. *Mecanismos de doenças vasculares: um livro de referência para especialistas vasculares* [Internet]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011. 23. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534261/>

TOTTOLI, Erika Maria et al. Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 8, p. 735, 2020.

UCHIDA, Denise Tiemi; BRUSCHI, Marcos Luciano. 3D Printing as a Technological Strategy for the Personalized Treatment of Wound Healing. *AAPS PharmSciTech*, v. 24, n. 1, p. 41, 2023.

VERRI, Waldiceu A.; GUERRERO, Ana T. G.; FUKADA, Sandra Y.; VALERIO, Daniel A.; CUNHA, Thiago M.; XU, Damo; FERREIRA, Sérgio H.; LIEW, Foo Y.; CUNHA,

Fernando Q. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [S. l.], v. 105, n. 7, p. 2723–8, 2008. DOI: 10.1073/pnas.0712116105. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18250323> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2268203>.

WANG, Ming et al. Artificial skin perception. *Advanced Materials*, v. 33, n. 19, p. 2003014, 2021.

Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open biology*, 10(9), 200223. <https://doi.org/10.1098/rsob.200223>

WERZ, Oliver; GERSTMEIER, Jana; LIBREROS, Stephania; DE LA ROSA, Xavier; WERNER, Markus; NORRIS, Paul C.; CHIANG, Nan; SERHAN, Charles N. Human macrophages differentially produce specific resolvins or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity. *Nature Communications*, [S. l.], 2018. DOI: 10.1038/s41467-017-02538-5.

XIA, Y.; ZWEIER, J. L. Measurement of Myeloperoxidase in Leukocyte-Containing Tissues 1 Myeloperoxidase (MPO), 2 a hydrogen peroxide (H₂O₂). *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, v. 245, n. 1, p. 93–96, fev. 1997.

ZAID, Mohammad Abu; AFAQ, Farrukh; SYED, Deeba N.; DREHER, Mark; MUKHTAR, Hasan. Inhibition of UVB-mediated Oxidative Stress and Markers of Photoaging in Immortalized HaCaT Keratinocytes by Pomegranate Polyphenol Extract POMx. [S. l.], p. 882–888, 2007.

ANEXOS

ANEXO A

Comissão de Ética no Uso de Animais

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 147/2019 Londrina, 09 de outubro de 2019.

Prezado (a) professor (a),

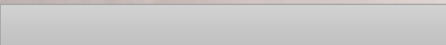
Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "Avaliação dos efeitos e mecanismos de ação dos mediadores lipídicos pró-resolução 15-epi-lipoxina A4 (é uma "Aspirin-Triggered Lipoxin" A4, ATLA4), lipoxina A4 (LXA4), Resolvina D1 (RvD1), Resolvina D5 (RvD5), Protectina D1 (PD1), Maresina 1 (MaR1) e Maresina 2 (Mar2) sobre a cicatrização em modelo murino de lesão cutânea" protocolo CEUA nº 15654.2019.33 sob a responsabilidade de Rúbia Casagrande, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UDEL) em reunião do dia **08/10/2019**.

Este projeto tem por objetivo a avaliação dos efeitos e mecanismos de ação dos mediadores lipídicos pró-resolução 15-epi-lipoxina A4 (é uma "Aspirin-triggered Lipoxin" A4, ATLA4), lipoxina A4 (LXA4), Resolvina D1 (RvD1), Resolvina D5 (RvD5), protectina D1 (PD1), maresina 1 (Mar1) e a maresina 2 (Mar2) sobre a cicatrização em modelo murino de lesão cutânea de dorso. Grau de Invasividade: 2.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/11/2019 a 31/10/2024
Espécie/ linhagem/ raça	Camundongo heterogêneo/Hairless
Nº de animais	924
Peso/ Idade	20-25g/ 60 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério do Centro de Ciências da Saúde da UEL
Amostras a serem coletadas	Pele (tecido cutâneo do dorso)

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UDEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.


 Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
 Coordenadora da CEUA/UDEL

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). Rúbia Casagrande
Responsável pelo projeto
 Departamento de Ciências Farmacêuticas/CCS
 C/C para a Chefia do Departamento de Ciências Farmacêuticas/CCS
 C/C para a Direção do Centro de Ciências da Saúde/CCS

Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Estadual de Londrina
 ceua@uel.br / (43) 3371-5454

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4000 PARANÁ - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 10.011 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>
 LONDRINA - PARANÁ - BRASIL