



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA DA ROCHA

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO ÁCIDO PIMARADIENÓICO
NOS DANOS CUTÂNEOS INDUZIDOS PELA RADIAÇÃO
UVB EM CAMUNDONGOS SEM PÊLO**

CAMILA DA ROCHA

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO ÁCIDO PIMARADIENÓICO
NOS DANOS CUTÂNEOS INDUZIDOS PELA RADIAÇÃO
UVB EM CAMUNDONGOS SEM PÊLO**

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Rúbia Casagrande.

Londrina
2016

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

Rocha, Camila da.

Potencial terapêutico do ácido pimaradienólico nos danos cutâneos induzidos radiação UVB em camundongos sem pêlo / Camila da Rocha. - Londrina, 2016.
85 f. : 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, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Ácido Pimaradienólico - Tese. 2. Diterpenos - Tese. 3. Antioxidantes - Tese. 4. Radiação UVB - Tese. I. Casagrande, Rúbia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CAMILA DA ROCHA

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO ÁCIDO PIMARADIENÓICO NOS
DANOS CUTÂNEOS INDUZIDOS PELA RADIAÇÃO UVB EM
CAMUNDONGOS SEM PÊLO**

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a Rúbia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a Marcela Maria Baracat
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Nilton Syogo Arakama
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 13 de setembro de 2016.

DEDICO

A Deus, por me conceder saúde, forças e inspiração para a execução deste projeto.

Aos meus pais, Ruy e Antonia, pelo amor incondicional, apoio e incentivo.

À minha irmã Luciana da Rocha, pelo exemplo e por sempre me motivar a superar meus limites.

Fica aqui minha homenagem.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Doutora Rúbia Casagrande primeiramente, por ter me dado o privilégio de ser sua orientanda e também, por sua disponibilidade em ensinar.

Aos Professores Doutores Waldiceu Verri e Décio Sabbatini Barbosa por disponibilizarem laboratório e equipamentos para a execução experimental deste projeto.

Ao colega de turma David Laios do Vale, por ter me auxiliado em toda a parte experimental e também em grande parte da teoria, te agradeço por toda generosidade, disponibilidade em ensinar e pela parceria nos estudos.

À Professora Doutora Renata Martinez, por me permitir que acompanhasse a execução de parte de seu projeto de doutorado, o que possibilitou o aprendizado de diversas metodologias utilizadas também neste projeto e pelo auxílio em alguns experimentos do mesmo.

Às companheiras de laboratório Carine Farias, Luciana Higachi e Kamila Landucci, pelas orientações quanto às normas do laboratório e quanto à operação dos equipamentos.

À Professora Doutora Daniele Medeiros, pela ajuda em diversos experimentos e pelo conhecimento compartilhado.

À técnica do laboratório, Denise Duarte, pelo constante apoio.

Aos professores das disciplinas obrigatórias e optativas do Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina por todo conhecimento transmitido.

“O estudo em geral, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é consentido ficar crianças toda a vida”.

Albert Einstein

Rocha, Camila da. **Potencial terapêutico do ácido pimaradienólico nos danos cutâneos induzidos pela radiação UVB em camundongos sem pêlo.** 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O ácido pimaradienólico (ácido ent-pimara-8(14)-dien-19-óico) (AP) é um diterpeno da classe dos ent-pimaranos encontrado em plantas como *Viguiera arenaria* Baker (Asteraceae), *Aralia continentalis* e *Aralia cordata* e apresenta atividades biológicas diversas, dentre as quais: antimicrobiana, antiparasitária, hipotensora, antineoplásica, antiinflamatória, antioxidante. No presente estudo, avaliou-se o potencial antioxidante e anti-inflamatório do AP, nos danos foto-oxidativos cutâneos induzidos pela radiação UVB em camundongos sem pêlos. O AP, previamente solubilizado em DMSO, foi veiculado em salina estéril e administrado por via oral nas doses de 1, 3 e 10 mg/Kg. Além dos grupos tratados, foram incluídos grupos controles irradiado (CI) e não irradiado (CNI). As amostras de pele, retiradas da região dorsal dos camundongos, foram coletadas de acordo com tempo ideais para os testes aos quais seriam submetidas. Os parâmetros analisados foram edema de pele, atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e metaloproteinase-9 (MMP-9), dosagem das citocinas IL-1, IL-10 e TNF- α , o poder antioxidante redutor do ferro (FRAP) na pele, o poder antioxidante pelo ensaio de sequestro do radical 2,2',azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), o níveis do antioxidante endógeno glutationa (GSH), a atividade da enzima catalase (CAT), a produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e de hidroperóxido (LOOH). O AP reduziu o edema de pele e a atividade da MPO, foi também capaz de inibir o aumento da atividade da MMP-9 induzido pela radiação UVB. O AP mostrou ser eficaz em proteger a capacidade antioxidante da pele, a qual é diminuída mediante exposição à radiação UVB, esta capacidade foi demonstrada pelos resultados obtidos nos ensaios de FRAP, ABTS e GSH. O AP inibiu a peroxidação lipídica (LOOH) e a produção de ânion superóxido. O ácido pimaradienólico demonstrou diminuir a liberação dos três tipos de citocinas avaliados, a qual é induzida pela radiação UVB. Desta forma, os resultados demonstraram que o AP possui atividade antioxidante e antiinflamatória no modelo de inflamação e estresse oxidativo induzidos pela radiação UVB.

Palavras-chaves: Ácido Pimaradienólico. Diterpenos. Antioxidante. Inflamação. Radiação UVB.

Rocha, Camila da. **Therapeutic potential of pimaradienoic acid in skin damage induced by ultraviolet B radiation in hairless mice.** 85 p. Dissertation (Master's Degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The Pimaradienoic acid (PA; *ent*-pimara-8(14),15-**dien**-19-oic acid) (PA), a pimarane diterpene found in plants like *Viguiera arenaria* Baker (Asteraceae), *Aralia continentalis* and *Aralia cordata* Rhizoma. It has been demonstrated activities such as antibacterial and antischistosomal effects, vasodilation, anticancer, antioxidant and anti-inflammatory. In the present study, we evaluated the antioxidant and anti-inflammatory properties of PA on the prevention and treatment of the skin damage induced by ultraviolet B radiation in hairless mice. PA, previously dissolved in dimethyl sulfoxide, was administered on per oral doses of 1, 3 and 10mg/Kg. Besides treated groups, it were included the irradiated control group and the non-irradiated control group. The skin samples, were collected from the dorsal part of mice accordingly the respective collecting times. The evaluated targets were skin edema, myeloperoxidase (MPO) and metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, dosage of cytokines IL-1, IL-10 e TNF- α , the power evaluation antioxidant iron reducer (FRAP) in skin, antioxidant power by radical scavenge assay 2,2'-azinobis (3-sulfonic ethylbenzothiazoline-6 acid) (ABTS), quantification of endogenous antioxidant (GSH), levels of the endogenous antioxidant catalase (CAT), the production of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and hydroperoxides (LOOH). PA reduced skin edema and MPO activity, it also inhibited the increased of MMP-9 activity UVB-induced. In addition, PA showed to inhibit the skin antioxidant capacity resulted from UVB radiation, this capacity was measured by FRAP, ABTS and GSH assays. PA demonstrated to inhibit the production of superoxide anion and the lipid peroxidation (LOOH). PA inhibits the UVB-induced cytokine release. Concluding, the obtained results in the present research showed that PA demonstrated antioxidant and anti-inflammatory activity in model of UVB radiation-induced inflammation and oxidative stress.

Keywords: Diterpenes. Pimaradienoic acid. Antioxidant. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura química do ácido pimaradienóico.....18
- Figura 2** – Fluxograma dos tempos de tratamento com os protocolos experimentais para avaliação da eficácia da solução oral contendo o ácido pimaradienóico25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Constituintes do gel de separação e do gel de concentração do ensaio de eletroforese para avaliação da atividade da enzima metaloproteinase 9.....	28
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
AP	Ácido pimaradienóico
AP-1	Ativador de proteína-1
APS	Persulfato de amônio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
COX-2	Ciclooxigenase-2
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
EPM	Erro padrão da media
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe ²⁺	Ferro
FeCl ₃ .6H ₂ O	Cloreto férrico hexahidratado
FRAP	Poder antioxidante de redução férrica
Gapdh	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
HCl	Ácido clorídrico
HO [•]	Radical hidroxil
HO-1	Hemeoxigenase-1
HTAB	Brometo de hexadecil trietil amônio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL	Interleucina
KCl	Cloreto de potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
KOH	Hidróxido de potássio
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos

LPO	Peroxidação lipídica
MeOH	Metanol
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	Azul de nitrotetrazólico
NF-κB	Fator nuclear-κB
Nrf2	Fator nuclear eritróide 3 relacionado ao fator 2
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OD	Densidade optica
PBS	Tampão fosfato salino
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloro acético
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
TPTZ	2,4,6 tripiridil-S-triazina
Tris	Hidroximetil aminometano
UV	Radiação ultravioleta
UVB	Radiação ultravioleta B

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	MATERIAIS	21
3.1.1	<i>Materiais de Consumo</i>	21
3.1.2	<i>Equipamentos</i>	21
3.2	MÉTODOS	22
3.2.1	<i>Material Vegetal</i>	22
3.2.2	<i>Isolamento do Ácido Pimaradienóico</i>	22
3.2.3	<i>Avaliação do efeito In Vivo do diterpeno Ácido Pimaradienóico no controle do processo inflamatório e no estresse oxidativo induzidos pela radiação UVB</i>	23
3.2.3.1	<i>Animais experimentais</i>	23
3.2.3.2	<i>Sistema e fonte de radiação UVB</i>	23
3.2.3.3	<i>Protocolo experimental para administração do ácido pimaradienóico por via oral</i>	24
3.2.3.5	<i>Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)</i>	26
3.2.3.6	<i>Determinação da atividade/secreção de metaloproteinase 9 (MMP-9) por zimografia em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS)</i>	27
3.2.3.7	<i>Dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNFα, IL-1β e da enzima anti-inflamatória IL-10</i>	29
3.2.3.8	<i>Avaliação do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP) na pele</i>	30
3.2.3.9	<i>Avaliação do poder antioxidante pelo ensaio de sequestro do radical 2,2',azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)</i>	31
3.2.3.10	<i>Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno glutathiona (GSH)</i>	32
3.2.3.11	<i>Avaliação da atividade da catalase (CAT)</i>	32
3.2.3.12	<i>Avaliação da produção de ânion superóxido (O$_2^{\cdot-}$)</i>	33

3.2.3.13	<i>Avaliação da produção de hidroperóxido (LOOH)</i>	34
3.3.	Análise estatística dos resultados	35
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGO CIENTÍFICO	36
4.1	Therapeutic potential of pimaradienoic acid against UVB-induced skin damage in hairless mice.....	36
5.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	61
6.	REFERÊNCIAS	63
	ANEXO	70

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão humano e age como barreira protetora, preservando o corpo devidamente hidratado, prevenindo infecções e também protegendo contra a radiação UV por meio de mecanismos antioxidantes eficientes (FERNANDO, *et al.*, 2016; KIM, *et al.*, 2014). A excessiva exposição da pele à radiação UVB pode levar a um desequilíbrio na homeostasia deste extenso órgão, causado por um complexo processo de reações químicas e morfológicas como, por exemplo, formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's), alterações histoquímicas de diferentes gravidades, espessamento da camada espinosa e retificação da junção dermoepidérmica (BALOGH, *et al.*, 2010).

Os raios solares UV atingem a superfície terrestre com comprimentos de ondas na faixa de 280 a 400nm. Tal espectro é dividido em radiação UVC (200 a 280nm), UVB (280 a 320nm) e radiação UVA (320 a 400nm) e. Assim que a radiação UV atinge a pele, sua energia é depositada conforme vai percorrendo sua extensão, de modo que, quanto menor for o comprimento de onda da radiação, menor será a capacidade de penetração do fóton através da pele, desta forma, os raios UVB são em grande parte absorvidos pela epiderme e apenas uma pequena fração consegue atingir a derme, enquanto os raios UVA são absorvidos e atingem, em sua maioria, à derme. Assim sendo, ao atingir seu local de ação, os raios UVA e UVB irão interagir com grupos cromóforos, que são partes de moléculas assim denominadas devido à sua afinidade em absorver os raios UV, com consequente produção de efeitos biológicos provenientes da formação de EROs (LIM, *et al.*, 2007). A radiação UVB tem sido considerada a mais efetiva em estimular a ocorrência de queimaduras solares e em induzir reações inflamatórias caracterizadas por eritema, edema e dor no local onde a pele tenha sido exageradamente exposta (SAADÉ, *et al.*, 2000).

O DNA é um importante cromóforo biológico presente na célula da pele (LIM *et al.*, 2007). As reações oxidativas no DNA são de grande relevância biológica, pois podem levar ao desenvolvimento de câncer e envelhecimento precoce (WEI *et al.*, 1998). Assim sendo, a radiação solar pode, além de gerar ERO's, causar alterações de bases do DNA, formando compostos que afetam o gene p-53, o qual é

responsável pela supressão tumoral, conseqüentemente, esta mutação faz com que as células tumorais se tornem resistentes à apoptose e que prossigam o processo mitótico sem o reparo do DNA (BOSCH, *et al.*, 2015).

As ERO's são extremamente nocivas, os danos causados pelas mesmas compreendem a desestabilização de outras moléculas, rápidas reações em cadeia que resultam no dano de biomoléculas, tais como diminuição e deterioração de telômeros, comprometimento mitocondrial, degradação de membranas e a oxidação de proteínas estruturais e enzimáticas, e, dentre os principais efeitos causados por estas alterações biológicas estão os danos ao DNA, inflamação e imunossupressão. Especificando o local de ocorrência, na epiderme, a partir dos queratinócitos, ocorre a formação de ERO's, que atuam diretamente sobre as células alterando o DNA, as proteínas e os lipídios de membrana e, no âmbito da derme, ocorrem os processos inflamatórios, imunossupressores, de remodelagem da matriz extracelular e angiogênese (BOSCH, *et al.*, 2015).

Adicionalmente aos efeitos causados por alterações no DNA, a radiação UV também é capaz de interagir direta e indiretamente com lipídios por meio de reações de peroxidação lipídica. Diretamente, as ERO's interagem com as moléculas lipídicas oxidando duplas ligações químicas e, indiretamente, dando início a cadeias de reações entre moléculas lipídicas oxidadas com outros tipos de moléculas orgânicas. Tal cadeia pode dar origem à expressão de diversos genes em resposta ao estresse oxidativo, por exemplo, à molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e ao fator de crescimento vascular endotelial. Além disso, lipídeos oxidados das membranas dos queratinócitos podem ser clivados pela fosfolipase A₂, com subsequente formação de ácido araquidônico, um substrato das enzimas ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2). Estas enzimas catalisam o referido substrato em prostaglandinas, as quais, por sua vez, são mediadores inflamatórios não apenas na pele, mas também em todo o organismo (LIM *et al.*, 2007).

Conforme exposto anteriormente, os danos causados às proteínas devido à excessiva exposição à radiação UV podem atingir tanto às proteínas enzimáticas quanto às estruturais, o que resulta no processo de remodelagem da matriz extracelular (BOSCH, *et al.*, 2015). Desta forma, a produção de enzimas

denominadas proteases pelos fibroblastos pode ser aumentada, com consequente degradação das proteínas estruturais colágeno e elastina. Os raios UV podem também inativar a enzima tirosina fosfatase e, com isso, seus substratos permanecem fosforilados. A permanência de moléculas sinalizadoras em sua forma fosforilada pode resultar na ativação prolongada da produção de metaloproteinasas ou em imunossupressão (LIM *et al.*, 2007).

A inflamação da pele devido à radiação UV tem sido caracterizada pela liberação de neuropeptídeos, histamina, prostaglandinas, serotonina, radicais superóxido e também pelo aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias tais como interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (SAADÉ, *et al.*, 2000). No entanto, a exposição prolongada e repetida pode também levar à imunossupressão, quando a radiação UV promove uma diminuição nas respostas celular e humoral, desta maneira, os raios UV causam a depleção das células de Langerhans, tais células, presentes na epiderme, atuam como mediadores importantes na resposta imune celular captando, processando e apresentando os antígenos aos linfócitos T, prejudicando assim a resposta imune. Além disso, a radiação UV estimula a secreção da citocina anti-inflamatória IL-10, a qual tem papel crucial na imunossupressão cutânea, não apenas naquela induzida pela radiação UV, mas também na imunossupressão relacionada a outras doenças cutâneas, como por exemplo, os melanomas (BOSCH, *et al.*, 2015). Somando-se a essa cascata de eventos, a infiltração de leucócitos resultante da exposição à radiação UV, tem sido apontada como uma das maiores fontes de estresse oxidativo (MITTAL *et al.*, 2003).

Os efeitos nocivos à pele originários da excessiva exposição às radiações solares, ocorrem devido à saturação no sistema antioxidante natural cutâneo. Este sistema endógeno é formado por enzimas, tais como superóxido dismutase, catalase, ceruloplasmina, transferrina, dentre outras, além de outras substâncias obtidas a partir da alimentação, como as vitaminas E e C e os carotenóides. O câncer de pele do tipo não-melanoma proporciona uma diminuição significativa nos sistemas antioxidantes não-enzimáticos, no entanto, o emprego de tais vitaminas e carotenóides na prevenção da fotocarcinogênese, de acordo com estudos anteriores é controverso (BOSCH, *et al.*, 2015).

Com o intuito de prevenir e ou tratar os danos causados ao tecido cutâneo pela radiação UV, diversas estratégias têm sido utilizadas, dentre as quais podemos citar a utilização de protetores solares, vestimentas protetoras e restrição da exposição à luz solar. A mais empregada em meio às diversas formas de fotoproteção é o uso de protetores solares, os quais podem ser compostos de vários filtros UV, de origem inorgânica ou orgânica. Os primeiros atuam através do bloqueio físico e os demais atuam como absorvedores químicos (BALOGH *et al.*, 2010). No entanto, a opção por estas estratégias apresenta algumas desvantagens tais como a necessidade de aplicação correta e reaplicação em casos de transpiração ou imersão na água, sensibilidade aos componentes da fórmula e ainda, deficiência de vitamina D₃ (BOSCH, *et al.*, 2015).

A vitamina D₃ ou colecalciferol desempenha um importante papel no metabolismo ósseo e no funcionamento do sistema imunológico, podendo ser usada no tratamento de doenças cutâneas tais como psoríase e vitiligo (BALOGH *et al.*, 2010). A produção desta vitamina é estimulada pela radiação UV e a deficiência da mesma é fator predisponente à carcinogênese (BOSCH, *et al.*, 2015).

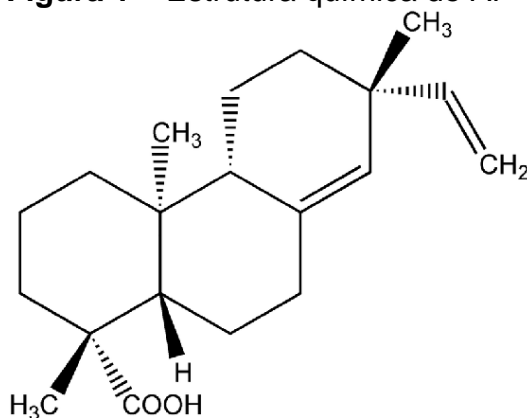
Diante desta problemática, diversos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de pesquisar novos medicamentos e também novas vias de administração para serem utilizados tanto no tratamento, como também na prevenção dos danos causados à pele, devido, em grande parte, ao estresse oxidativo desencadeado pela exposição intensa à radiação UV. Neste contexto, muitos extratos vegetais ou drogas isoladas de plantas têm demonstrado atividade não apenas antioxidante, mas também anti-inflamatória, características estas muito interessantes diante do quadro patológico descrito para os danos foto-oxidativos cutâneos, tanto nos casos onde é alcançado efeito local quanto para aqueles de efeito sistêmico. (BOSCH, *et al.*, 2015; AFAQ, *et al.* 2003).

Dentre os derivados fitoquímicos com propriedades antioxidantes, estão diferentes grupos químicos, tais como catequinas, isoflavonas, proantocianidinas, antocianinas, ácidos fenólicos, estilbenos, carotenóides e diterpenos (BOSCH, *et al.*, 2015; MIZOKAMI, *et al.*, 2016).

Um diterpeno cujas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes vêm sendo investigadas em diversos estudos, tendo demonstrado resultados expressivos

é o ácido pimaradienóico (ácido *ent*-pimara-8(14)-dien-19-óico) (AP) (figura 1), um diterpeno da classe dos *ent*-pimaranos, encontrado em plantas como *Viguiera arenaria* Baker (Asteraceae), *Aralia continentalis* e *Aralia cordata* (TANABE, *et al.*, 2014; MIZOKAMI, *et al.*, 2016; LIM, *et al.*, 2009). Diversos tipos de atividades farmacológicas têm sido demonstrados pelo AP, dentre os quais, destacam-se os efeitos antibacteriano e antiesquistossomal, atividades vasodilatadora, antineoplásica e anti-inflamatória. (TANABE, *et al.*, 2104; SEVERIANO, *et al.*, 2013; PORTO, *et al.*, 2012).

Figura 1 – Estrutura química do AP



Existem evidências de que os efeitos farmacológicos demonstrados pelo AP estejam relacionados ao bloqueio do influxo de cálcio, além de serem independentes do endotélio vascular. Além disso, há comprovação de que parte dos efeitos também se devam à liberação de óxido nítrico e de metabólitos derivados da via do ácido araquidônico (TIRAPELLI, *et al.*, 2005).

As moléculas com alto poder antioxidante devem ser capazes de reagir diretamente com as ERO's de forma a destruí-los, podendo torna-los novos radicais livres menos reativos e perigosos que os radicais que foram neutralizados. As características estruturais que comumente conferem a estas moléculas o referido poder são a presença de muitas duplas ligações e/ou muitos anéis aromáticos, o que não é o caso da estrutura molecular do AP (Figura 1). Desta forma, o poder antioxidante do AP, apresentado nos estudos efetuados até então sugerem que o efeito antioxidante a ele atribuído *in vivo* possa ser consequência indireta de seu alto poder anti-inflamatório (LÜ, *et al.*, 2010).

Com base nos resultados pré-clínicos obtidos até então pelo AP e devido à ausência de estudos anteriores com foco na pesquisa dos efeitos fotoprotetores do fármaco nos danos foto-oxidativos cutâneos induzidos pela radiação UVB, e considerando-se a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias de fotoproteção, no presente estudo foram investigados os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do ácido pimaradienóico no modelo de inflamação e estresse oxidativo induzidos pela radiação UVB.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito foto-protetor e mecanismos de ação do ácido pimaradienóico nos danos cutâneos foto-oxidativos induzidos pela radiação UVB em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o edema de pele;
- Avaliar o infiltrado leucocitário por meio do ensaio da mieloperoxidase (MPO);
- Avaliar se o AP reduz a atividade/secreção das enzimas metaloproteinases;
- Avaliar o poder antioxidante da pele por meio do ensaio de ABTS, 2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e FRAP (poder antioxidante redutor do ferro);
- Avaliar os níveis dos antioxidantes endógenos GSH e catalase;
- Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL-1 β) e anti-inflamatória (IL-10);

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 *Materiais de Consumo*

Corante azul brilhante, glutathiona reduzida (GSH), brometo de hexadeciltrimetil amônio (HTAB), n-etilmaleimida, o-dianisidina, fluoreto de fenilmetilsulfonila, ácido tiobarbitúrico (TBA), fenantrolina, 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH), 2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 2,4,6, tripiridil-S-triazina (TPTZ), trolox e ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), bisacrilamida, *nitroblue tetrazolium* (NBT), todos obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ácido Pimaradienóico (AP) isolados no Laboratório de Habilidades Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina a partir do extrato bruto das raízes secas do vegetal *Viguiera arenaria* (Asteraceae). 2-deoxi-D-ribose, batofenantrolina (BPS), tert-butil hidroperóxido da Acros (Pittsburg, PA, USA). Xileno cianol e hidroximetil aminometano (Tris) da Amresco (Solon, OH, USA). Kits de Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem das citocinas da eBioscience (San Diego, CA, USA). Acrilamida (Superscript® III). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1.2 *Equipamentos*

Agitador mecânico, Fisatom®; Balança analítica, HR-120, A&d®; Banho-maria, 314/2 DN, Nova Ética®; Banho-maria 100, Fanem; Centrífuga refrigerada, Rotina 46R, Hettich Zentrifugen®; Câmara de madeira projetada para irradiação; Deionizador de água, Purebal Option-Q, Elga®; Estufa 0-120°C, De Leo & Cia®; Fonte elétrica para eletroforese MS 300V, Major Science®; Homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec), T18 basic, IKA; Lâmpada ultravioleta fluorescente PHILIPS TL/12 40W RS-UVB, MedicalHoland®; Leitor de microplaca, Asys Expert Plus, Biochrom®; Leitor de microplaca, Enspire, Perkin Elmer®; Leitor de microplaca, Multiskan GO, Thermo Scientific; pHmetro, Tec-3MP, TECNAL®; Radiômetro IL 1700 Research Radiometer. Detectores: SED240 – filtro UVB

(290nm), SED005 – filtro UV (350nm); Sistema de eletroforese Mini Vertical, Mini-Protean® Tetra System, Bio-RAD®, Lab Plant®; Termociclador, TX96, Amplitherm®; Ultra-som, TSO, Thornton®.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 *Material Vegetal*

Viguiera arenaria Baker (Asteraceae) foi coletada e identificada por Mara Magenta em Itirapina – SP (22°13' S, 47°54' W, SP, Brasil), sendo depositada uma exsicata sobre o Código SPF #61 no Herbário da Universidade de São Paulo (SP, Brasil) e o Prof. Dr. Fernando Batista da Costa gentilmente cedeu o material vegetal, visando o isolamento do ácido pimaradienóico.

3.2.2 *Isolamento do Ácido Pimaradienóico*

As raízes secas (980g) de *Viguiera arenaria* foram submetidas à extração com diclorometano durante 30 minutos através de ultrasonicação e após o processo de secagem do solvente foram obtidos 82 g de extrato bruto. O extrato bruto foi ressuspenso em metanol e água (MeOH:H₂O, 9:1, v/v) e particionado exaustivamente com hexano e diclorometano e após a secagem dos solventes obteve-se o rendimento de 39,5 g (fase hexânica) e 25,0 g (fase diclorometânica). A fase hexânica foi submetida à cromatografia líquida a vácuo (Si gel 60), gerando 6 frações: F1 (0,5 g), F2 (13,3 g), F3 (14,2 g), F4 (5,3 g), F5 (2,4 g) e F6 (3,6 g). A Fração F2 forneceu o diterpeno AP. O processo de isolamento e purificação foi realizado por meio de cromatografia flash (hexano:acetato de etila), cromatografia em camada delgada preparativa (Si gel, hexano-Acetato de etila ou Hexano-Clorofórmio) e recristalização com metanol. A estrutura do diterpeno foi estabelecida pela comparação de dados de espectroscopia em Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C com dados da literatura. O processo de extração e isolamento do AP foi realizado no Laboratório de Habilidades Farmacêuticos sob a orientação do Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa.

3.2.3 Avaliação do efeito *In Vivo* do diterpeno Ácido Pimaradienóico no controle do processo inflamatório e no estresse oxidativo induzidos pela radiação UVB

3.2.3.1 Animais experimentais

Os animais utilizados para o estudo foram camundongos sem pelos da linhagem HRS/J, de ambos os sexos, adultos e com massa entre 20 e 30 g. Os camundongos foram mantidos no Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração. Os experimentos foram realizados conforme as normas da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (registrado no Ofício Circular CEUA nº242/2012, processo CEUA nº21103.2012.95).

3.2.3.2 Sistema e fonte de radiação UVB

A fonte de luz utilizada nos experimentos para indução das lesões foto-oxidativas foi uma lâmpada UVB fluorescente modelo PHILIPS TL/12 40W RS (Medical). A lâmpada emite radiação na faixa de 270 a 400 nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm. A medida da irradiância foi realizada utilizando-se um radiômetro (IL 1700) com detectores para radiação UV (SED 005) e, especialmente, para UVB (SED 240) (CARINI *et al.*, 2000; CASAGRANDE *et al.*, 2006). A lâmpada foi instalada numa câmara de madeira desenvolvida especificamente para a indução do estresse oxidativo e inflamação. Os camundongos foram separados em caixas de plástico cobertas com tela plástica para garantir a total exposição da região dorsal. Foi realizado rodízio com as caixas contendo os animais devido às variações de radiação ao longo da lâmpada. Os animais foram colocados a 20 cm de distância da lâmpada UVB e expostos à radiação à temperatura ambiente com livre movimentação na caixa, resultando em uma irradiância de $0,384\text{mW}/\text{cm}^2$ (CASAGRANDE *et al.*, 2006). A dose de radiação utilizada para indução da inflamação e do estresse oxidativo foi de $4,14\text{ J}/\text{cm}^2$ (CAMPANINI *et al.*, 2013; IVAN *et al.*, 2014; MARTINEZ *et al.*, 2015).

3.2.3.3 *Protocolo experimental para administração do ácido pimaradienólico por via oral:*

Para a realização dos experimentos, os animais foram divididos em cinco grupos, conforme o tipo de tratamento aplicado, e cada grupo continha cinco animais:

- **Grupo 1:** controle não irradiado, tratados com veículo utilizado para diluir o AP (solução salina de NaCl 0,9%);
- **Grupo 2:** controle irradiado, tratados com veículo utilizado para diluir o AP (solução salina de NaCl 0,9%);
- **Grupo 3:** irradiados e tratados com 1mg/Kg de AP;
- **Grupo 4:** irradiados e tratados com 3mg/Kg de AP;
- **Grupo 5:** irradiados e tratados com 10mg/Kg de AP;

As soluções contendo as doses de 1, 3 e 10mg/Kg de AP foram preparadas imediatamente antes de cada tratamento, com solubilização prévia do AP em DMSO, tendo como veículo solução salina de NaCl na concentração de 0,9%.

O AP foi administrado aos camundongos pela via oral por gavagem, utilizando uma cânula intragástrica com uma esfera na extremidade, cuidadosamente introduzida na boca do animal, passando pelo esôfago e chegando ao estômago onde a solução contendo o fármaco foi dispensado.

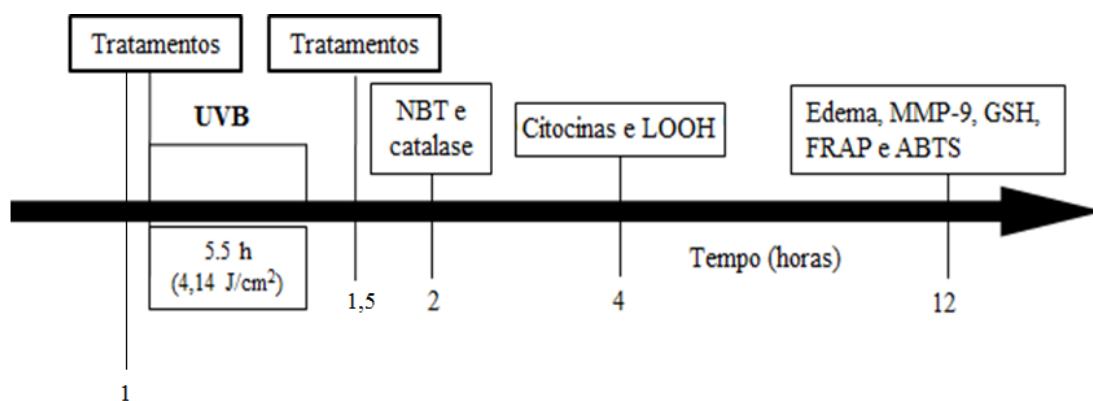
Os animais foram tratados com as três diferentes doses do AP três vezes a cada diferente grupo contendo 5 animais, sendo que a primeira e a segunda dose foram fornecidas, respectivamente, nos horários de 12 e 6 horas antes do início da radiação UVB. Os animais foram expostos à radiação por 5 horas e meia e a terceira dose do AP foi administrada em cada grupo, meia hora após o término da sessão de radiação conforme demonstrado na figura 2 (MARTINEZ *et al.*, 2016).

Após a exposição à radiação, os animais foram eutanasiados permitindo assim a coleta das amostras de pele para a realização das requeridas análises laboratoriais. Como foram avaliados diferentes parâmetros para análise do efeito anti-inflamatório e antioxidante do AP e cada marcador reage à indução do dano

cutâneo de forma tempo-dependente, o tempo de coleta de amostras de pele teve como base o tempo ótimo de atividade do marcador a ser investigado (JIN, *et al.*, 2007). Desta forma, foram padronizados três tempos de coleta de amostras. Para os ensaios de determinação de edema de pele, atividade de mieloperoxidase; avaliação de FRAP e capacidade de reduzir o radical ABTS; determinação dos níveis de GSH e atividade de metaloproteinase (MMP-9), os animais foram eutanasiados 12 horas após o final da radiação. Para avaliação da produção de ânion superóxido e determinação de atividade da catalase, os animais foram eutanasiados 2 horas após o final da radiação. Para avaliação da produção de citocinas TNF α , IL-1 β e IL-10 e hidroperóxido lipídico (LOOH), os animais foram eutanasiados 4 horas após o final do procedimento de radiação. Vale salientar que para o primeiro ciclo a eutanásia dos animais foi feita por meio de anestesia com 1,5% de isoflurano seguida por deslocamento cervical e para o segundo e terceiro ciclos, foi efetuada a decapitação dos animais após a anestesia de forma a evitar possíveis interferências do isoflurano nos resultados dos testes.

As amostras foram divididas para os diferentes testes e armazenadas a -80°C para as análises. Apenas o teste de edema cutâneo foi realizado no mesmo dia em que a pele foi retirada. Para os testes de 12 horas os animais foram terminalmente anestesiados com 1,5% de isoflurano ou anestesiados seguido de decapitação para os testes de 2 e 4 horas após o término da radiação UVB (4,14 J/cm²). As peles foram retiradas e lavadas com NaCl 145 mM (CASAGRANDE *et al.*, 2006; IVAN *et al.*, 2014).

Figura 2 – Fluxograma dos tempos de tratamento com os protocolos experimentais para avaliação da eficácia de solução oral contendo ácido pimaradienóico.



Os animais foram irradiados com radiação UVB durante 5 horas e 30 min (tempo necessário

para atingir 4,14 J/cm²). Uma hora antes da radiação e meia hora após a finalização da radiação os animais foram tratados com as diferentes concentrações de ácido pimaradienólico para cada grupo (1, 3 e 10mg). Os animais foram eutanasiados e amostras de pele foram coletadas 2 horas (produção do ânion superóxido [NBT] e atividade da catalase), 4 horas (dosagem de citocinas e hidropéroxido lipídico) e 12 horas (avaliação do teste de edema, atividade de metaloproteinase-9 [MMP-9], atividade de mieloperoxidase [MPO], níveis de glutathiona reduzida [GSH], avaliação do poder antioxidante redutor de ferro [FRAP] e transferência de elétrons ao radical [ABTS]), após o fim da radiação UVB (MARTINEZ *et al.*, 2016).

3.2.3.4 Avaliação do edema de pele

Estudos têm demonstrado que a exposição à radiação UV resulta em edema de pele, o qual tem sido considerado como um marcador de dano cutâneo relacionado à luz UV (AFAQ, ADHAMI, & AHMAD, 2003).

As amostras de pele do dorso de cada animal foram coletadas com auxílio de um molde com 5mm de diâmetro e área fixa de 19,6mm², sendo posteriormente foram pesadas (BOLLER *et al.*, 2010; IVAN *et al.*, 2014; MARTINEZ *et al.*, 2015). O efeito dos tratamentos no edema cutâneo causado pela radiação UVB foi mensurado pelo aumento da massa da pele na região dorsal. A análise foi feita comparando-se a massa de pele entre os diferentes grupos. Os resultados foram expressos em mg de pele.

3.2.3.5 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A enzima mieloperoxidase é uma enzima neutrofílica que promove o estresse oxidativo em inúmeras patologias inflamatórias. Tal enzima utiliza o peróxido de hidrogênio para catalisar a produção de agentes fortemente oxidantes, dentre os quais pode-se citar o hipoclorito de sódio e radicais livres (CHAPMAN, *et al.* 2013).

As amostras de pele dos animais (aproximadamente 30 mg) foram coletadas em tubos contendo 400 µL de tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 6,0) com 0,5% de brometo de hexadecil trietil amônio (HTAB) e mantidas a - 80 °C até o uso. Para realização do ensaio, as amostras foram homogeneizadas com auxílio do homogeneizador Tissue-Tearor (Biospec). O homogenato foi centrifugado a 16.100 xg por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado para o ensaio.

Em placa de 96 poços, foi adicionada alíquota do sobrenadante das amostras (30 μ L). A reação colorimétrica iniciou-se pela adição 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. Após 20 minutos de reação a atividade da MPO das amostras foi determinada em 450 nm (Asys Expert Plus, Biochrom) e comparada com uma curva padrão de neutrófilos de concentração conhecida.

A curva padrão foi preparada na mesma placa com a adição de 100 μ L de tampão fosfato 0,05 M 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. Os resultados foram expressos como atividade da MPO (número de neutrófilos/mg de pele).

3.2.3.6 *Determinação da atividade/secreção de metaloproteinase 9 (MMP-9) por zimografia em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS)*

A metaloproteinase 9, também denominada gelatinase B, é uma enzima presente em células que participam do processo de reparação tecidual do organismo (MANUEL & GAWRONSKA-KOZAK, 2006). Até recentemente, pensava-se que as metaloproteinases participavam destes processos simplesmente degradando moléculas da matriz extracelular, por exemplo, o colágeno. Entretanto, atualmente, é evidente que a atividade destas enzimas é muito mais direcionada e causa a liberação de informações críticas a partir da matriz extracelular. Precisamente, clivando uma grande quantidade dos componentes insolúveis da matriz, assim como moléculas associadas aos mesmos, liberando, desta forma, fragmentos bioativos e fatores de crescimento, alterando assim a estrutura da matriz extracelular (MOTT & WERB, 2004).

Para determinação da atividade da MMP-9 foi utilizado o ensaio de zimografia em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (FONSECA *et al.*, 2010; FONSECA *et al.*, 2011).

Foi feito um *pool* das amostras de pele de cada grupo e armazenadas em frascos Eppendorf. As amostras foram homogeneizadas com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec), na proporção 1:4 em tampão

fosfato Tris/HCl 50mM (pH 7,4) com cloreto de cálcio (CaCl_2) e 1% de inibidores de proteinases (fenantrolina, fluoreto de fenilmetilsulfonila e N-etilmaleimida) (FONSECA *et al.*, 2010).

Os homogenatos foram centrifugados duas vezes a 12.000 xg por 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram submetidos ao ensaio de zimografia. Também foi realizada dosagem de proteínas das amostras pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Alíquota de 50 μL do sobrenadante foi diluída em 10 μL de tampão Tris/HCl (pH 6,8) contendo 20% de glicerol, 4% de duodecil 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 1.

Tabela 1 – 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

Após a finalização da dispersão dos componentes listados na tabela 1, 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. Antes da aplicação das amostras, o gel foi

submetido a uma pré-corrída de 10 mA por 15 minutos. Após, foram aplicados 25 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 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.*, 2011). 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).

3.2.3.7 Dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-1 β e da enzima anti-inflamatória IL-10

A exposição aguda a quantidades relativamente moderadas de radiação UVB resulta no aumento dos níveis teciduais das citocinas pró-inflamatórias TNF α e IL-1 β (SAADÉ, *et al.*, 2000).

Foram realizadas utilizando-se a técnica de enzima imunoensaio (ELISA) com kits comerciais (eBioscience) baseando-se nas instruções do fabricante e conforme descrito na literatura científica (VERRI *et al.*, 2008). As amostras foram coletadas em microtubos contendo 500 µL de solução salina 0,9% estéril e foram trituradas com o homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec). Em seguida, foram centrifugadas a 2000 xg por 15 minutos 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. Após esse tempo de incubação, as placas foram lavadas com tampão PBS com 0,05% de Tween 20 e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com uma solução a 1% de albumina bovina. Após esse bloqueio e lavagem das placas, a curva padrão e as amostras foram adicionadas (50 µL) e incubadas a 4 °C por 16 horas.

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 hora, as placas foram lavadas com tampão de lavagem e foram adicionados 100 μ L de enzima avidina-peroxidase. As placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, lavadas, e adicionado 100 μ L do substrato contendo 0,04% de ortofenilenodiamina (OPD) e 0,04% de H₂O₂ em tampão fosfato, a placa foi mantida no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos. A reação enzimática foi interrompida com uma solução de H₃PO₄ 1 M e as absorbâncias foram determinadas em 450nm (Multiskan GO, Thermo Scientific).

Curvas padrões de cada uma das citocinas foram utilizadas para quantificar as citocinas presentes nas amostras e os resultados foram expressos em picogramas (pg) de citocina/mg de pele.

3.2.3.8 Avaliação do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP) na pele

O método FRAP baseia-se no fato que a habilidade de um composto em produzir Fe²⁺ a partir de Fe³⁺ define sua força antioxidante. O complexo Fe²⁺-TPTZ tem uma cor azul intensa e pode ser monitorado, a 593 nm, em espectrofotômetro. A vitamina C e o ácido úrico, por ex., reduzem Fe³⁺ a Fe²⁺. (VASCONCELOS, et al., 2007).

O método de FRAP é de baixo custo, os reagentes são de simples preparo, os resultados são altamente reproduzíveis, o procedimento é direto e rápido. Além disso, o método oferece um suposto valor de potencial antioxidante, ou redutor, de fluidos biológicos utilizando-se uma tecnologia acessível a laboratórios e pesquisadores que se interessem por estresse oxidativo e seus efeitos (BENZIE & STRAIN, 1996).

As amostras de pele dos animais (aproximadamente 30 mg) foram coletadas em microtubos contendo 500 μ L de KCl 1,15%. Para a realização do ensaio, as amostras foram trituradas com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec). Em seguida, foram centrifugadas a 1.000 xg por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado para a análise. Para a reação foram adicionados em microplaca contendo 96 poços, 30 μ L do sobrenadante e 150 μ L de reagente FRAP.

O branco foi preparado com 30 μL de KCl a 1,15% e 150 μL do reagente de 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 com 2,5 mL de cloreto de ferro hexahidratado 20mM e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH 3,6), e esta solução foi incubada a 37°C por 30 min antes do uso. A microplaca foi lida em espectrofotômetro a 595 nm (EnSpire, Perkin Elmer). Foi realizada o preparo de uma curva padrão utilizando-se diferentes concentrações de trolox (antioxidante análogo solúvel da vitamina E) de 0,5 a 20 nmol. Os resultados foram expressos como nmol equivalente de Trolox/mg de pele (KATALINIC *et al.*, 2005).

3.2.3.9 Avaliação do poder antioxidante pelo ensaio de sequestro do radical 2,2',azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)

O método ABTS baseia-se na inibição por antioxidantes do cátion radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio) (ABTS^{•+}), que apresenta absorvância característica primária em 415nm e absorções secundárias em 660, 734 e 820nm (VASCONCELOS, *et al.*, 2007). Trata-se de uma método aplicável tanto para antioxidantes lipofílicos como também para os hidrofílicos (RE, *et al.*, 1998).

Para a reação de ABTS, as amostras foram homogeneizadas em 400 μL de KCl a 1,15% com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec) e centrifugadas a 1.000 xg por 10 min a 4°C, posteriormente o sobrenadante foi utilizado para análise.

A solução de ABTS foi preparada após reagir 7mM da solução de ABTS com 2,45mM de persulfato de potássio resultando no cátion ABTS⁺. A mistura foi armazenada em frasco âmbar e em geladeira por no mínimo 16 horas antes do uso. Após as 16 horas, a solução de ABTS foi misturada com tampão fosfato até atingir a absorvância de 0,8 em 730 nm. Foi adicionado, na microplaca, 7 μL do sobrenadante e 200 μL da solução de ABTS diluída. O branco era composto apenas do tampão. Após 6 minutos de reação, foi realizada a leitura em 730nm (EnSpire, Perkin Elmer). Uma curva padrão foi preparada com diferentes concentrações de trolox (0,01 a 20 nmol) e os resultados foram expressos em nmol equivalente de trolox/mg de pele (KATALINIC *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2015).

3.2.3.10 Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno glutathiona (GSH)

Glutathiona é um tripeptídeo, comumente o tiol mais prevalente no meio intracelular, conhecido por agir direta ou indiretamente em muitos fenômenos biológicos de grande importância, dentre os quais, atua protegendo a célula contra espécies reativas de oxigênio e radicais livres. Além do mais, a glutathiona atua como coenzima em diversas reações; ele se liga a compostos externos (por exemplo: fármacos) e com substâncias endógenas (por exemplo: estrogênios, prostaglandinas, leucotrienos) participando desta forma do seu metabolismo. Os procedimentos analíticos para a quantificação de GSH têm como base a reação da quebra da ligação do ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) pelo grupo sulfidril da glutathiona, que gera o ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico, o qual é mensurado para obtenção dos resultados (MEISTER & ANDERSON, 1983).

As amostras de pele dos animais foram coletadas em microtubos e posteriormente diluídas (1:4) em EDTA 0,02 M e trituradas em homogeneizador 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 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 2.700 xg por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante final foi retirado para análise.

Para o ensaio de quantificação dos níveis de GSH na pele foram adicionados 50 µL do último sobrenadante em microplaca com o meio reacional contendo 100 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e 5 µL de uma solução de 1,9mg/mL de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) em metanol. Após 5 minutos de incubação, a leitura da microplaca foi realizada no espectrofotômetro (EnSpire, Perkin Elmer) em 405 nm. Foi preparada uma curva padrão com 5 a 150 µM de GSH. Os resultados foram expressos em µM de GSH/ mg de pele (SRINIVASAN *et al.*, 2007; MARTINEZ *et al.*, 2015).

3.2.3.11 Avaliação da atividade da catalase (CAT)

O peróxido de hidrogênio é um metabólito comumente presente no meio celular assim como uma potencial espécie reativa de oxigênio que pode vir a causar

dano oxidativo tecidual (PERCY, 1984). A catalase é uma enzima antioxidante mediadora do processo de redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio (FERNANDO, et al., 2016). Elevados níveis de estresse oxidativo induzido por radiação UVB são acompanhados pela diminuição da atividade da enzima catalase (RAMACHAND, PRASSAD & KARTHIKEYAN, 2010).

As amostras de pele dos animais (aproximadamente 100 mg) foram coletadas em microtubos e diluídas em 500 µL de EDTA 0,02 M. Em seguida, foram trituradas (Tissue-Tearor - Biospec) e o homogenato foi centrifugado a 2.700 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recentrifugado a 2.700 xg por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante final foi retirado para análise.

A determinação da atividade da CAT na pele foi realizada em microplaca de 96 poços por meio da adição de 10 µL de amostra, 160 µL de tampão Tris-HCl 1M com EDTA 5 mM pH 8.0, 20 µL de água deionizada e 20 µL de H₂O₂ 200 mM. Ao teste foi incluído um branco para cada amostra preparado com 10 µL de amostra, 180 µL de tampão Tris-HCl 1M com EDTA 5 mM pH 8.0 e 20 µL de água deionizada. A velocidade com que o H₂O₂ é reduzido pela ação da CAT foi avaliada por meio da diminuição no valor da absorbância pela diferença entre a leitura inicial e a leitura 30 segundos após a adição do H₂O₂ 200 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (EnSpire, Perkin Elmer) em 240 nm com temperatura mantida em 25 °C. Os valores de catalase foram expressos como unidade de catalase/mg de pele/minuto.

3.2.3.12 Avaliação da produção de ânion superóxido (O₂^{•-})

As propriedades eletrônicas intrínsecas dos elétrons desemparelhados de oxigênio facilitam sua interação com diversas moléculas reguladoras de processos bioquímicos no organismo (HECK *et al.*, 2003). O ânion superóxido é uma molécula de oxigênio com as características anteriormente descritas, produzido pela mitocôndria durante a cadeia transportadora de elétrons (ou cadeia respiratória), sendo que, a exposição à radiação solar pode aumentar sua produção de maneira que os mecanismos de defesa do organismo sejam insuficientes para contê-la e o excesso do íon formado pode vir a causar diversos danos celulares referentes à sua forte capacidade tanto de interagir com moléculas orgânicas como também de servir

como substrato para reações enzimáticas que resultam na produção de outras espécies reativas de oxigênio (TULAH & BIRCH-MACHIN, 2013).

A avaliação da produção de ânion superóxido foi realizada usando o ensaio de redução de *nitroblue tetrazolium* (NBT) (CAMPANINI *et al.*, 2013). As amostras de pele dos animais (aproximadamente 100mg) foram coletadas em microtubos, homogeneizadas em 500 µL de EDTA 0,02 M com homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec), centrifugadas a 2000 xg por 20 segundos e o sobrenadante foi retirado para a análise.

Para a reação 50 µL do sobrenadante foi incubado em placas de 96 poços por 1 hora. Em seguida o sobrenadante foi cuidadosamente removido e às células fixadas foi adicionado 100 µL de NBT (1 mg/mL). Após 15 minutos o sobrenadante foi cuidadosamente removido e ao precipitado foram adicionados 20 µL de metanol 100% para fixar, 120 µL de KOH 2 M e 140 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar as partículas de formazan (NBT reduzido) presentes dentro das células. A redução do NBT foi determinada espectrofotometricamente em 620 nm e os resultados foram apresentados como densidade óptica (OD)/10 mg de pele.

3.2.3.13 Avaliação da produção de hidroperóxido (LOOH)

A peroxidação lipídica está relacionada à patogênese de diversas doenças. Ácidos e ésteres de gordura poli-insaturada são os maiores alvos de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A oxidação destes ácidos e ésteres em membranas celulares desempenham um importante papel na ocorrência do estresse oxidativo. A extensão da peroxidação lipídica tem sido mensurada por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, aos próprios hidroperóxidos lipídicos e aos seus produtos de degradação como o malondialdeído e o 4-hidroxi-trans-2-nonenal (OKIMOTO, *et al.*, 2000).

A avaliação da produção de hidroperóxidos foi realizada por quimiluminescência descrita por Martinez *et al.* (2015). As amostras de pele dos animais (aproximadamente 100 mg) foram coletadas em microtubos e homogeneizadas em 800 µL de tampão fosfato (pH 7,4) com homogeneizador de tecidos (Tissue-Tearor - Biospec). Em seguida, foram centrifugadas a 700 xg por 2 minutos a 4 °C e 250 µL do sobrenadante foram adicionados a 1730 µL de meio de reação (KCl 120mM, tampão fosfato pH 7,4 30 mM) e 20 µL de tert-butil

hidroperóxido 3 mM. Este ensaio foi realizado em contador β marca Beckman[®] LS 6000 (Fullerton, CA, EUA) em uma faixa de contagem não coincidente com a resposta entre 300 e 620 nm. Todo o experimento foi realizado ao abrigo da luz para evitar a fosforescência dos frascos, a 30 °C, durante 120 minutos. Os resultados foram medidos em contagem por minuto (cpm) por mg de pele.

3.3. Análise estatística dos resultados

Todos os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) com um fator seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey e apresentados pela média \pm erro padrão da média (EPM) de mensurações feitas com 5 animais em cada grupo por experimento. As análises foram realizadas usando-se o software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGO CIENTÍFICO

4.1 Therapeutic potential of pimaradienoic acid against UVB-induced skin damage in hairless mice

Photochemical & Photobiological Sciences

Camila da Rocha,^a David L. do Vale,^a Renata M. Martinez,^a Cristina P. B. Melo,^a Talita I. C. Cezar,^a Nilton S. Arakawa,^a Marcela M. Baracat,^a Sandra R. Georgetti,^a Waldiceu A. Verri Jr.,^b Rúbia Casagrande^{*a}

^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Avenida Robert Koch, 60, Hospital Universitário, 86039-440 Londrina, Paraná, Brazil

^b Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 80, PR445, Cx. Postal 10.011, 86057-970, Londrina, Brazil

* Corresponding author. Address: Avenida Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86039-440 Londrina, Paraná, Brazil. Tel.: +55 43 33712475. E-mail address: rubiaca@yahoo.com.br (R. Casagrande).

ABSTRACT

The Pimaradienoic acid (PA; *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid) (PA), a pimarane diterpene found in plants like *Viguiera arenaria* Baker (Asteraceae), *Aralia continentalis* and *Aralia cordata* has been demonstrated activities such as antibacterial and antischistosomal effects and vasodilation, anticancer, antioxidant and anti-inflammatory effects. Herein, we evaluated the antioxident and anti-inflammatory properties of PA on the prevention and treatment of the skin damage induced by ultraviolet B radiation in hairless mice. PA, previously dissolved in saline, was administered by oral doses of 1, 3 and 10mg/kg. Besides treated groups, it were included the irradiated control group and the non-irradiated control group. The skin sample were collected from the dorsal part of mice accordingly sampling times. The evaluated targets were skin edema, myeloperoxidase (MPO) and metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, dosage of cytokines IL-1, IL-10 e TNF- α , the power evaluation antioxidant iron reducer (FRAP) in skin, antioxidant power by radical sequestration assay 2,2'azinobis (3-sulfonic ethylbenzothiazoline-6 acid) (ABTS), quantification of endogenous antioxidant (GSH), levels of the of endogenous antioxidant catalase (CAT), the production of superoxide anion (O $_2^{\cdot-}$) and hydroperoxides (LOOH). PA reduced skin edema and MPO activity, it also inhibited the increased of MMP-9 activity induced by UVB. In addition, PA showed to inhibit the skin antioxidant capacity resulted from UVB radiation, this capacity was measured by FRAP, ABTS and GSH assays. PA demonstrated to inhibit the production of superoxide anion and the lipid peroxidation (LOOH). PA inhibits the UVB-induced cytokine release. Concluding, the obtained results showed that PA demonstrated antioxidant and anti-inflammatory activity in model of UVB radiation-induced inflammation and oxidative stress.

Keywords: Diterpenes; Pimaradienoic acid; Antioxidant; Inflammation.

1. Introduction

The skin is the largest human organ and act as a protective barrier, preserving water within the body, preventing infection and protecting against ultraviolet (UV) radiation via efficient antioxidant mechanisms.^{1,2} The cutaneous antioxidant defense is composed by glutathione, tocopherol, ascorbic acid and protective enzymes, such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase.^{3,4} Nevertheless, excessive solar exposure can leads to imbalance of that natural antioxidant system present in the skin mediated by the over generation of reactive oxygen species (ROS), that disruption of intracellular redox homeostasis (oxidative stress). ROS are oxidant molecules, such as superoxide anion radical, hydrogen peroxide and hydroxyl radical that possess properties of excited oxygen electrons, facilitating their interactions with cellular molecules like DNA, lipids and proteins. The higher energy shorter solar wavelengths comprising the UVB spectra, between 280-320nm, are the most dangerous to the skin.⁵ The UV radiation induced generation of ROS and DNA damage that result in cellular damage, inflammation, immunosuppression and extracellular matrix remodeling (increasing matrixmetalloproteinases and reducing structural collagen and elastin) which can lead to development of photoaging and photocarcinogenesis.⁶

The blockade of UV incidence with sunscreens or physical blockers, removal of ROS with antioxidant agents and the use of anti-inflammatory agents are some photoprotective strategies.⁶ Several studies have been investigated the prophylactic and therapeutics effects of the antioxidant agents in diseases related to oxidative stress. Looking for supplementation of antioxidants as a strategy to counteract the deleterious effects generated from excessive exposure to UV radiation, several extracts or isolated substances from different parts of vegetables have been used not only as antioxidants but also as anti-inflammatory compounds.^{6,7}

Among the phytochemical derivatives with antioxidant properties are different chemical groups, for example catechins, flavonoids, proanthocyanidins, anthocyanins, phenolic acids, stilbenes, carotenoids and diterpenes.^{6,8} A diterpene that have been demonstrated antioxidant and anti-inflammatory activities is the Pimaradienoic acid (PA; *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid), a pimarane diterpene found in herbs like *Viguiera arenaria* Baker (Asteraceae), *Aralia continentalis* and *Aralia cordata*.^{8,9,10} Many studies have indicated pharmacological activities for PA, among them are antibacterial and antischistosomal effects, vasodilation, anticancer and anti-inflammatory activities in addition to DNA topoisomerase inhibitory property.^{10,11,12}

The strategy that has been more applied to prevent the deleterious effects of UV radiation is to prevent its incidence on the skin, thus, physical blockers and screens are the most widely accepted and used countermeasures. With the characteristic difficulties finding on the use of these strategies, like frequent necessity of replenishment and the risk of Vitamin D deficiency, once the cutaneous exposure to UVB irradiation is an important source of vitamin D, the searching for oral formulations have been growth throughout the years.⁶ Due to the therapeutic evidences demonstrated by PA and to the absence of earlier studies on UV induced cutaneous damage, in the present study were investigated the anti-inflammatory and antioxidant effects and mechanisms of PA against the skin damages in model of UVB radiation-induced inflammation and oxidative stress.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Brilliant blue R, reduced glutathione (GSH), hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), N-ethylmaleimide, o-dianisidine dihydrochloride, phenylmethanesulfonyl fluoride, thiobarbituric acid (TBA), phenanthroline, 2,2-diphenyl-1-(picrylhydrazyl) (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ), trolox, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), bisacrylamide and nitroblue tetrazolium (NBT), all of them obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pimaradienoic acid, *Bathophenanthroline (BPS)* and *tert*-Butyl hydroperoxide from Acros (Pittsburg, PA, USA). Isoflurane from Abbott (Chicago, IL, USA). ELISA kits for determination of cytokine were obtained from eBioscience (San Diego, CA, USA). Xylene cyanol and hydroxymethyl aminomethane (Tris) were obtained from Amresco (Solon, OH, USA). Acrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS), glycerol. All other reagents used were of pharmaceutical grade.

2.2 Plant material

M. Magenta collected *Viguiera arenaria* Baker (Asteraceae) at Itirapina – SP (22°13' S, 47°54' W, SP, Brazil), identified the plant material, and deposited a voucher specimen under the code SPF #61 in the herbarium of the University of São Paulo (SP, Brazil). Prof. F. B. Costa gently provided the plant material, to isolate the pimaradienoic acid.

2.3 Extraction and isolation of pimaradienoic acid

Extraction of air-dried tuberous roots (980 g) from *Viguiera arenaria* was with CH₂Cl₂ for 30 minutes using an ultrasonic bath to yield 82 g of crude extract. After suspension in MeOH:H₂O (9:1, v/v), the crude extract was exhaustively washed with hexane and CH₂Cl₂ to yield 39.5 g (hexane phase) and 25.0 g (CH₂Cl₂ phase). The hexane phase was chromatographed over Si gel using vacuum liquid chromatography to yield six fractions: F1 (0.5 g), F2 (13.3 g), F3 (14.2 g), F4 (5.3 g), F5 (2.4 g) and F6 (3.6 g). Fraction F2 furnished the diterpene Pimaradienoic acid. Isolation and purification steps were carried out by flash chromatography (hexane-EtOAc), PTLC (Si gel, hexane-EtOAc or hexane-CHCl₃) and recrystallization with MeOH. The structure of the diterpene was established by comparison of the ¹H and ¹³C NMR spectral data with those reported in the literature.

2.4 Evaluation *in vivo* of effects of Pimaradienoic acid in photooxidative damage induced by UVB radiation

Animals. Were applied sex matched hairless mice (HRS/J), weighing between 20-30 g, obtained from the University Hospital of Londrina State University. The animals were maintained in a room with free access to water and food and at a controlled temperature and a 12 h light and 12 h dark cycles. This project was approved and executed according to the rules fixed by the Animal Ethics Committee (Of. Circ. CEUA n° 242/2012, process CEUA n° 21103.2012.95) of the Londrina State University.

Experimental protocol. The hairless mice were randomly designed to five different groups with five mice each one:

- **Group 1:** non-irradiated control group, which didn't receive neither irradiation nor drug administration;
- **Group 2:** irradiated control group, which received UV irradiation treatment but without drug administration;
- **Group 3:** irradiated group and treated with pimaradienoic acid in oral dose of 1mg/Kg;
- **Group 4:** irradiated group and treated with pimaradienoic acid in oral dose of 3mg/Kg;
- **Group 5:** irradiated group and treated with pimaradienoic acid in oral dose of 10mg/Kg;

Pimaradienoic acid was administrated orally to mice by gavage method. The three different concentrated solutions containing the drug were prepared immediately before each treatment dissolving PA (previously dissolved in DMSO) in a sterile normal saline (0.90%). The animals were treated 12 h, 6 h, immediately before and 6 h after the beginning of UVB irradiation session.¹³ The concentration of pimaradienoic acid used in this study was determined according on an anti-inflammatory and antioxidant activity study reported previously.¹⁴

2.5 Irradiation

The lamp employed as UVB source 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 put, resulting in an irradiation of 0.384 mW/cm^2 as measured by an IL 1700 radiometer (Newburyport, MA, USA) equipped with sensor of UV (SED005) and UVB (SED240). The radiation dose applied for induction of inflammation and oxidative stress was 4.14 J/cm^2 .^{13,15} The mice were terminally anesthetized with 1.5% isoflurante 12 h (for edema, GSH, FRAP and ABTS tests), 2h (for catalase and NBT tests) or 4 h (for cytokine and lipid peroxidation tests) after the UVB exposure, and the full dorsal skins was removed and stored at -80°C to further analysis. The sample collected to analyzing cutaneous edema was weighed just when removed and were not frozen.^{13,15}

2.6 Skin edema

Many studies have been demonstrated that UVB exposure results on skin edema, which is regarded as a marker of UV damage, we evaluated the protective effect of pimaradienoic acid on UVB-mediated cutaneous edema.⁷ Thus, an increase in the dorsal skin weight of mice can indicate the occurrence of edema. Immediately before UV irradiation, the dorsal skin was removed and a constant area (5 mm diameter) was delimited with the aid of a mold, followed by weighing of this constant area. The analysis was performed comparing the skin weight of irradiated groups with that of non-irradiated groups and the results were expressed in mg of skin.¹⁵

2.7 Enzyme myeloperoxidase activity evaluation by recruitment of neutrophils

Myeloperoxidase (MPO) is a neutrophil enzyme which can generates hypohalous acids and free radicals. It is packaged in the azurophilic granules of neutrophils. It is also released into the extracellular space during chronic inflammation when neutrophils are activated.¹⁶ The neutrophil migration was indirectly evaluated by the MPO kinetic-colorimetric assay.⁸ The quantifying MPO was performed as follows: the sample of skin was homogenized in 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) using Ultra Turrax® (T18 basic, IKA). The homogenates were centrifuged at 11000 rpm for 2 min at 4°C . Withdrew 30 μL of the resulting supernatant and was dissolved with 200 μL of 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0), containing 0.0167% *o*-dianisidine dihydrochloride and 0.05% hydrogen peroxide. The absorbance was determined after 20 min incubation at 450 nm (Enspire, Perkin Elmer®). The MPO activity of the sample was compared to a standard curve of neutrophils. The results are presented as MPO activity (number of neutrophils per milligram of skin).¹⁵

2.8 Analyses of metalloproteinase-9 (MMP-9) 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.^{13, 17} The dorsal skin of hairless mice (1:4, w/w dilution) was homogenized (Ultra Turrax® - T18 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 twice at 12000xg for 10 min at 4°C. The Lowry method was used to measure protein levels in skin homogenates¹⁸. Aliquots of 50 µL of samples were mixed with 10 µL of 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) containing 20% glycerol, 4% SDS and 0.005% xylene cyanol. For electrophoresis, 25 µL of the mixture was used were taken for electrophoresis in a gel containing 10% acrylamide and 0.025% 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 MMP-9 activity was analyzed by comparing the groups in the ImageJ software package (NIH, Bethesda, MD, USA).

2.9 Quantification of endogenous antioxidant (GSH)

It followed the method described elsewhere.^{13, 17, 19} Briefly, skin sample was homogenized in 0.02 M EDTA using a Ultra Turrax® (T18 basic, IKA) at a ratio 1:4 w/w dilution. Whole homogenates were treated with 50% trichloroacetic acid and centrifuged twice at 2700xg for 10 min at 4°C. The reaction mixture contained 50 µL of sample, 100 µL of 0.4 M Tris and 5 µL DTNB (1.9 mg/mL in methanol). The absorbance was determined after 5 min incubation at 405 nm (Enspire, Perkin Elmer®). The standard curve was prepared with GSH 5-150 µM. The results are presented as µM of GSH per mg of skin.

2.10 Levels of the of endogenous antioxidant catalase (CAT)

Was evaluated by measuring the decay in the concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂) and the generation of oxygen.²⁰ Skin sample was homogeneized in 500 µL of 0.02 M EDTA using Ultra Turrax® - (T18 basic, IKA), and centrifuged twice at 2700xg for 10 min at 4°C. The reaction mixture contained 10 µL sample, 160 µL buffer Tris-HCl 1 M with EDTA

5mM pH 8.0, 20 μ L of deionized water and 20 μ L H_2O_2 200 mM. Measurement of CAT activity was estimated through the difference between the initial reading and the reading performed 30 seconds after the addition of H_2O_2 at 240 nm in a microplate reader (EnSpire, Perkin Elmer) at 25°C. The CAT values were expressed as unit of CAT/mg of skin minute.

2.11 Antioxidant power by radical sequestration assay 2,2'-azinobis (3-sulfonic ethylbenzothiazoline-6 acid) (ABTS)

Approximately 30 mg of hairless mice skin was homogenized in 500 μ L of KCl (1.15%) using a Tissue-Tearor (Biospec 985370), centrifuged at 1000xg for 10 min at 4°C and the supernatant was used measuring 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 (7 μ L) was mixed on ABTS solution and after 6 min the absorbance was determined in 730 nm microplate reader (EnSpire, Perkin Elmer).²¹ Previously, a curve of trolox (0,01 a 20 nmol) was prepared and the results were expressed as equivalent nmol of Trolox/mg skin.

2.12 Power evaluation antioxidant iron reducer (FRAP) in skin

The sample of hairless mice skin was homogenized in 500 μ L KCl (1.15%) using a Tissue-Tearor (Biospec 985370), centrifuged at 1000xg for 10 min at 4°C and the supernatant was employed for measurement the antioxidant capacity of skin. The reaction consisted in adding the supernatant (30 μ L) to the FRAP reagent prepared with 0.3 mM acetate buffer pH 3.6, 10 mM TPTZ in 40 mM hydrochloride acid and 20 mM ferric chloride. The FRAP reagent was warmed up to 37°C for 30 min. The absorbance was determined at 595 nm (EnSpire, Perkin Elmer). Previously, a curve of trolox (0.5 – 20 nmol) was prepared and the results were expressed as equivalent nmol of Trolox/mg skin.²⁰

2.13 Evaluation of production hydroperoxides (LOOH)

Was performed by chemiluminescence as described previously.²² The samples of hairless mice skin were homogenized in 800 μ L of phosphate buffer (pH 7.4) using a Tissue-Tearor (Biospec 985370) centrifuged at 700xg at 4°C for 2 min and the supernatant (250 μ L) was diluted in 1730 μ L reaction medium (120 mM KCl, 30 mM phosphate buffer, pH 7.4) and mixed with 20 μ L de tert-butyl hydroperoxide 3mM. The reading was performed in a β -counter Beckman® LS 600 (Fullerton, CA, USA) in a non-coincident counting for 30 seconds

with a response range between 300 and 620 nm. The vials were kept in the dark up to the moment of the assay, and determinations were obtained in dark in order to avoid vial phosphorescence activated by light. The experiment was performed at 30°C for 2 hours. The results were measured in counts per min (cpm) per mg of skin.

2.14 Evaluation of the production of superoxide anion (O₂⁻)

The measurement of O₂⁻ production in the skin was performed using the nitroblue tetrazolium assay (NBT).²³ The samples of hairless mice skin were homogenized in 500 µL of 0,02 M EDTA using a Tissue-Tearor (Biospec 985370), centrifuged at 2000 g for 20 seconds at 4°C, the supernatant (50 µL) was incubated in microplate for 1 h. The non-adherent/non-precipitated supernatant was carefully removed, 100 µL of NBT (1 mg/mL) was added to each well and incubated over 15 min. NBT reaction medium was the carefully removed followed by fixation in methanol. Formazan particles were dissolved by adding 120 µL of KOH 2 M and 140 µL of dimethylsulfoxide. Reduction of NBT to formazan was measured at 600 nm using a microplate spectrophotometer reader (EnSpire, Perkin Elmer) and the results are presented as optical densisty (OD) per 10 mg of skin.

2.15 Dosage of pro-inflammatory cytokines: TNFα, IL-1β and IL-10

The samples of hairless mice skin were homogenized in 500 µL of saline solution using Tissue-Tearor (Biospec 985370), centrifuged at 2000xg for 15 min at 4°C and stored at -80°C for further use. The supernatant was used to measure the cytokine levels by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to manufacture's instructions (eBioscience).¹³ The absorbance was determined at 450 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific). The standard curves for each cytokine were used to quantify each cytokine present in the samples and the results were expressed as pictograms (pg) cytokine/mg skin.²⁴

2.16 Statistical analysis

Results were analysed by GraphPad Prism® software package, version 4.00 and expressed as means ± standard error of the mean (SEM). *In vitro* data represent triplicate analysis per experiment and are representative of two separate experiments. *In vivo* results are presented of 5 mice per group per experiment and are representative of two separated experiments. The differences were evaluated by ANOVA followed by Tukey's test. Results were considered significantly different when $p < 0.05$.

3. 3. Results

3.1 *In vivo* effect of PA against UVB-induced inflammation and oxidative stress

3.1.1 Pimaradienoic acid inhibits UVB radiation-induced skin edema and MPO activity

UVB exposure can lead to an inflammatory process with characteristic skin edema and neutrophil infiltration.^{7,8} Once neutrophil recruitment can be indirectly measured by the MPO kinetic-colorimetric assay, the anti-inflammatory action of pimaradienoic acid was first evaluated by the edema assay and MPO activity.⁸ UVB radiation induced significant increase of skin edema and neutrophil recruitment in untreated irradiated mice. The UVB radiation-induced skin edema (Fig. 1A) was significantly inhibited by per oral treatment pimaradienoic acid at the dose of 10mg/kg only. On the other hand, all doses of pimaradienoic acid inhibited UVB radiation-induced increase of MPO activity. (Fig. 1B).

3.1.2 Pimaradienoic acid inhibits UVB radiation-induced skin MMP-9 activity

Metalloproteinase 9 (MMP-9) is also known as type V collagenase or gelatinase, and participates in many biological processes such as development, morphogenesis, regeneration and wound healing.²⁵ In this study, MMP-9 activity in the skin was induced by UVB exposition and it was inhibited by pimaradienoic acid (Fig. 2).

3.1.3 Pimaradienoic acid inhibits UVB radiation-induced decrease of skin antioxidants

To evaluate the antioxidant effect of pimaradienoic acid in the skin, firstly, we analyzed FRAP and ABTS radical scavenging capacity. In both assays, the pimaradienoic acid dose of 10mg/kg inhibited the UVB radiation-induced antioxidant depletion (Fig. 3A and 3B). Furthermore, treatment with pimaradienoic acid at the dose of 10mg/kg also inhibited UVB radiation-induced GSH (Fig. 3C) and catalase activity (Fig. 3D) depletion. No effect was observed by oral doses of pimaradienoic acid 1 and 3mg/kg.

3.1.4 Pimaradienoic acid inhibits UVB radiation-induced hydroperoxides (LOOH) and superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) production

To obtain more evidences about antioxidant activity of pimaradienoic acid, the production of LOOH and $O_2^{\cdot-}$ were evaluated. The reaction of $O_2^{\cdot-}$ with H_2O_2 generates

hydroxy radical, which in turn induces lipid peroxidation (LPO).²⁶ The treatment with 10mg/kg of pimaradienoic acid inhibited UVB radiation-induced LPO (Fig. 4A), an effect that was not observed with the other doses of the diterpene. Furthermore, pimaradienoic acid also inhibited UVB radiation-induced $O_2^{\cdot-}$ production only in the dose of 10mg/kg (Fig. 4B).

3.1.5 Pimaradienoic acid inhibits UVB radiation-induced cytokine production

UVB radiation induces the production of pro-inflammatory cytokines in the skin such as IL-1 β and TNF- α and of the anti-inflammatory cytokine IL-10.²⁷ All doses of pimaradienoic acid inhibited UVB radiation-induced IL-1 β (Fig. 5A), TNF- α (Fig. 5B) and IL-10 (Fig. 5C) production.

4. Discussion

The excessive exposure to UVB radiation induces inflammation and oxidative stress, which can ultimately lead to skin cancer.²⁸ Nowadays, there is a tricky situation in which we have been exposed to higher doses of UV radiation due to depletion of ozone in the atmosphere, and on the other hand, the increase of life expectancy comes with age-associated consequences such as the necessity of sun light exposure by persons affected by osteoporosis. Therefore, understanding UVB radiation effects and pharmacological susceptibility is important to prevent its long term consequences. In addition to the current use of physical blockers and screens to protect skin, oral treatment with anti-inflammatory and antioxidants compounds are considered promising therapeutic approaches.^{6,29} The diterpene pimaradienoic acid have been appointed as an anti-inflammatory and antioxidant phytochemical derivative in other models of inflammation. Therefore, we aimed to investigate the efficacy of pimaradienoic acid in UVB radiation-induced skin inflammation and oxidative stress.^{8, 9, 14, 30}

Firstly, we observed the protective effect of pimaradienoic acid in UVB-induced cutaneous edema and the neutrophil migration (MPO activity). Interestingly, a dissociation of the anti-edematogenic and anti-chemoattractive effects of pimaradienoic acid was observed since only the dose of 10mg/kg of pimaradienoic acid inhibited UVB-induced edema and all three doses (1, 3 and 10mg/kg) inhibited MPO activity increase. Therefore, it is likely that the mechanisms of pimaradienoic acid may slightly vary depending on the parameter under evaluation or that different parameters have varied susceptibility to pimaradienoic acid. In agreement with the present data, pimaradienoic acid also inhibited carrageenan-induced paw edema in doses such as 10¹⁴ and 100mg/kg.⁹ Pimaradienoic acid also inhibited carrageenan-induced neutrophil recruitment to the peritoneal cavity in a dose-dependent manner with significant effect with the dose of 10mg/kg, which also inhibited carrageenan-induced MPO activity in the paw skin.⁸ Thus, the inhibition of edema and neutrophil recruitment is a consistent effect of pimaradienoic acid. Importantly, the analgesic effect of pimaradienoic acid occurs without inducing liver or gastric side effects in a protocol using seven days of treatment, therefore, supporting the safety of pimaradienoic acid in common treatment regimen.¹⁴

Pimaradienoic acid inhibited UVB radiation-induced skin metalloproteinase 9 (MMP-9) activity was measured. The oral doses containing 1, 3 and 10mg/kg of pimaradienoic acid UVB radiation-induced a decrease in the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity with a similar profile as for MPO activity. This is an interesting point since neutrophils express MMP-9 and are important sources of this metalloproteinase during UVB radiation-induced

skin inflammation.²² Evidence shows that other diterpenes also inhibited TNF- α -induced human aortic smooth muscle cells migration and MMP-9 expression,³¹ and colon cancer expression of MMP-2 and MMP-9.³² Thus, targeting MMP is a consistent effect among diterpenes.

UVB radiation-induced skin damage depends on oxidative stress.^{22,23} Herein, pimaradienoic acid inhibited UVB radiation-induced decrease of endogenous antioxidant defenses observed as preservation of ferric reducing ability, ABTS scavenge activity, GSH levels and catalase activity. Pimaradienoic acid also inhibited UVB radiation-induced lipid peroxidation and superoxide anion production. Interestingly, superoxide anion induces skin edema and pimaradienoic acid inhibited UVB radiation-induced skin edema and superoxide anion production at the same dose.³³ We have also observed that pimaradienoic acid inhibits carrageenan-induced paw skin and peritoneal exudate oxidative stress.⁸ Nevertheless, pimaradienoic acid has low antioxidant effect *per se* with an IC₅₀ > 100 μ g/mL to scavenge the DPPH radical *in vitro*.³⁴ Therefore, there is great possibility that the *in vivo* antioxidant effect we observed is an indirect effect as a consequence of the anti-inflammatory activity of pimaradienoic acid. Furthermore, the *in vivo* antioxidant effect (direct or indirect) seems to be also a consistent effect of diterpenes as observed for kahweol and cafestol, which inhibited lipid peroxidation and superoxide anion production.³⁵

The ability of pimaradienoic acid to inhibit cytokine production might be a result of inhibiting NF κ B activation, which was demonstrated *in vitro* and *in vivo*. Pimaradienoic acid inhibited NF κ B and mitogen-activated protein kinase activation and as a consequence inhibited the expression of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 (COX-2) and IL-6 in cultured macrophages.³⁶ *In vivo*, pimaradienoic acid inhibited carrageenan-induced paw skin activation of NF κ B.¹⁴ The NF κ B is also responsible for the expression molecules related to oxidative stress such as gp91phox, a NADPH oxidase component involved in the production of superoxide anion during UVB inflammation.³⁷

All doses of pimaradienoic acid inhibited UVB radiation-induced production of IL-1 β , TNF- α and IL-10 in the skin. IL-1 β and TNF- α are chemoattractant cytokines with relevant role in the pathogenesis of inflammatory diseases.³⁸ In this sense, the inhibition profile of pimaradienoic doses over MPO activity, and IL-1 β and TNF- α lines up well. Pimaradienoic acid also inhibited carrageenan-induced peritoneal production of IL-1 β and TNF- α and paw skin production of IL-1 β , TNF- α and IL-33.^{8,14} Pimaradienoic acid also inhibited the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10, which has an endogenous role as a down regulator of IL-1 β and TNF- α production.³⁹ IL-10 is co-released with pro-inflammatory to limit

inflammation. Nevertheless, a reduction in the pro-inflammatory cytokine production may result in a reduction of IL-10 production since its anti-inflammatory actions are not required.³⁹

The dose of 10mg/kg of PA was the concentration that demonstrated the higher potential not only in the assays that its antioxidant properties were tested but also when the compound demonstrated to inhibit the inflammatory targets induced by ultraviolet B radiation in skin damage.

To our knowledge, this is the first study to demonstrate that pimaradienoic acid inhibits UVB radiation-induced skin inflammation and oxidative stress, therefore, establishing this diterpene as a conceivable therapeutic agent.

Acknowledgements

The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária and Parana State Government. We thank the technical assistance of Denise Duarte from Post-graduation Laboratory of UEL. Authors declare no conflict of interest.

References

- 1 P. M. D. J. Fernando, M. J. Piao, S. R. K. M. Hewage, H. K. Kang, E. S. Yoo, Y. S. Koh, M. H. Ko, C. S. Ko, S. H. Byeon, S. R. Mun, N. H. Lee and J. W. Hyun, *Env. Toxicol. Pharmacol.*, 2016, **43**, 112-119.
- 2 K. H. Kim, S. J. Park, Y. J. Lee, J. E. Lee, C. H. Song, S. H. Choi, S. K. Ku and S. J. Kang, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2015, **116**, 73-86.
- 3 G. H. Jin, Y. Liu, S. Z. Jin, X. D. Liu and S. Z. Liu, *Radiat. Environ. Biophys.*, 2007, **46**, 61-68.
- 4 A. Tomaino, M. Cristani, F. Cimino, A. Speciale, D. Trombetta, F. Bonina and A. Saija, *Toxicol. in Vitro*, 2006, **20**, 1395-1402.
- 5 D. E. Heck, A. M. Vetrano, T. M. Mariano and J. D. LaskinVitale, A. Kisslinger, S. Paladino, C. Procaccini, G. Matarese, G. M. Pierantoni, F. P. Mancini and D. Tramontano, *J. Biol. Chemis.*, 2003, **278**, 22432-22436.
- 6 R. Bosch, N. Philips, J. A. Suárez-Pérez, A. Juarranz, A. Devmurari, J. Chalensouk-Khaosaat and S. González, 2015, **4**, *Antioxidants*, 248-268.
- 7 F. Afaq, V. M. Adhami and N. Ahmad, *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 2003, **186**, 28-37.
- 8 S. S. Mizokami, M. S. N. Hohmann, L. Staurengo-Ferrari, T. T. Carvalho, A. C. Zarpelon, M. I. Possebon, A. R. Souza, R. C. S. Veneziani, N. S. Arakawa, R. Casagrande, W. A. Verri, 2016, **11**, *PloS One*, 1-17.
- 9 H. Lim, H. A. Jung, J. S. Choi, Y. S. Kim, S. S. Kang and H. P. Kim, 2009, **32**, *Arch. Pharm. Res.*, 1237-1243.
- 10 H. Tanabe, T. Yasui, H. Kotani, A. Nagatsu, M. Makishima, S. Amagaya and M. Inoue, 2014, **22**, *Bioorg. Med. Chem.*, 3204-3212.
- 11 M. E. Severiano, M. R. Simão, H. P. Ramos, R. L. T. Parreira, N. S. Arakawa, S. Said, N. A. J. C. Furtado, D. C. R. Oliveira, L. E. Gregório, C. R. Tirapelli, R. C. S. Veneziani and S. R. Ambrósio, 2013, **21**, *Bioorg. Med. Chem.*, 5870-5875.
- 12 T. S. Porto, A. A. Silva Filho, L. G. Magalhães, R. A. Santos, N. A. J. C. Furtado, N. S. Arakawa, S. Said, D. C. R. Oliveira, L. E. Gregório, V. Rodrigues, R. C. S. Veneziani and S. R. Ambrósio, 2012, **8**, *Chem. Biodivers.*, 1465-1474.

- 13 R. M. Martinez, F. A. Pinho-Ribeiro, V. S. Steffen, T. C. Silva, C. V. Caviglione, C. Bottura, M. J. Fonseca, F. T. Vicentini, J. A. Vignoli, M. M. Baracat, S. R. Georgetti, W. A. Jr. Verri and R. Casagrande, *PloS One*, 2016, **11**, 1-21.
- 14 M. I. Possebon, S. S. Mizokami, T. T. Carvalho, A. C. Zarpelon, M. S. N. Hohmann, L. Staurengo-Ferrari, C. R. Ferraz, T. H. Hayashida, A. R. Souza, S. R. Ambrosio, N. S. Arakawa, R. Casagrande and W. A. Jr. Verri, *J. Nat. Prod.*, 2014, **77**, 2488-2496.
- 15 R. M. Martinez, F. A. Pinho-Ribeiro, V. S. Steffen, C. V. Caviglione, D. Pala, M. M. Baracat, S. R. Georgetti, W. A. Jr. Verri and R. Casagrande, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2016, **15**, 554-563.
- 16 A. L. P. Chapman, T. J. Mocatta, S. Shiva, A. Seidel, B. Chen, I. Khalilova, M. E. Paumann-Page, G. N. L. Jameson, C. C. Winterbourn and A. J. Kettle, *J. Biol. Chem.*, 2013, **288**, 6465-6477.
- 17 S. R. Georgetti, R. Casagrande, F. T. Moura-de-carvalho Vicentini, W. A. Verri and M. J. V. Fonseca, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2006, **64**, 99-106.
- 18 O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265-275.
- 19 P. Srinivasan, K. E. Sabitha and C. S. Shyamaladevi, *Life Sci.*, 2007, **80**, 1080-1086.
- 20 K. S. Pallavi, V. Venkatesh, V. J. Hitesh, H. C. Gejjalagere, S. L. Virendra, B. M. Prashant, Y. N. Usha, S. R. Meka, K. Guruprasad, U. Nayanabhirama, M. R. Chamallamudi and M. Srinivas, *Int. J. Nanomedicine*, 2015, **10**, 6477-6491.
- 21 V. Katalinic, D. Modun, I. Music and M. Boban, *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 2005, **140**, 47-52.
- 22 R. M. Martinez, F. A. Pinho-Ribeiro, V. S. Steffen, C. V. Caviglione, J. A. Vignolis, D. S. Barbosa, M. M. Baracat, S. R. Georgetti, W. A. Verri and R. Casagrande, *J. Nat. Prod.*, 2015, **78**, 1647-1655.
- 23 M. Z. Campanini, F. A. Pinho-Ribeiro, A. L. Ivan, V. S. Ferreira, F. M. Vilela, F. T. Vicentini, R. M. Martinez, A. C. Zarpelon, M. J. Fonseca, T. J. Faria, M. M. Baracat, W. A. Verri, S. R. Georgetti and R. Casagrande, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2013, **127**, 153-160.
- 24 W. A. Verri, F. T. M. C. Vicentini, M. M. Baracat, S. R. Georgetti, R. D. R. Cardoso, T. M. Cunha, S. H. Ferreira, F. Q. Cunha, M. J. V. Fonseca and R. Casagrande, *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 2012, **36**, 297-330.

- 25 J. A. Manuel and B. Gawronska-Kozak, *Matrix Biology*, 2006, **25**, 505-514.
- 26 R. M. Martinez, F. A. Pinho-Ribeiro, V. S. Steffen, C. V. Caviglione, J. A. Vignoli, M. M. Baracat, S. R. Georgetti, W. A. Verri and R. Casagrande, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2015, **148**, 145-153.
- 27 T. Scholzen, M. Hartmeyer, M. Fastrich, T. Brzoska, E. Becher, T. Schwarz and T. A. Luger, *J. Invest. Dermatol.*, 1998, **111**, 50-56.
- 28 S. González and M. A. Pathak, *Photodermatol. Photoimmunol. and Photomed.*, 1996, **12**, 45-46.
- 29 F. McArdle, L. E. Rhodes, R. Parslew, C. I. A. Jack, P. S. Friedmann and M. J. Jackson, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **33**, 1355-1362.
- 30 O. H. Chang, H. S. Chae, J. G. Choi, Y. C. Oh, Y. S. Lee, J. H. Kim, M. J. Seung, H. J. Jang, K. H. Bae, J. H. Lee, D. W. Shin and D. Y. Kwon, *Eur. J. Pharmacol.*, 2008, **601**, 179-185.
- 31 S. S. Suh, C. H. Kwak, T. W. Chung, S. J. Park, M. Cheeeeei, S. S. Park, C. S. Seo, J. K. Son, Y. C. Chang, Y. G. Park, Y. C. Lee, H. W. Chang and C. H. Kim, *Chem. Biol. Interact.*, 2012, **199**, 112-119.
32. Y. M. LU, W. Chen, J. S. Zhu, W. X. Chen and N. W. Chen, *Mol. Med. Rep.*, 2016, **13**, 2235-2240.
- 33 N. A. Maioli, A. C. Zarpelon, S. S. Mizokami, C. Hohmann, F. A. Pinho-Ribeiro, T. T. Carvalho, M. F. Manchope, C. R. Ferraz, R. Casagrande and W. A. Verri, *Braz. J. Biol. Res.*, 2015, **48**, 321-331.
- 34 I. Komala, T. Ito, F. Nagashima, Y. Yagi and Y. Asakawa, *J. Nat. Med.*, 2010, **64**, 417-422.
- 35 K. J. Lee and H. G. Jeong, *Toxicol. Lett.*, 2007, **173**, 80-87.
- 36 O. H. Kang, H. S. Chae, J. G. Choi, Y. C. Oh, Y. S. Lee, J. H. Kim, M. J. Seung, H. J. Jang, K. H. Bae, J. H. Lee, D. W. Shin and D. Y. Kwon, *Eur. J. Pharmacol.*, 2008, **601**, 179-185.
- 37 F. A. Pinho-Ribeiro, V. Fattori, A. C. Zarpelon, S. M. Borghi, L. Staurengo-Ferrari, T. T. Carvalho, J. C. Alves-Filho, F. Q. Cunha, T. M. Cunha, R. Casagrande and W. A. Verri, *Inflammopharmacology*, 2016, **24**, 97-107.

38 W. A. Verri, F. O. Souto, S. M. Vieira, S. C. Almeida, S. Y. Fukada, D. Xu, J. C. Alves-Filho, T. M. Cunha, A. T. Guerrero, 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 and F. Q. Cunha, *Ann. Rheum. Dis.*, 2010, **69**, 1697-1703.

39 S. M. Borghi, F. A. Pinho-Ribeiro, A. C. Zarpelon, T. M. Cunha, J. C. Alves-Filho, S. H. Ferreira, F. Q. Cunha, R. Casagrande and W. A. Verri, *Exp. Physiol*, 2015, **100**, 531-544.

Figures

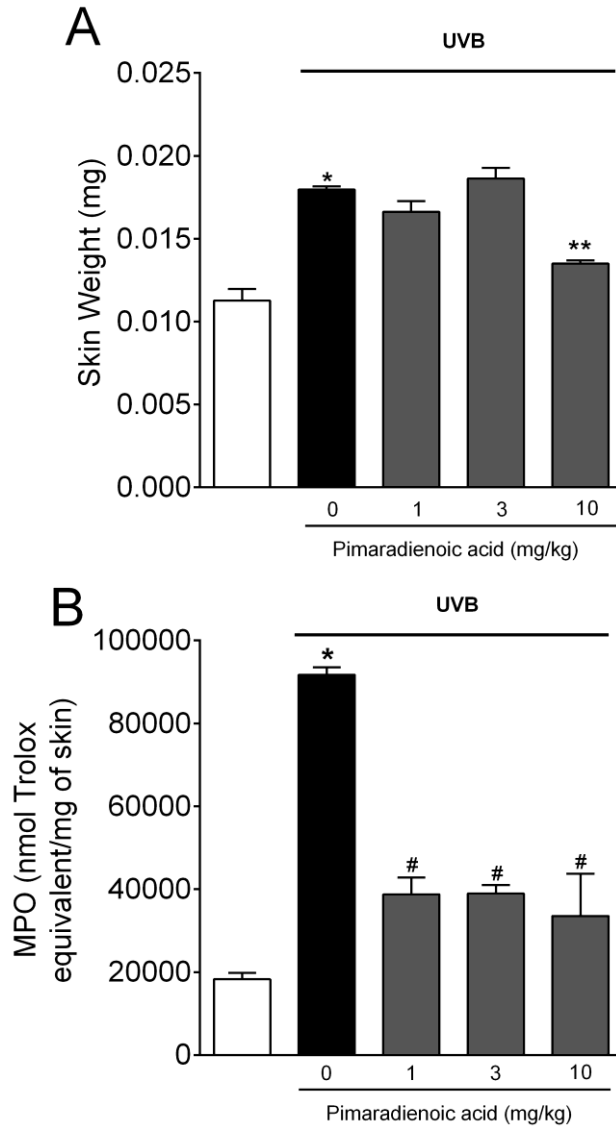


Fig. 1. Pimaradienoic acid reduces UVB radiation-induced skin edema and MPO activity. The skin edema (A) and MPO activity (B) were determined in samples collected 12 h after the end of radiation. Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; # $p < 0.05$ compared to the irradiated control group (vehicle); ** $p < 0.05$ compared to the irradiated control group and pimaradienoic acid 1 and 3mg/kg group.

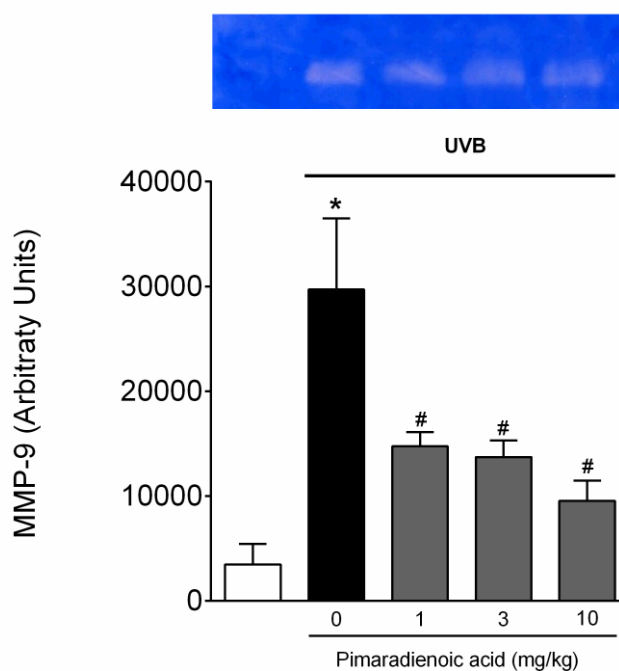


Fig. 2. Pimaradienoic acid inhibits UVB radiation-induced increase of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity. The MMP-9 activity was determined in samples collected 12 h after the end of radiation. (A) Image of gelatin zymography. (B) Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; # $p < 0.05$ compared to the irradiated control group (vehicle).

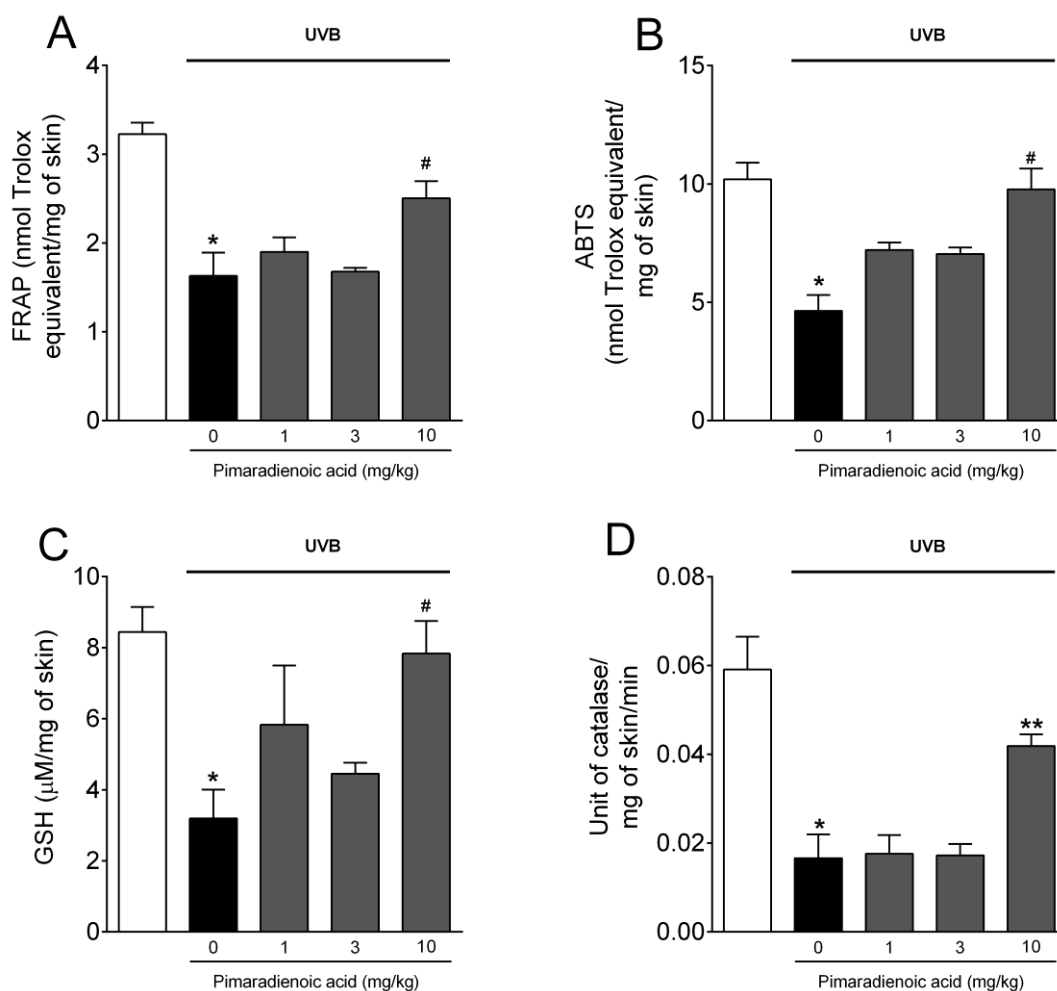


Fig. 3. Pimaradienoic acid inhibits UVB radiation-induced decrease of skin antioxidant capacity. The antioxidant capacity was determined by FRAP (A), ABTS (B), GSH (C) assays in samples collected 12 h after the end of radiation. The CAT assays (D) was determined in samples collected 2 h after the end of radiation. Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; # $p < 0.05$ compared to the irradiated control group (vehicle); ** $p < 0.05$ compared to the irradiated control group and pimaradienoic acid 1 and 3mg/kg.

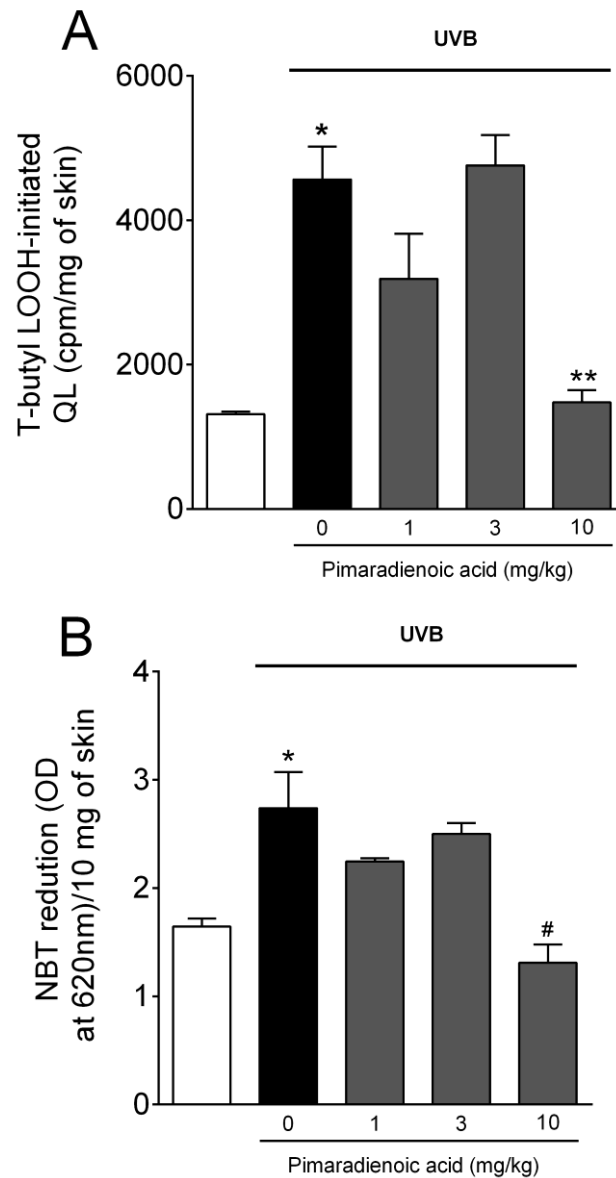


Fig. 4. Pimaradienoic acid inhibits UVB-radiation-induced lipid peroxidation (LOOH) and superoxide anion production. The t-butyl LOOH-initiated chemiluminescence (QL) (A) and nitroblue tetrazolium (NBT) reduction (B) were determined in samples collected 4 h and 2 h after the end of radiation, respectively. Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; # $p < 0.05$ compared to the irradiated control group (vehicle); ** $p < 0.05$ compared to the irradiated control group and pimaradienoic acid 1 and 3mg/kg.

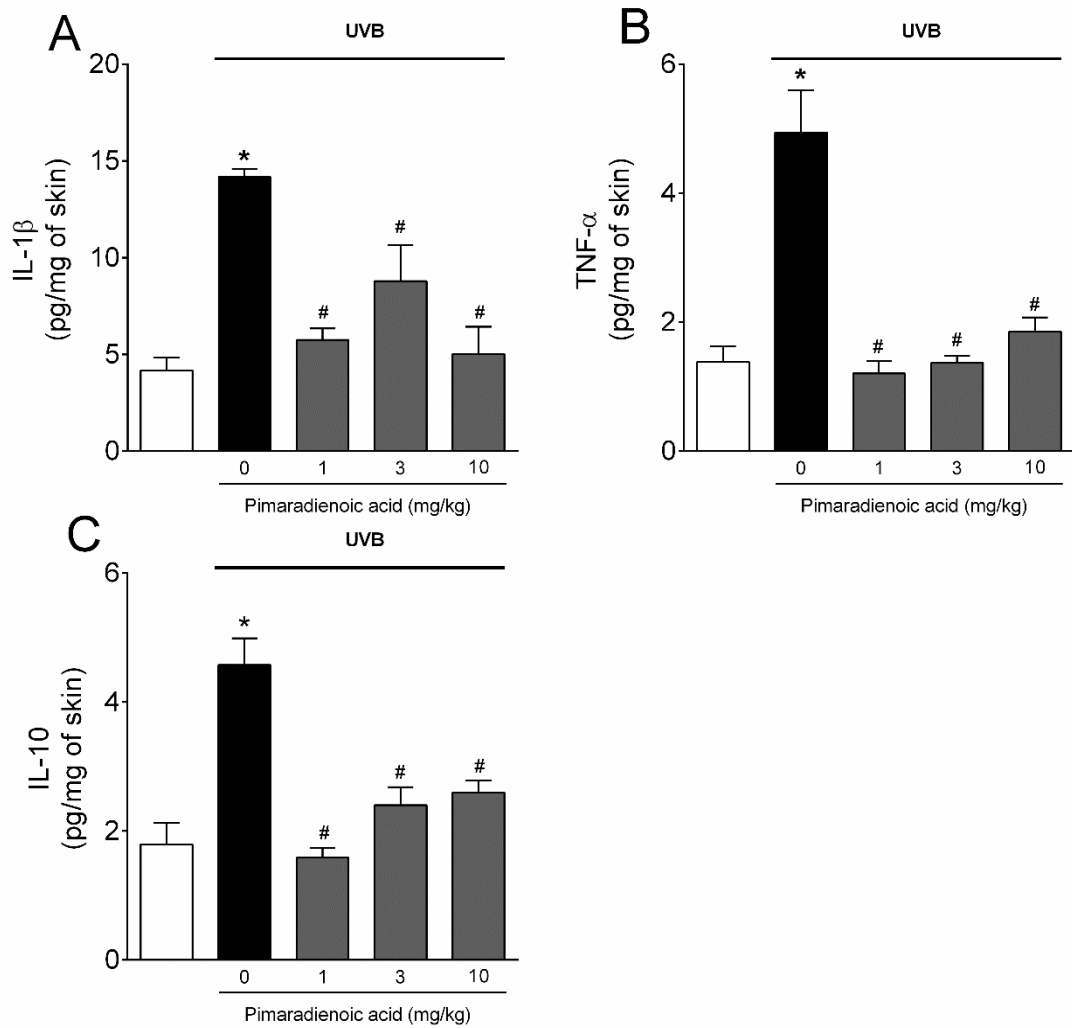


Fig. 5. The oral doses containing 1, 3 and 10mg/kg of pimaradienoic acid inhibited UVB-radiation-induced cytokine production. The levels of inflammatory cytokines IL-1 β (A), TNF- α (B) and IL-10 (C) were determined by skin samples collected 4 h after the end of exposure to radiation. Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control and formulations containing 1, 3 and 10mg/kg oral dose of pimaradienoic acid # $p < 0.05$ compared to the irradiated control group.

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O câncer de pele, o envelhecimento precoce e eritema, dentre outras patologias causadas pela exposição excessiva à radiação solar UV, atingem uma grande parcela da população. Além da importância estética inerente a essas doenças, o agravamento das mesmas por descuido ou desconhecimento do paciente, pode ter como consequência a morte por neoplasia maligna. Sabendo-se que todas essas enfermidades podem ser iniciadas por uma sobrecarga de produção de espécies reativas de oxigênio bem como pelo desencadeamento do processo inflamatório é de extrema importância que se busque terapias que possam não apenas prevenir, como também tratar as reações resultantes da inflamação e estresse oxidativo cutâneo.

As medidas mais conhecidas na prevenção dos danos causados à pele devido à radiação UV tem sido a utilização de filtros protetores solares, roupas confeccionadas com tecidos dotados de especial proteção contra radiação solar e também a não exposição à mesma. Diante das alternativas apresentadas, a que possui maior adesão, é a utilização de filtros solares. Porém, este método apresenta algumas inconveniências como a necessidade de aplicação correta, e muitas vezes, também a de reaplicação. Assim sendo, a busca por novas alternativas de proteção e até mesmo de diferentes vias de aplicação, destacando a via oral devido à facilidade de administração, têm sido cada vez mais frequente.

Entre as novas estratégias buscadas, está a de complementação do sistema antioxidante natural da pele com a utilização de antioxidantes de origem exógena, em sua maioria, de origem vegetal, sejam estes extratos vegetais ou mesmo drogas isoladas de plantas.

O ácido pimaradienóico, é um composto do grupo dos diterpenos, isolada para o presente estudo das raízes de *Viguiera arenaria*, que tem demonstrado diversas atividades farmacológicas interessantes em estudos anteriores tais como antibacteriana, antineoplásica, antioxidante e anti-inflamatória, sendo as três últimas características muito úteis para o tratamento do estresse oxidativo resultante da exposição exagerada à radiação UVB.

Neste contexto, a partir da verificação das qualidades acima citadas do ácido pimaradienóico, a investigação de seus efeitos protetores e os mecanismos envolvidos em sua ação farmacológica se tornou necessária.

Como era suposto, a partir da avaliação *in vivo* dos efeitos do ácido pimaradienóico administrado em camundongos sem pêlos pela via oral com posterior exposição de maneira sistemática e padronizada à radiação UVB, observou-se que o ácido pimaradienóico foi eficaz *in vivo*, sendo promissor devido às suas atividades antioxidante e anti-inflamatória. Quanto à atividade antioxidante, a mesma se confirmou a partir dos resultados obtidos com relação à manutenção dos níveis de GSH, da atividade de catalase, na diminuição da produção de ânions superóxido e produção de hidroperóxidos lipídicos, além da manutenção do sistema antioxidante da pele também comprovada a partir dos ensaios de FRAP e ABTS. Além disso, o ácido pimaradienóico, comprovando sua capacidade anti-inflamatória, demonstrou inibir o edema cutâneo, recrutamento de neutrófilos, atividade da MMP-9 e citocinas inflamatórias (IL-1 β e TNF- α).

Dentre as doses testadas, pode-se afirmar, de acordo com os resultados obtidos, que a dose de 10mg/kg foi a mais efetiva tanto para os testes que avaliaram a capacidade antioxidante como para os ensaios que determinaram a atividade anti-inflamatória do AP.

Portanto, os resultados obtidos demonstram que o ácido pimaradienóico, administrado pela via oral, pode ser uma nova estratégia para prevenção e/ou tratamento dos danos cutâneos causados pela radiação UVB, com a vantagem de facilidade de administração.

6. REFERÊNCIAS

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*, p. 28-37, 2003.

BALOGH, T. S., PEDRIALI, C. A., BABY, A. R., VELASCO, M. V. & KANEKO, T. M. Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, p. 732-742, 2010.

BENZIE, I. F. & STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, p. 70-76, 1996.

BOLLER, S.; SOLDI, C.; MARQUES, M. C.; SANTOS, E. P.; CABRINI, D. A.; PIZZOLATTI, M. G.; ZAMPRONIO, A. R.; OTUKI, M. F. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 130, n. 2, p. 263-266, 2010.

BOSCH, R., PHILIPS, N., SUÁREZ-PÉREZ, J. A., JUARRANZ, A., DEVMURARI, A., CHALENSOUK-KHAOSAAT, J., GONZÁLEZ, S. Mechanisms of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals. *Antioxidants*, p. 248-268, 2015.

CAMPANINI, M. Z.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; IVAN, A. L.; FERREIRA, V. S.; VILELA, F. M.; VICENTINI, F. T.; MARTINEZ, R. M.; ZARPELON, A. C.; FONSECA, M. J.; FARIA, T. J.; BARACAT, M. M.; VERRI, W. A. JR.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v. 127, p. 153-160, 2013.

CARINI, M.; ALDINI, G.; PICCONE, M.; FACINO, R. M. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. *// Farmaco*, v. 55, n. 8, p. 526-534, 2000.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A. JR.; DORTA, D. J.; SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 85, p. 21-27, 2006.

CHAPMAN, A., MOCATTA, T., SHIVA, S., SEIDEL, A., CHEN, B., KHALILOVA, I., PAUMANN-PAGE, M. E., JAMENSON, G. N., WINTERBOURN, C. C., KETTLE, A. J. Ceruloplasmin Is an Endogenous Inhibitor of Myeloperoxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, p. 6465-6477, 2013.

FERNANDO, P. M., PIAO, M. J., HEWAGE, S. R., KANG, H. K., YOO, E. S., KOH, Y. S., HYUN, J. W. Photo-protective effect of sargachromenol against UVB radiation-induced damage through modulating cellular antioxidant systems and apoptosis in human keratinocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, p. 112-119, 2016.

FONSECA, Y. M.; CATINI, C. D.; VICENTINI, F. T.; NOMIZO, A.; GERLACH, R. F.; VIEIRA FONSECA, M. J. 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, n. 3, p. 596-601, 2010.

FONSECA, Y. M.; CATINI, C. D.; VICENTINI, F. T.; CARDOSO, J. C.; CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L.; VIEIRA FONSECA, M. J. Efficacy of marigold extract-loaded formulations against UV-induced oxidative stress. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 100, n. 6, p. 2182-2193, 2011.

GÜNTHER, G.; BERRÍOS, E.; PIZARRO, N.; VALDÉS, K.; MONTERO, G.; ARRIAGADA, F.; MORALES, J. Flavonoids in Microheterogeneous Media, Relationship between Their Relative Location and Their Reactivity towards Singlet Oxygen. *PLoS One*, 10(6), p. 1-17, 2015.

HALLIWELL, B. & WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), p. 231-255, 2004.

HECK, D. E., VETRANO, A. M., MARIANO, T. M., LASKIN, J. D. UVB Light Stimulates Production of Reactive Oxygen Species: Unexpected Role for Catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, p. 22432-22436, 2003.

HEURUNG, A. R.; RAJU, S. I.; WARSHAW, E. M. Adverse reactions to sunscreen agents: epidemiology, responsible irritants and allergens, clinical characteristics, and management. *Dermatitis*, 25(6), p. 289-326, 2014.

HUNDRE, S.Y.; KARTHIK, P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. (Maio de 2015). Effect of whey protein isolate and β -cyclodextrin wall systems on stability of microencapsulated vanillin by spray-freeze drying method. *Food Chemistry*, 1, p. 16-24, 2015.

IVAN, A. L. M.; CAMPANINI, M. Z.; MARTINEZ, R. M.; FERREIRA, V. S.; STEFFEN, V. S.; VICENTINI, F. T. M. C.; VILELA, F. M. P.; MARTINS, F. S.; ZARPELON, A. C.; CUNHA, T. M.; FONSECA, M. J. V; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A. JR; CASAGRANDE, R. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v. 138C, p. 124-133, 2014.

JI, H. & LI, X. K. Oxidative Stress in Atopic Dermatitis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p. 1-8, 2016.

JIN, G., LIU, Y., JIN, S., LIU, X., LIU, S. UVB Induced Oxidative Stress in Human Keratinocytes and Protective Effect of Antioxidant Agents. *Radiation and Environmental Biophysics*, p. 61-68, 2007.

KASTURAGI, Y.; SUGIURA, Y. C.; LEE, K.; OTSUGI, K.; KURIHARA, K. Selective inhibition of bitter taste of various drugs by lipoprotein. *Pharmaceutical Research*, 12(5), p. 658-662, 1995.

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. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, v. 140, n. 1, p. 47-52, 2005.

KATIYAR, S. K. & MUKHTAR, H. Green tea polyphenol (2)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of leukocytes, depletion of antigen-presenting cells, and oxidative stress. *Journal of leucocyte biology*, p. 719-726, 2001.

KENDRE, P. N.; PANDE, V. V. & CHAVAN, K. M. Novel formulation strategy to enhance solubility of quercetin. *Pharmacophore*, 5(3), p. 358-370, 2014.

KIM, K. H., PARK, S. J., LEE, J. E., SONG, C. H., CHOI, S. H., KU, S. K., KANG, S. J. Inhibition of UVB-induced skin damage by exopolymers from *Aureobasidium pullulans* SM-2001 in hairless mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, p. 73-86, 2014.

LEE, G. H.; LEE, S. J.; JEONG, S. W.; KIM, H. C.; PARK, G. Y.; LEE, S. G.; CHOI, J. H. Antioxidative and antiinflammatory activities of quercetin-loaded silica nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 22(143), p. 511-517, 2016.

LIM, H. W., HÖNIGSMANN, H. & HAWK, J. L. *Photodermatology*. New York: Informa healthcare, 2007.

LIM, H., JUNG, H. A., CHOI, J. S., KIM, Y. S., KANG, S. S. & KIM, H. P. Anti-inflammatory activity of the constituents of the roots of *Aralia continentalis*. *Archives of pharmacal research*, p. 1237-1243, 2009.

LÜ, J. M., LIN, P. H., YAO, Q. & CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, p. 840-860, 2010.

MANUEL, J. A. & GAWRONSKA-KOZAK, B. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is upregulated during scarless wound healing in athymic nude mice. *Matrix Biology*, p. 505-514, 2006.

MARTINEZ, R.M.; PINHO-RIBEIRO, F.A.; STEFFEN, V.S.; SILVA, T.C.; CAVIGLIONE, C.V.; BOTTURA, C.; FONSECA, M.J.; VICENTINI, F.T.; VIGNOLI, J.A.; BARACAT, M.M.; GEORGETTI, S.R.; VERRI, W.A. Jr.; CASAGRANDE R. Topical Formulation Containing Naringenin: Efficacy against Ultraviolet B Irradiation-Induced Skin Inflammation and Oxidative Stress in Mice. *Plos One*, 11(1), p. 1-21, 2016.

MARTINEZ, R. M.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; STEFFEN, V. S.; CAVIGLIONE, C. V.; VIGNOLIS, J. A.; BARBOSA, D. S.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI JR., W. A.; CASAGRANDE, R. Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice. *Journal of Natural Products*, v. 78, n. 7, p. 1647-1655, 2015.

MEISTER, A. & ANDERSON, M. E. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, p. 711-760, 1983.

MITTAL, A., ELMETS, C. A. & KATIYAR, S. K. CD11b+ cells are the major source of oxidative stress in UV radiation-irradiated skin: possible role in photoaging and photocarcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology*, p. 259-264, 2003.

MIZOKAMI, S. S., HOHMANN, M. S., STAURENGO-FERRARI, L., CARVALHO, T. T., ZARPELON, A. C., POSSEBON, M. I., SOUZA, A. R., VENEZIANI, R. C., ARAKAWA, N. S., CASAGRANDE, R., VERRI, V. A. Pimaradienoic Acid Inhibits Carrageenan Induced Inflammatory Leukocyte Recruitment and Edema in Mice: Inhibition of Oxidative Stress, Nitric Oxide and Cytokine Production. *Plos one*, p. 1-17, 2016.

MOTT, J. D. & WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current Opinion in Cell Biology*, p. 558-564, 2004.

OKIMOTO, Y., WATANABE, A., NIKI, E., YAMASHITA, T. & NOGUCHI, N. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Letters*, p. 137-140, 2000.

PERCY, M. E. Catalase: an old enzyme with a new role? *Canadian Journal of biochemistry and cell biology*, p. 1006-1014, 1984.

PORTO, T. S., DA SILVA FILHO, A. A., MAGALHÃES, L. G., DOS SANTOS, R. A., FURTADO, N. A., ARAKAWA, N. S., AMBRÓSIO, S. R. Fungal transformation and schistosomicidal effects of pimaradienoic acid. *Chemistry and Biodiversity*, p. 1465-1474, 2012.

RAMACHAND, S., PRASSAD, N. R. & KARTHIKEYAN, S. Sesamol inhibits UVB-induced ROS generation and subsequent oxidative damage in cultured human skin dermal fibroblasts. *Archives of Dermatological Research*, p. 733-744, 2010.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. & RICE-EVANS, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine*, p. 1231-1237, 1998.

SAADÉ, N. E., NASR, I. W., MASSAAD, C. A., SALIEH-GARABEDIAN, B., JABBUR, S. J., & KANAAN, S. A. Modulation of ultraviolet-induced hyperalgesia and cytokine upregulation by interleukins 10 and 13. *British Journal of Pharmacology*, p. 1317-1324, 2000.

SEVERIANO, M. E., SIMÃO, M. R., RAMOS, H. P., PARREIRA, R. L., ARAKAWA, N. S., SAID, S., FURTADO, N. A., OLIVEIRA, D. C., GREGÓRIO, L. E., TIRAPELLI, C. R., VENEZIANI, R. C., AMBRÓSIO, S. R. Biotransformation of ent-pimaradienoic acid by cell cultures of *Aspergillus niger*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, p. 5870-5875, 2013.

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, n. 12, p. 1080-1086, 2007.

TANABE, H., YASUI, T., NAGATSU, A., MAKISHIMA, M., AMAGAYA, S. & INOUE, M. Retinoic acid receptor agonist activity of naturally occurring diterpenes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, p. 3204-3212, 2014.

TIRAPELLI, C. R., AMBROSIO, S. R., COUTINHO, S. T., OLIVEIRA, D. C., COSTA, F. B. & OLIVEIRA, A. M. Pharmacological comparison of the vasorelaxant action. *Pharmacy and Pharmacology*, p. 997-1004, 2005.

TOMAINO, A., CRISTANI, M., CIMINO, F., SPECIALE, A., TROMBETTA, D., BONINA, F. & SAIJA, A. In vitro preprotective effect of a Jacques grapes wine extract on UVB-induced skin damage. *Toxicology in vitro*, p. 1395-1402, 2006.

TULAH, A. S. & BIRCH-MACHIN, M. A. Stressed out mitochondria: The role of mitochondria in ageing and cancer focussing on strategies and opportunities in human skin. *Mitochondrion*, p. 444-453, 2013.

VASCONCELOS, S. M., GOULART, M. O., MOURA, J. B., BENFATO, M. S., MANFREDINI, V. & KUBOTA, L. T. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio,

Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação. *Química Nova*, p. 1323-1338, 2007.

VERRI, W. A. JR.; GUERRERO, A. T.; FUKUDA, 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 America*, v. 105, n. 7, p. 2723-2728, 2008.

WEI, H., CAI, Q., TIAN, L., & LEBWOHL, M. Tamoxifen reduces endogenous and UV light-induced oxidative damage to DNA, lipid and protein in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*, p. 1013-1018, 1998.

ANEXO

ANEXO I –Informações sobre submissão do artigo a revista Photochemical and Photobiological Science

Find out how to prepare your article and present your research clearly, ensuring that all the relevant information is included.

You'll also find guidance here on the experimental data you should include in your article and material that can be placed in the electronic supplementary information (ESI).

For detailed information on acceptable formats for your figures, see our section on [Figures, graphics, images & cover artwork](#).

How to write your article

On this page you'll find guidance and tips for first-time and experienced authors on writing style and how to structure an article. We've also included some [article templates](#) to help you structure and format your manuscript.

These guidelines are relevant to all of our journals. Please make sure you check the specific journal page for additional guidelines; you'll find the journals listed under [Our journals](#).

Article types

Articles commonly fall into one of three main categories: Full papers, Communications and Reviews. However, each journal will have further, specific article types, so you should always refer to a [journal's specific author guidelines](#) while preparing your manuscript.

Full papers are original, unpublished primary research. Extensions of work that has been published previously in short form such as a Communication are usually acceptable.

Communications must contain original and highly significant work whose high novelty warrants rapid publication. Some journals have page limits for Communications.

Reviews may be an authoritative overview of a field, a comprehensive literature reviews, or tutorial-style reference materials. Reviews are usually invited by the editor, but a topic may be proposed by an author via the editorial office.

Format & layout of your article

Articles should be written clearly and concisely, avoiding repetition or embellishment. All submissions must be in English. Standard English or American spelling may be used in our journals, but consistency should be maintained within a manuscript. The use of common or standard abbreviations is encouraged; however, if using non-standard abbreviations, please define these when you first use them.

All articles accepted for publication in our journals are edited and typeset to our house style by professional editors: the manuscript will be formatted for you.

This section describes the content to be included in your article. Note that headings and subheadings are not permitted in articles submitted to *ChemComm*, although they are permitted in Communications submitted to other journals.

Experimental data

On submission of a manuscript authors should provide all data required to understand and verify the research presented in the article. The Royal Society of Chemistry believes that where possible all data associated with the research in a manuscript should be freely available in an accessible and usable format, enabling other researchers to replicate and build on that research.

[Read about our data policy and the experimental data](#) you should include for the characterisation of new compounds, X-ray crystallography and macromolecular structures.

Preparing electronic supplementary information (ESI)

You can include ESI with your article to enhance and increase the impact of your work, for example by including 3D molecular models and movies. Authors can also improve the readability of their articles by placing appropriate material in the ESI, such as repetitive experimental details or bulky data. All information published as ESI is fully archived and permanently linked to the article using CrossMark.

When preparing your ESI data files, you should keep in mind the following points:

- Supplementary data is peer-reviewed and should therefore be included with the original submission.
- ESI files are published 'as is'; editorial staff will not edit the data for style or content.
- Data are useful only if readers can access it; use common, widely known file formats.
- Large files may prove difficult for users to download and access.

We encourage the submission of supporting information for compounds and spectra in electronic format. For compounds, please supply mol files (exported from your chemical

drawing package) as unique compounds, without R-groups or variable attachments. Spectral data such as NMR, IR, Raman, ESR should be supplied in the standard [JCAMP-DX](#) format (.jdx files).

We offer a service that enables the 3D visualisation of complex molecules. You can use the [FirstGlance in Jmol tool](#) to prepare these.

Multimedia files

We welcome the use of multimedia files (including videos and animations) as these can be an excellent medium to present elements of your work. Any videos of general interest may be shared with the wider community via our YouTube channel or through social media - please notify the editorial team if you prefer for your video(s) not to be promoted in this way.

If you submit a multimedia file alongside your paper, please refer to it within your paper to draw it to the reader's attention. Please also provide a short descriptive title for the video.

Acceptable formats for video or animation clips are:

- WMV
- AVI
- MOV
- MPG

Please minimise file sizes where you can; we recommend a maximum file size of 5MB and a maximum frame size of 640 x 480 pixels. If your video is very short (only a few seconds long) then it is recommended that you loop the section a few times to provide a more detailed view.

Video abstracts

We welcome the opportunity to help authors promote their papers by the placement of video abstracts on YouTube, which we can then promote via social media channels. Video abstracts offer an exciting opportunity to highlight the importance of a paper to the reader in a new and engaging way.

Content

- Start by introducing the conclusion of your article and concentrate on the main results.
- Focus the video on why the article is relevant to the reader.
- Introduce relevant co-workers and mix in images/footage of your laboratory, experiment and equipment to make it more engaging.

- Videos should be approximately two-three minutes in length (no longer than four minutes).
- On screen text should be used sparingly and be large enough to read clearly.

Technical

- Minimum frame size: 320 x 240 pixels; maximum 640 x 480.
- Frames per second: 25 to 30.
- Aspect Ratio: 4:3 preferred - please contact us regarding 16:9.
- Formats accepted: MPG, MOV, AVI, WMV.
- The maximum size should be 40MB - please contact us if this presents a problem.

Notes

- Video abstracts will be hosted on Youtube or another third party hosting provider.
- We may edit your video if required, overlay a logo on your video and add a splash screen at the end of the video.
- All abstracts will be accessed for suitability prior to being uploaded to the Royal Society of Chemistry YouTube Channel.
- You should ensure that you have copyright permission for any images, stock footage or background music used.
- Please also submit a transcript of the video abstract that we can upload to make it more accessible.

Articles should be submitted using our online submission system. We do not accept submissions by post or email. Details of what files you need to provide can be found below. You will also be asked to supply the names and contact details of all co-authors.

Your submission will be acknowledged as soon as possible - please contact the journal editorial office if you have not received an acknowledgement within two working days.

What to send & when

On submission

When you submit your manuscript to a Royal Society of Chemistry journal, please provide the following.

- Article text as a Word, PDF or LaTeX file (if you use LaTeX, please also include a PDF version); submissions to *Chemical Communications* and *Catalysis Science & Technology* must use our [Communication template](#), for other journals this is optional

- Numbered figures either included within or at the end of the text; [for specifications see information below](#)
- A cover letter, including a justification of the importance of the work
- A list of preferred reviewers
- Any electronic supplementary information (ESI)
- Any CCDC numbers, as well as CheckCIF files for each crystal structure; see the [experimental data](#) section for more information
- [Please consult individual journal guidelines for details of any additional required files](#)

You may also provide a table of contents entry at this stage, although this can wait until you send your revised manuscript. This should include a graphic (maximum size 8 cm x 4 cm) and one sentence of text (maximum 20 words) highlighting the novelty of the work.

The submission system allows for up to five files to be uploaded at once. Alternatively a ZIP file containing up to 20 files can be uploaded. All files relating to a single manuscript should be uploaded simultaneously during one transaction.

At revision

As well as your revised manuscript, you will be asked to provide a response to the referees, your figures as separate high-resolution files and a table of contents entry. Full details of what you should include will be sent to you by the editor when required.

Licence to publish

All authors submitting work for publication are required to agree a [licence to publish](#). Authors will be asked to agree to our licence to publish as part of the submission process. Alternatively, a downloadable PDF version is available, which can be completed and returned by email, post or fax to the editorial office.

Figures, graphics, images & cover artwork

Figures & graphics

- Colour figures may be used free of charge both online and in print.
- Figures should be supplied as TIFF or EPS files, with a resolution of 600 dpi or greater.
- Files should fit within either single column (8.3 cm) or double column (17.1 cm) width, and must be no longer than 23.3 cm.
- Graphical abstracts should be no larger than 8 cm x 4 cm.
- Schemes and structures should be drawn to make best use of single and double column widths.

Photographs

- Photographs should be provided at the best resolution available (minimum 600 dpi) as TIFF, PDF or JPEG files.
- Biography photographs should be 4 cm wide x 5 cm high (individual photograph) or 8.3 cm wide x 5 cm high (group photograph).

Chemical structures

Structures should ideally be prepared with chemistry drawing software, preferably as ChemDraw files. Chemwindow files (.cwg/.cw2), ISIS/Draw exported in sketch format (.skc) and ChemSketch exported in ChemDraw format (.cdx) may also be supplied.

You should use the settings below or you can use our [chemical structure templates](#) to format these for you.

- Chain bond angle = 120°
- Fixed bond angle = 15°
- Bond length = 0.43 cm *or* 12.2 pt
- Bond width = 0.016 cm *or* 0.5 pt
- Bold bond width = 0.056 cm *or* 1.6 pt
- Double bond space = 20% of bond length
- Stereo bond width = 0.056 cm *or* 1.6 pt
- Hash spacing = 0.062 cm *or* 1.8 pt
- Captions/atom labels = Arial/Helvetica, 7 pt

Wherever possible, please send all ChemDraw files with the final version of your manuscript. We can use chemical drawings to highlight your research and make it more discoverable via our [ChemSpider database](#).

Crystal structure images

A conventional line drawing of the structure should normally be included and one perspective diagram (or stereo pair) if appropriate. Packing diagrams should not be included unless required to illustrate a specific chemical point. The atom numbering scheme should be clearly shown in one of the diagrams.

Journal covers

Authors who wish to have their artwork considered for a journal cover should contact the editorial office of the journal. Use of artwork is at the editor's discretion. A contribution to the additional production costs will be requested.

Help with our submission system

We handle all our peer review through the online system ScholarOne Manuscripts. This system requires the use of pop-ups, so you'll need to enable these in your browser before you start.

An [author guide and FAQ section](#) is available from ScholarOne Manuscripts to help you learn and navigate the system.

Registering a new account FAQ

New users will need to set up an account on the system before starting. To do this go to the [ScholarOne homepage](#) and click on 'Register here' under 'New User?' to the right of the page. It takes only a few minutes to complete the form; once done you will be able to access your account immediately.

Learn more about our publishing process such as our initial assessment of submissions, our journal transfer service and the publication of accepted manuscripts.

This page also outlines our editorial policies on prior publication, data and correction and retraction.

Initial assessment of submissions

We are committed to publishing high quality new work that makes a significant contribution within the scope of its journals. In order to meet this aim, submitted manuscripts undergo initial evaluation by our professional editors to ensure that they meet essential criteria for publication in the journal.

Only those manuscripts that pass this initial review process will be forwarded to reviewers for further consideration.

This process provides a rapid decision to authors of those papers that are unsuccessful and reduces the burden on the reviewers.

A manuscript may be returned to the author(s) without external review if, in the opinion of the editor:

- the manuscript clearly falls outside the scope of the journal
- the work is of poor scientific quality such that it is clearly not suitable for publication in a scientific journal
- the manuscript is of insufficient general interest for the journal and would be better suited to a more specialised journal
- the novelty of the work falls below that required for the journal
- the manuscript represents undue fragmentation of the research into multiple papers

- the manuscript contains redundant information or significant amounts of material that has already been published elsewhere or is under consideration by another journal
- the quality of the English in the manuscript is so poor as to render the science presented unclear
- the manuscript has already been reviewed and rejected by a different Royal Society of Chemistry journal, and the author(s) have made little or no attempt to address the advice that the editor and/or referees have provided already
- the conclusions drawn by the manuscript are well known or have been published previously.

Authors are also expected to abide by the Royal Society of Chemistry's ethical guidelines as described in [Author responsibilities](#).

Authors have the right to appeal against any decision taken on their manuscript at any stage; an appeal would be granted at the discretion of the Royal Society of Chemistry. Through the appeal process further opinion is sought on the manuscript's suitability for publication in the journal. After the appeal process the editor's decision is final.

CrossCheck

The Royal Society of Chemistry is a member of CrossCheck – a multi-publisher initiative to screen published and submitted content for originality.

Through CrossCheck, we use the iThenticate software to detect instances of overlapping and similar text in submitted or published manuscripts.

By depositing all of our content in the CrossCheck database we allow other CrossCheck members to screen their submissions against our published articles.

Further details on our plagiarism policies can be found in our [Author responsibilities](#) section.

Transfer between Royal Society of Chemistry journals

The Royal Society of Chemistry is committed to providing authors with a high level of customer service throughout the publication process. One of the ways we do this is to consider the suitability of a manuscript for another Royal Society of Chemistry journal if the manuscript is unsuitable for publication in the journal to which it was submitted originally.

When a paper is to be rejected from one Royal Society of Chemistry journal, then we would offer the author(s) the option to transfer the paper to one of our other journals for consideration, when this is appropriate. This offer may occur during the initial assessment of a manuscript or after reports on it have been received from reviewers. As part of the peer review process, the reviewers are asked to comment whether the manuscript would be more appropriate for one of our other journals.

An offer by the editorial office to transfer the manuscript to another journal is made in the decision letter to the corresponding author; the author decides whether or not to take up the offer and then selects the appropriate option provided in the letter. On acceptance of the offer the manuscript is transferred automatically to the new journal without the author needing to supply the submission information again.

The transferred manuscript will appear as a 'draft' in the author's 'Author Centre' in the new journal, and the author will receive an email asking them to finalise the submission. The process provides a quick and easy route for these papers to be considered by another journal.

If the manuscript already has reports from reviewers then the author will be asked to upload the revised files. These files should include a summary of any new work added and a point by point response to the reviewers' comments. Authors should be aware that the reviewers' comments are transferred to the editor of the receiving journal together with the manuscript files. On submission to the new journal, the manuscript will then be assessed by an editor as to whether further peer review will be necessary.

Benefits for authors & reviewers

Transferring manuscripts between our journals has benefits for authors. When transferring to another journal the author does not need to submit the manuscript or provide the accompanying information again. During the initial assessment by the editor, identification of the most suitable journal for the manuscript optimises the evaluation process. If reports have already been received then further review may not be necessary after a transfer, at the discretion of the editor on the journal to which the manuscript has been transferred. A decision by the new journal about suitability of the manuscript for publication should be made more swiftly.

The transfer process also reduces the burden on reviewers. A paper that has been rejected may be submitted by the author to another journal where it would undergo evaluation again. By transferring between journals here we would be able to consider the reports received already, although some additional review may be necessary. Full peer review is not always necessary thereby reducing the number of reviews required and allowing a decision to be reached more quickly.

Accepted manuscripts

Many of our journals give authors the option to have the unedited and unformatted version of their article published shortly after acceptance as an accepted manuscript. This free service allows authors to make their results available to the community, in citable form, before publication of the edited article.

The edited and formatted advance article will replace the accepted manuscript as soon as it becomes available.* Journals that offer this service will give authors the opportunity to opt in during the online submission process.

*For RSC Advances, the accepted manuscript will be replaced by the edited, formatted and paginated article as soon as this becomes available, and it will be published in an 'Issue in Progress.'

Paper reprints service

We supply PDF reprints of their articles to our authors free of charge. If you would like to purchase printed reprints of your article, use our [order form](#), which also includes pricing information.

Correction & retraction policy

It is our policy not to amend, alter or remove the published scientific record, in line with the International Association of Scientific, Technical & Medical Publishers' (STM) guidelines:

Articles that have been published should remain extant, exact and unaltered to the maximum extent possible

(STM Guidelines on Preservation of the Objective Record of Science)

We will respond to any suggestions of scientific misconduct or to convincing evidence that the main substance or conclusions of a published manuscript is erroneous, usually through consultation with the author. This may require the publication of a formal retraction or correction. An expression of concern may be published by the editor whilst an investigation into alleged misconduct or publication of erroneous data is ongoing.

Authors who wish to enquire about publication of a correction for their article, or who have serious concern that they believe may warrant retraction, should contact the journal editorial office.

We follow the [Committee on Publishing Ethics \(COPE\) guidelines](#) for correcting and retracting articles, outlined below.

Expression of concern

We will consider issuing an expression of concern if:

- we receive inconclusive evidence of research or publication misconduct by the authors
- we receive evidence that the findings are unreliable but the authors' institution will not investigate the case
- we believe that an investigation into alleged misconduct related to the publication either has not been, or would not be, fair and impartial or conclusive

- an investigation is underway but a judgement will not be available for a considerable time.

The expression of concern is free to view and is linked to the article of record to which it relates.

Correction

We will consider issuing a correction if:

- the scientific record is seriously affected, for example with regard to the scientific accuracy of published information
- a small portion of an otherwise reliable publication proves to be misleading (especially because of honest error)
- the author/contributor list is incorrect (i.e. a deserving author has been omitted or somebody who does not meet authorship criteria has been included).

We will not usually publish a correction that does not affect the contribution in a material way or if the issue does not significantly impair the reader's understanding of the contribution, such as a spelling mistake or grammatical error. The correction is free to view and is linked to the article of record that it corrects.

Retraction

We will consider issuing a retraction notice if:

- we have clear evidence that the findings are unreliable, either as a result of misconduct (for example, data fabrication) or honest error (such as a miscalculation or experimental error)
- the findings have previously been published elsewhere without proper cross-referencing, permission or justification (that is, cases of redundant publication)
- the publication constitutes plagiarism
- the publication reports unethical research.

The retraction notice is free to view and is linked to the article of record that it retracts; the article of record will be digitally watermarked 'RETRACTED'.

Journal policy on prior publication

As scientific research is becoming more open and discoverable, the Royal Society of Chemistry supports our community of chemical scientists in sharing new research findings before and after publication through a variety of methods.

Authors publishing in our journals may present their research ahead of publication in the following ways.

- Through the deposition of a preprint version of the article in non-commercial repositories (eg ArXiv), institutional repositories or authors' individual websites - a preprint is defined here as an un-refereed author version of the article; a non-commercial repository is defined here as any platform or archiving service that makes digital content free to deposit and access
- At scientific conferences; this includes recorded presentations, poster presentations and abstracts that are made openly available online
- In commercial or non-commercial databases (data without interpretation, discussion, conclusions or context with a wider experimental project)
- In an open electronic lab notebook
- In blogs, wikis, tweets, and other informal communication channels
- As a thesis or dissertation published as part of an academic or professional qualification, in print and online
- In any digital medium which is operated by the Royal Society of Chemistry, excluding journals, books and magazines

We will not consider for publication work that has been previously published, or is under consideration for publication, in another journal. Full papers as a follow up to a previously published communication will be considered for publication in suitable Royal Society of Chemistry journals, subject to the new work meeting the journal's criteria.

Please consult the journal's editor if you have questions about whether or not a particular use constitutes prior publication.

For information about what you can do with your article following acceptance and publication see our guidance on [deposition and sharing rights](#).

Data policy

The Royal Society of Chemistry believes that where possible all data associated with the research in a manuscript should be freely available in an accessible and usable format, enabling other researchers to replicate and build on that research. Please refer to the [experimental data guidelines](#) for further information on our data policy.

This section provides general guidance to authors on their responsibilities and the code of conduct they should follow when submitting to a Royal Society of Chemistry

journal. It also describes what are considered to be conflicts of interest, and outlines our policy on human and animal welfare.

The information on this page was reproduced in part with permission from 'Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research', *Chem Rev.*, 1995, **95**, pp 11A-13A. © 1985, 1989, 1995 American Chemical Society. Committee on Publication Ethics (COPE)

Authorship

There is no universally agreed definition of authorship, but authors should, as a minimum, take responsibility for a particular section of the study. The award of authorship should balance intellectual contributions to the conception, design, analysis and writing of the study against the collection of data and other routine work. If there is no task that can reasonably be attributed to a particular individual, then that individual should not be credited with authorship.

All authors must take public responsibility for the content of their paper. The multidisciplinary nature of much research can make this difficult, but this may be resolved by the disclosure of individual contributions.

Authors have a responsibility to give due acknowledgement to all workers contributing to the work. Those who have contributed significantly to the research should be listed as co-authors. On submission of the manuscript, the corresponding author attests to the fact that those named as co-authors have agreed to its submission for publication and accepts the responsibility for having properly included all (and only) co-authors. If there are more than 10 co-authors on the manuscript then the corresponding author should provide a statement to specify the contribution of each co-author.

The corresponding author signs a 'licence to publish' on behalf of all the authors. Any change in authorship after initial submission must be approved by all authors and justified to the editor.

Code of conduct & conflicts of interest

Code of conduct

One of the foundations of the scientific profession is the acceptance by its members of a 'code of conduct', which outlines desired behaviour and obligations of members of the profession to each other and the public. Such a code of conduct seeks to maximise the benefits of science to society and the profession. The advancement of science requires the sharing of knowledge, even though this may sometimes forego any immediate personal advantage.

The publication of scientific research in journals is one of the fundamental ways in which the Royal Society of Chemistry serves the chemical science communities. Central to this service

is the responsibility that editors, authors and reviewers maintain the high ethical standard relating to the publication of manuscripts. In cases where these guidelines are breached or appear to be so, the Royal Society of Chemistry will consult the [code of conduct and best practice guidelines](#) of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#) and act accordingly.

Conflicts of interest

The relevant Royal Society of Chemistry journal concerned should be informed of any significant** conflict of interest that editors, authors or reviewers may have, in order to determine if any action may be appropriate (such as adding a declaration of an author's conflict of interest to a published piece, or disqualifying a reviewer). Conflicts of interest are almost inevitable and it is not intended to attempt to eliminate these. For a description and discussion of some leading journals' policies on conflicts of interest see: F van Kolschooten, 'Conflicts of interest: Can you believe what you read?', *Nature*, 28 March 2002, **vol. 416**, pp. 360-363; DOI: 10.1038/416360a.

Financial

Editors, authors and reviewers of a manuscript should inform the relevant journal of any significant financial interest - recent, present or anticipated - in any organisation that may in any way gain or lose financially from the publication of the piece (for example, employment by such an organisation; funds for research; funds for a member of staff; fees for consulting; stock or share holdings; patent interests). If you have such an interest, you may have a conflict of interest, which should be declared.

Other interests

An editor, author or reviewer may wish to disclose to the editor a conflict of interest that would be embarrassing if it became generally known (for example, an academic link or rivalry or a close relationship with, or a strong antipathy to, a person whose interests may be affected by publication of a manuscript).

**Significance may be judged by considering whether an undeclared conflict of interest could be embarrassing were it to become publicly known after the fact.

Authenticity & professionalism

Authors have responsibilities as detailed below.

Gather and interpret data in an honest way: Editors, reviewers, readers and publishers have the right to assume that submitted (and published) manuscripts do not contain scientific dishonesty and/or fraud comprising among others fictitious or manipulated data, plagiarised material (either from the previous work of the authors or that of other persons), reference omissions, false priority statements, 'hidden' multiple publication of the same data and incorrect authorship. Authors must not breach any copyright.

When reproducing figures and/or schemes from previous publications, it is the author's responsibility to seek appropriate permission from the relevant publishers.

Present a concise and accurate report of their research and an objective discussion of its significance.

Give due recognition to published work relating to their submitted manuscript by way of correct reference and citation: All sources should be disclosed, and if a significant amount of other people's material is to be used, permission must be sought by the author in accordance with copyright law. An author should not use privately obtained information (for example, information obtained through conversation), or information obtained through the performance of a confidential service (for example, the reviewing of a manuscript), without permission from the person from whom the information originated.

Declare all sources of funding for the work in the manuscript, and also to declare any conflict of interest.

Identify clearly in the manuscript any unusual hazards inherent in the use of chemicals, procedures or equipment in the investigation.

Ensure that their submitted articles contain no personal criticism of other scientists; however, criticism of the work of another scientist may be justified; an article may not contain any defamatory or otherwise actionable material.

Funding information

Providing accurate funding information will enable us to help you and your co-authors comply with multiple funder reporting mandates, and increase the visibility of your work through the [FundRef Search tool](#).

Human & animal welfare

When a study involves the use of live animals or human subjects, authors must include in the 'methods/experimental' section of the manuscript a statement that all experiments were performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines, and must state the institutional committee(s) that has approved the experiments. A statement that informed consent was obtained for any experimentation with human subjects is required. Reviewers may be asked to comment specifically on any cases in which concerns arise.

More detailed guidelines for authors submitting to *Toxicology Research* can be found in the [journal specific guidelines](#).

Authors have responsibilities as detailed below.

Avoid undue fragmentation of their work into multiple manuscripts: Editors have the right to reject submitted articles on the grounds of undue fragmentation. In particular, a piece of work should not be split into a number of manuscripts for publication as Communications.

Do not engage in redundant publication: This occurs when two or more papers, without full cross reference, share the same hypothesis, data, discussion points, or conclusions. Previous publication of an abstract or preprint of the proceedings of meetings does not preclude subsequent submission for publication, but full disclosure should be made at the time of submission; please see our processes and policies page for full details in our section, [Journal policy on prior publication](#).

Re-publication of a paper in another language is acceptable, provided that there is full and prominent disclosure of its original source at the time of submission.

Consider publishing related manuscripts in the same journal or a small group of journals: This can be of benefit to readers.

Inform the editor of related manuscripts under consideration for publication by the same author in any journal, on submission of their current manuscript: Authors should provide copies of these related manuscripts, and details of their present status.

Ensure that a manuscript is submitted for publication in only one journal at a time: It is not acceptable for an author to submit a manuscript (or manuscripts describing essentially the same matter) to more than one journal at a time. A manuscript that is a full paper report of a published Communication may be submitted for publication; however, the author has the responsibility to inform the editor of the previously published Communication.