



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

INGRID CAROLINE PINTO

**EFEITO TERAPÊUTICO DAS FORMULAÇÕES TÓPICAS
CONTENDO RESOLVINA D2 OU 17(R)- RESOLVINA D1
EM CAMUNDONGOS SEM PELO EXPOSTOS
À RADIAÇÃO UVB**

Londrina
2024

INGRID CAROLINE PINTO

**EFEITO TERAPÊUTICO DAS FORMULAÇÕES TÓPICAS
CONTENDO RESOLVINA D2 OU 17(R)- RESOLVINA D1
EM CAMUNDONGOS SEM PELO EXPOSTOS
À RADIAÇÃO UVB**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Profa. Dra. Rúbia Casagrande.

Londrina
2024

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

Pinto, Ingrid Caroline.

Efeito terapêutico das formulações tópicas contendo resolvina D2 ou 17(R)-resolvina D1 em camundongos sem pelo expostos à radiação UVB / Ingrid Caroline Pinto. - Londrina, 2024.
131 f.

Orientador: Rúbia Casagrande.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Radiação UV - Tese. 2. Inflamação - Tese. 3. Antioxidante - Tese. 4. Lipídios pró-resolução - Tese. I. Casagrande, Rúbia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 61

INGRID CAROLINE PINTO

**EFEITO TERAPÊUTICO DAS FORMULAÇÕES TÓPICAS
CONTENDO RESOLVINA D2 OU 17(R)- RESOLVINA D1
EM CAMUNDONGOS SEM PELO EXPOSTOS
À RADIAÇÃO UVB**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Profa. Dra. Josiane Alessandra Vignoli Camilios
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Renata Micheli Martinez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Sandra Regina Georgetti
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 12 de abril de 2024.

Dedico este trabalho:

A minha família, que me deu todo apoio e incentivo para a realização desta etapa acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a minha família, meus pais Ivete e Sinésio e meu irmão Wilian. As conquistas vieram do esforço e dedicação deles. Ao Bruno pelo companheirismo e apoio integral. Muito obrigada!

À profa Rúbia Casagrande pela orientação, paciência, dedicação e aprendizado adquiridos durante toda essa jornada. Muito obrigada pela oportunidade.

Ao prof Waldiceu Verri pela contribuição ativa na pesquisa e disponibilidade do seu laboratório para realização de alguns experimentos.

Aos meus companheiros de laboratório Priscila, Clóvis, Camilla, David, Cristina, Isadora por toda ajuda durante a execução dos experimentos, pelo conhecimento obtido de bancada e também pelas alegrias que compartilhamos durante esse percurso.

Aos colegas do laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer: Mariana, Tiago, Victor, Camila, Thaila e Soraia pelas contribuições na realização dos testes.

Aos membros da banca Ana Carla Zarpelon Schutz, Josiane Alessandra Vignoli Camilios, Renata Micheli Martinez e Sandra Regina Georgetti, pela disponibilidade e colaboração.

Aos colaboradores e ao corpo docente da Pós-Graduação em Ciências da Saúde por todo auxílio prestado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

PINTO, Ingrid Caroline. **Efeito terapêutico das formulações tópicas contendo resolvina D2 ou 17(R)- resolvina D1 em camundongos sem pelo expostos à radiação UVB.** 2024. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

A radiação ultravioleta B (UVB) é o principal fator que agride a barreira cutânea e desencadeia o fotoenvelhecimento e carcinogênese a longo prazo. A produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs) em conjunto com a resposta inflamatória geram danos teciduais preocupantes. Diante disso, novas substâncias com atuação nos mecanismos resultantes da exposição à radiação UVB são alvos de investigações. O ácido docosahexaenoico (DHA), derivado do ômega-3, pode ser convertido em resolvinas como a resolvina D2 (RvD2) e 17(R)- resolvina D1 (17(R)-RvD1) na presença de aspirina. Esses dois mediadores lipídicos pró-resolução apresentam evidências sobre a atividade terapêutica, entretanto, até o momento a eficácia dos mesmos não foi avaliada em formulação tópica contra o modelo de lesão cutânea induzida pela radiação UVB. As resolvinas participam do processo resolutivo da inflamação, ativando mecanismos de reparo tecidual e restringindo a infiltração de células imunitárias. No estudo atual, as formulações tópicas contendo RvD2 ou 17(R)-RvD1 foram testadas em camundongos sem pelos expostos à radiação UVB e a pele do dorso foi coletada para avaliar parâmetros inflamatórios e oxidativos. A administração tópica de RvD2 (3,0 ng) limitou a inflamação ao reduzir o edema de pele, atividade da mieloperoxidase (MPO) e metaloproteinase-9 (MMP-9), degradação do colágeno, espessamento epidérmico, apoptose dos queratinócitos, número de mastócitos, produção de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β e pró-inflamatória IL-1 β e expressão do RNAm para ciclooxigenase-2 (COX-2). A melhora da capacidade antioxidante após RvD2 foi constatada pela manutenção dos níveis de glutathione, catalase e eliminação do radical 2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), expressão do RNAm aumentada para o fator nuclear [derivado eritróide-2] tipo 2 (Nrf2) e reduzida para a subunidade gp91^{phox} e IL-1 β , além da diminuição da produção de ânion superóxido e hidroperóxidos lipídicos. A formulação tópica contendo 17(R)-RvD1 (2,7 ng) também obteve ação antioxidante através da melhora de todos os ensaios oxidativos citados anteriormente com adição do teste avaliando o poder antioxidante redutor de ferro (FRAP). Adicionalmente, o dano inflamatório foi atenuado com o tratamento de 17(R)-RvD1, diminuindo o edema cutâneo, MPO e MMP-9, componentes da avaliação histopatológica e da produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β . Em conclusão, duas novas formas terapêuticas foram efetivas em controlar os processos lesivos induzidos pela radiação UVB, contribuindo com o desenvolvimento de futuros fármacos.

Palavras-chave: Radiação UV; Inflamação; Antioxidante; Lipídios pró-resolução.

PINTO, Ingrid Caroline. **The therapeutic effect of topical formulations containing resolvin D2 or 17(R)- resolvin D1 in hairless mice exposed to UVB radiation.** 2024. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

ABSTRACT

Ultraviolet B (UVB) radiation is the main source of damage to the skin barrier and triggers photoaging and long-term carcinogenesis. The exacerbated production of reactive oxygen species (ROS) in combination with the inflammatory response generates alarming tissue damage. Thus, new substances that act on the mechanisms resulting from exposure to UVB radiation are targets for investigation. Docosahexaenoic acid (DHA), a derivative of omega-3, can be converted into resolvins such as resolvin D2 (RvD2) and 17(R)- resolvin D1 (17(R)-RvD1) in the presence of aspirin. These two pro-resolution lipid mediators present evidence of therapeutic activity, however, to this moment their efficacy has not been evaluated in topical application against the UVB radiation-induced skin lesion model. Resolvins participate in the inflammation resolution process, activating tissue repair mechanisms and restricting the infiltration of immune cells. In the current study, topical formulations containing RvD2 or 17(R)-RvD1 were tested on hairless mice exposed to UVB radiation, and the skin of the dorsal side was collected to assess inflammatory and oxidative parameters. Topical administration of RvD2 (3.0 ng) limited inflammation by reducing skin edema, myeloperoxidase (MPO) and metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, collagen degradation, epidermal thickening, keratinocyte apoptosis, mast cell number, production of pro- and anti-inflammatory cytokines and mRNA expression for cyclooxygenase-2 (COX-2). The improvement in antioxidant capacity after RvD2 was noted by the maintenance of glutathione levels, catalase and elimination of the 2,2' azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical (ABTS), increased mRNA expression for nuclear factor [erythroid-derived-2] type 2 (Nrf2) and reduced for the gp91phox subunit, as well as decreased production of superoxide anion and lipid hydroperoxides. The topical formulation containing 17(R)-RvD1 (2.7 ng) also achieved antioxidant action by improving all the oxidative tests mentioned above with the addition of the test evaluating ferric reducing antioxidant power (FRAP). In addition, inflammatory damage was attenuated with 17(R)-RvD1 treatment, reducing skin edema, MPO and MMP-9, components of the histopathological evaluation and the production of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β . In conclusion, two new therapeutic forms were effective in controlling the damaging processes induced by UVB radiation, contributing to the development of future pharmaceuticals.

Key-words: UV radiation; Inflammation; Antioxidant; Pro-resolution lipids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Histologia da pele humana mostrando as camadas epiderme e derme	14
Figura 2 -	Formação de EROs através de várias reações.....	18
Figura 3 -	Mapeamento da resolução da inflamação aguda.....	24
Figura 4 -	Fluxograma para avaliação da eficácia da formulação tópica contendo resolvina D2 (RvD2) através de parâmetros inflamatórios e oxidativos	34
Figura 5 -	Fluxograma para avaliação da eficácia da formulação tópica contendo 17(R)- resolvina D1 (17(R)-RvD1) através de parâmetros inflamatórios e oxidativos	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Componentes da formulação tópica.....	32
Tabela 2 -	Componentes do gel de separação e do gel de concentração.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Ativador de proteína-1
ARE	Elemento de resposta antioxidante
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COX-2	Ciclooxigenase-2
CPD	Dímeros de ciclobutano
DHA	Ácido docosahexaenoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	Poder antioxidante de redução férrica
Gp91phox	Glutathione peroxidase 91phox
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido ortofosfórico
HCl	Ácido clorídrico
HTAB	Brometo de hexadecil trietil amônio
IκB	Fator inibidor de κB
IL	Interleucina

INCA	Instituto Nacional de Câncer
i.p.	Intraperitoneal
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
KCl	Cloreto de potássio
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
MAPK	Proteína ativada por mitógeno
MMP	Metaloproteinase
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NOX2	NADPH oxidase 2
NQO1	NADPH quinona oxidoreductase 1
Nrf2	Fator nuclear [derivado eritroide-2] tipo 2
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ • ⁻	Ânion superóxido
OH•	Radical hidroxila
OPD	Ortofenilenodiamina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
RNA	Ácido ribonucleico
RUV	Radiação ultravioleta
RvD1	Resolvina D1
RvD2	Resolvina D2
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SPM	Mediador pró-resolução especializado
TCA	Ácido tricloroacético
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TPTZ	2,4,6 tripiridil-S-triazina
TRIS	Hidroximetil aminometano
UVB	Radiação ultravioleta B

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Pele e a radiação ultravioleta	13
1.2	Estresse oxidativo e sistema antioxidante	16
1.3	Resposta inflamatória após radiação UVB	19
1.4	Lipídios pró-resolução e potencial terapêutico da resolvina D2 e 17(R)- resolvina D1	22
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	Materiais.....	29
3.1.1	Reagentes.....	29
3.1.2	Equipamentos	29
3.2	Métodos	30
3.2.1	Animais experimentais e modelo de indução da lesão cutânea pela radiação UVB	30
3.2.2	Protocolo experimental de avaliação da formulação tópica contendo RvD2 em camundongos	31
3.2.3	Protocolo experimental de avaliação da formulação tópica contendo 17(R)-resolvina D1 em camundongos	31
3.2.4	Preparo das formulações tópicas	32
3.2.5	Procedimento para a coleta das amostras de pele	33
3.2.6	Parâmetros inflamatórios cutâneos	35
3.2.6.1	Avaliação do edema de pele	35
3.2.6.2	Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	35
3.2.6.3	Determinação da atividade/secreção de metaloproteinase-9 (MMP-9)	36
3.2.6.4	Avaliação histopatológica por microscopia óptica	38
3.2.6.5	Dosagem da citocina pró-inflamatória IL-1 β e citocinas anti- inflamatórias TGF- β e IL-10	38

3.2.7	Parâmetros oxidativos cutâneos	39
3.2.7.1	Avaliação da capacidade antioxidante global pelos ensaios de FRAP (poder antioxidante redutor do ferro) e ABTS (atividade doadora de elétrons ao radical ABTS - (2,2' azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico).....	39
3.2.7.2	Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno GSH.....	40
3.2.7.3	Avaliação da atividade da catalase (CAT).....	40
3.2.7.4	Avaliação da produção de ânion superóxido (O ₂ •-).....	41
3.2.7.5	Avaliação da produção de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)	41
3.2.7.6	Expressão de RNAm para IL-1 β , Nrf2, gp91phox e COX-2 por reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa	42
3.2.8	Análise estatística dos resultados	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGOS CIENTÍFICOS	44
4.1	<i>Therapeutic efficacy of topical formulation containing resolin D2 (RVD2) in mice exposed to UVB radiation</i>	44
4.2	<i>Topical formulation with 17(r)-resolin D1 suppresses oxidative and inflammatory injury against UVB radiation in hairless mice</i>	78
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
6	REFERÊNCIAS	117

1. INTRODUÇÃO

1.1. PELE E A RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Considerada o maior órgão do corpo humano, a pele recobre sua superfície externa e constitui uma interface biológica entre o organismo e o ambiente. Em razão da sua complexidade, ela exerce múltiplas funções importantes como auxílio na termorregulação e excreção de substâncias, proteção contra o atrito e perda de água, e por fim atua como linha de defesa contra patógenos e agentes externos (PAWLINA; ROSS, 2021).

A histologia da pele é caracterizada por duas camadas com diferentes composições e atribuições e são denominadas de epiderme e derme, conforme evidenciado na imagem a seguir (Figura 1). A hipoderme está localizada abaixo dessas camadas e possui tecido adiposo, servindo como reserva energética e suporte para órgãos subjacentes. A derme é a camada intermediária em que se apoia a epiderme e conecta a pele à hipoderme. É rica em tecido conjuntivo contendo fibras colágenas e elásticas conferindo resistência e elasticidade, presença de fibroblastos, vasos sanguíneos e linfáticos e anexos oriundos da epiderme. Além disso, células do sistema imunológico também são encontradas como os mastócitos e macrófagos, cooperando ativamente nas respostas fisiológicas. Assim sendo, a derme é fundamental para a nutrição, oxigenação e apoio para epiderme (DEHKORDI *et al.*, 2019; PAWLINA; ROSS, 2021).

A epiderme, camada mais externa, está em contato direto com fatores ambientais. É composta por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, cujas células em abundância são os queratinócitos. Camadas de queratinócitos se diferenciam e migram para a superfície, perdendo seus núcleos e acumulando queratina em seus citoplasmas, formando uma barreira protetora chamada de estrato córneo. O estrato córneo é constantemente renovado através das células localizadas no estrato basal, as quais sofrem intensa atividade mitótica. Adicionalmente, a epiderme apresenta outros tipos celulares: os melanócitos, responsáveis pela produção da melanina atribuindo pigmentação cutânea; células de Langerhans com função imunológica e células sensoriais de Merkel. Os queratinócitos armazenam a melanina produzida pelos melanócitos, bloqueando a radiação solar e protegendo a

pele contra os danos (DAMIANI; ULLRICH, 2016; NGUYEN; SOULIKA, 2019).

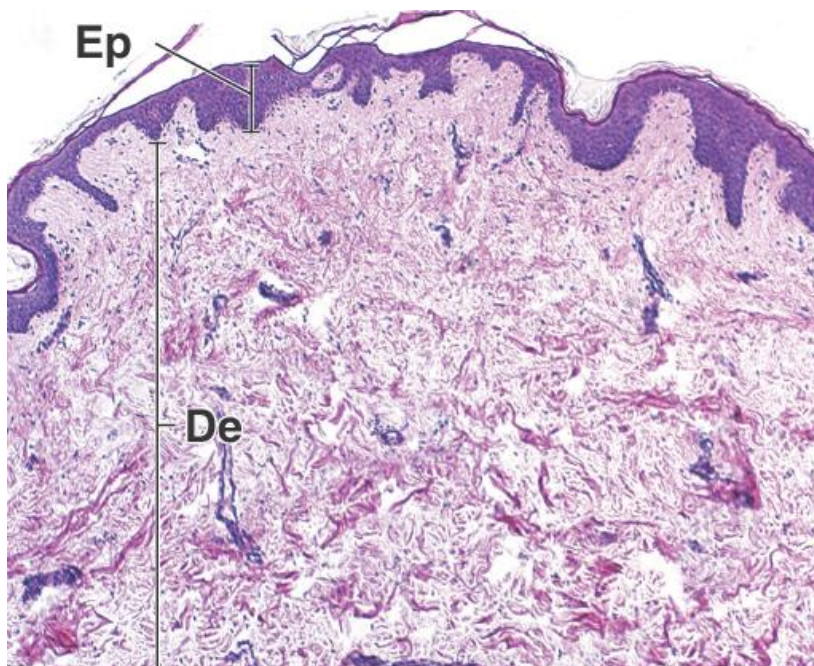


Figura 1: Histologia da pele humana mostrando as camadas epiderme (Ep) e derme (De). Coloração Hematoxilina-Eosina (PAWLINA; ROSS, 2021).

Nesse contexto, a pele é suscetível a diversos fatores agressores que podem ser prejudiciais para sua integridade, incluindo a radiação ultravioleta (RUV). Em baixas quantidades, a RUV possui efeitos benéficos como a participação na síntese de vitamina D. Entretanto, quando a dose de radiação se torna acentuada pode acarretar em danos irreversíveis à pele que, a longo prazo, resultam em fotocarcinogênese (D'ORAZIO *et al.*, 2013; LERCHE; PHILIPSEN; WULF, 2017).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de pele não melanoma é o mais prevalente no Brasil. Ele é subdividido em basocelular e espinocelular, de acordo com a localização do neoplasma na epiderme e sua evolução, afetando células do estrato basal e células superficiais respectivamente. Estima-se que o número de casos novos desse tipo de neoplasia para cada ano do triênio de 2023 a 2025 é de 220.490, o que corresponde a um risco estimado de 101,95 por 100 mil habitantes. Ainda, existe o câncer do tipo melanoma, que é menos comum e mais agressivo, tendo como origem os melanócitos e alta probabilidade de disseminação. O principal fator de risco para esses tipos de câncer é a exposição à RUV (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), 2022).

Nos últimos anos, um aumento da RUV que atinge a superfície da Terra é constatado devido principalmente à destruição da camada de ozônio, ameaçando diferentes formas de vida e também promovendo uma ampliação no número de casos de doenças cutâneas (UMAR; TASDUQ, 2022). Em vista disso, a busca por novas terapias torna-se imprescindível para controlar e prevenir os efeitos deletérios induzidos pela RUV. Cabe ainda ressaltar que, o uso de filtros solares não é uma proteção totalmente eficaz, uma vez que alguns estudos indicam a presença de reações alérgicas oriundas de alguns componentes e formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), além de permitir períodos mais prolongados de exposição ao sol devido à redução dos sinais de queimaduras solares (SKOTARCZAK *et al.*, 2015).

A RUV pertence ao espectro eletromagnético da luz solar e é classificada em três subtipos, conforme o seu comprimento de onda. O espectro UVC (100-280 nm) é o mais lesivo e altamente energético, mas ainda é filtrado pela camada de ozônio, apesar de ter modificações na camada que afetam a quantidade de radiação absorvida na superfície terrestre. As faixas UVA (320-400 nm) e UVB (280-320 nm) são capazes de atingir a atmosfera e causar alterações cutâneas preocupantes (GROMKOWSKA-KĘPKA *et al.*, 2021).

UVA compõe 95% da radiação terrestre e provoca dano oxidativo nas camadas mais profundas da pele, incluindo a derme e também o tecido subcutâneo. Já UVB alcança cerca de 5% da radiação e seu alvo é a camada epidérmica e parte da derme papilar. Apesar de ter menor proporção na radiação terrestre absorvida, UVB é responsável por acometer diretamente o ácido desoxirribonucleico (DNA) de queratinócitos, resultando em fotoprodutos mutagênicos como dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) e fotoprodutos de pirimidina (6-4). Lesões no DNA que não são reparadas desempenham papel crucial no desenvolvimento do câncer (MOHANIA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2019).

Na condição de dano celular, o gene supressor tumoral p53 gerencia a manutenção do genoma, reprimindo a proliferação de células alteradas e executando a parada do ciclo celular para o reparo. Se o mesmo não ocorre, o processo de morte celular programada é ativado. Após a exposição excessiva à radiação UVB, queratinócitos sofrem o fenômeno apoptótico e adquirem mudanças histológicas apresentando o núcleo condensado e citoplasma eosinofílico, passando a serem chamados de “*sunburn cells*” com tradução para “células queimadas pelo sol” (LIU-

SMITH; JIA; ZHENG, 2017; SHEEHAN; YOUNG, 2002).

A RUV pode ser absorvida por qualquer molécula presente na pele que tenha em sua estrutura insaturação entre os carbonos. Melanina, proteínas, lipídios ou ácidos nucleicos absorvem a energia e atingem um estado mais energético. Ao retornarem para seu estado de origem, a energia é transferida para moléculas de oxigênio gerando EROs (EMRI *et al.*, 2018). O espectro UVB é determinante para os efeitos nocivos da exposição solar e a interação direta com o DNA justifica sua importância para a fotocarcinogênese.

1.2. ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA ANTIOXIDANTE

Radicais livres são moléculas instáveis caracterizadas com elétrons desemparelhados em seu orbital e provenientes do metabolismo energético de organismos aeróbios, além de fontes exógenas como RUV, poluição, compostos cancerígenos, entre outros. Sua produção em níveis fisiológicos contribui para sinalização celular, ativação de células fagocíticas para eliminação de agressores e produção de energia na respiração celular. A maioria dos radicais são derivados do metabolismo do oxigênio, sendo designados como EROs. São eles: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($OH^{\cdot}$) e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2). Ademais, produtos metabólicos formados por nitrogênio podem dar origem às espécies reativas de nitrogênio (ERNs) como óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) (DIZDAROGLU; JARUGA, 2012; VALKO *et al.*, 2006).

Dentre as EROS, o radical hidroxila é o mais perigoso, pois reage rapidamente com as biomoléculas próximas na presença de metais. Seus danos incluem principalmente modificações no DNA. O H_2O_2 não possui elétron livre, contudo auxilia na síntese do radical tóxico hidroxila. E por fim, o ânion superóxido, um radical primário que é reduzido em O_2 e H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD) (CADET; RICHARD WAGNER, 2013).

Células que realizam a fagocitose (monócitos e neutrófilos) produzem uma fonte adicional de EROs através do *burst* respiratório para ação microbicida. Esse processo é catalisado pela enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (NOX), levando a um aumento na magnitude das lesões teciduais

(KEHRER; KLOTZ, 2015). NOX é uma família de proteínas ligadas à membrana que efetua a transferência de elétrons para o O_2 e regula a diferenciação e proliferação celular. A NOX2 está presente em fagócitos e possui uma subunidade denominada gp91^{phox} que está intimamente associada com a produção de ânion superóxido (KANG; KIM, 2016). O aumento da síntese do radical livre e da expressão da subunidade foram demonstrados após a exposição à radiação UVB na pele (KUMAGAI *et al.*, 2021).

Altas concentrações de EROs colaboram para a promoção de danos aos componentes celulares, resultando no estresse oxidativo. Os efeitos prejudiciais de EROs são contrabalanceados pelo sistema de defesa antioxidante, porém o desequilíbrio entre ambos leva ao estresse oxidativo. Logo, os mecanismos endógenos antioxidantes são fundamentais para prevenção de doenças cutâneas (NEHA *et al.*, 2019).

O sistema de defesa contra o dano oxidativo tem como intuito impedir a oxidação de um substrato e reduzir a produção de radicais livres. É dividido em enzimático e não enzimático. Antioxidantes enzimáticos consistem na SOD, catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). CAT e GPx dificulta a formação do radical hidroxila através da redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 . A SOD, por sua vez, converte o ânion superóxido em H_2O_2 e oxigênio, exercendo ação complementar. Glutathione reduzida (GSH), tocoferóis (vitamina E) e ácido ascórbico fazem parte do sistema não enzimático e eliminam oxidantes por meio da doação de elétrons (ALI *et al.*, 2020; KOSTYUK; POTAPOVICH, 2009).

A GSH é encontrada no tecido cutâneo e seus níveis são reduzidos de forma expressiva após a radiação UVB, contribuindo para o estresse oxidativo (MARTINEZ *et al.*, 2018; SAITO *et al.*, 2018). É um tripeptídeo que contém o grupamento sulfidril responsável pela sua ação antioxidante. Sua forma oxidada (GSSG) é adquirida após doar elétrons para moléculas reativas. Todavia, para que exista um equilíbrio redox GSH/GSSG, a forma oxidada é convertida para a reduzida pela glutathione redutase (GR). As funções de GSH estão relacionadas com a remoção de peróxidos, radicais livres e detoxificação (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009).

A interação entre EROs e lipídios pode desencadear uma cascata de reações, levando à peroxidação lipídica como demonstrado na figura 2. Os ácidos graxos poli-insaturados são os principais componentes estruturais de membranas biológicas e

podem ser oxidados, resultando na formação de radicais de ácidos graxos como o peroxil. Sem a neutralização dos produtos primários da lipoperoxidação, ocorre a propagação da oxidação para as demais moléculas, conduzindo para diversas consequências: modificações estruturais, perda funcional das proteínas de membrana e alteração da permeabilidade. Nesse processo, o ácido araquidônico é liberado pela enzima fosfolipase A2 e se torna precursor para produção de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas sob ação da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (DOBRZYŃSKA *et al.*, 2016; KHOSHKHAHESH *et al.*, 2013; YIN; XU; PORTER, 2011).

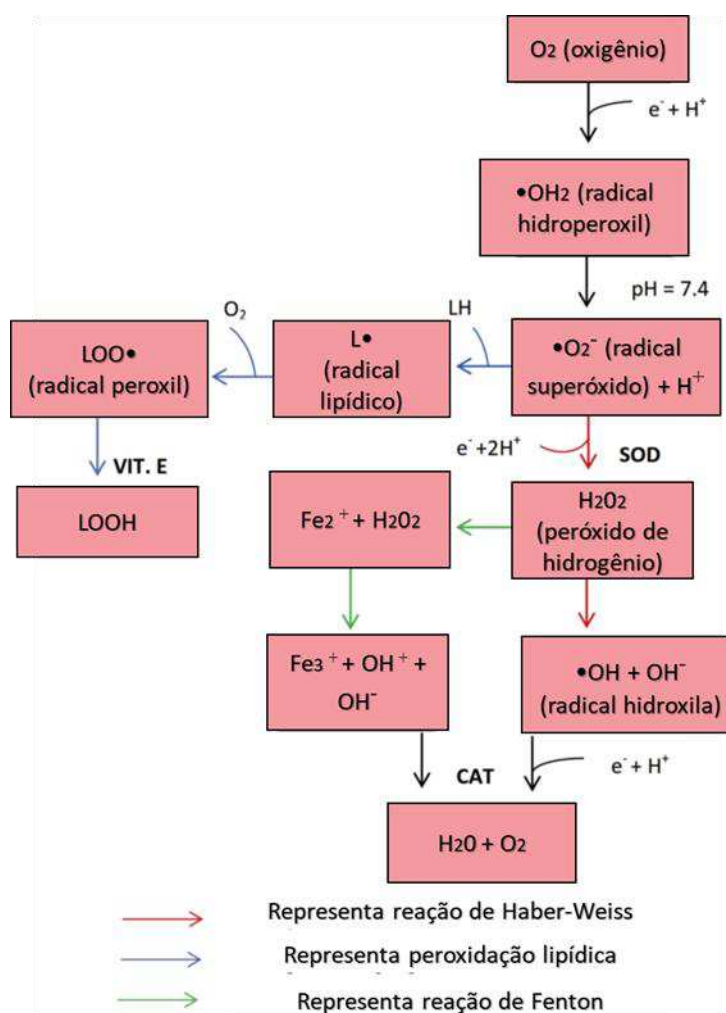


Figura 2: Formação de EROs através de várias reações (Adaptado de NEHA et al., 2019).

Além de provocar dano oxidativo a macromoléculas, UVB pode ativar diversas vias de sinalização, alterando a expressão de determinados genes. O fator de

transcrição Nrf2 (fator nuclear [derivado eritróide-2] tipo 2) é sensibilizado graças à produção acentuada de EROs induzida por UVB. O Nrf2 está localizado no citoplasma e geralmente está associado com a proteína Keap1. Um estudo demonstrou que o aumento da expressão da proteína Keap1 tem regulação negativa, impedindo a ida do Nrf2 para o núcleo. Entretanto, em condições estressoras esse complexo é dissociado e Nrf2 é direcionado para o núcleo, ligando-se ao elemento de resposta antioxidante (ARE). Como resultado da sua ativação, Nrf2 estimula a expressão de seus genes-alvo com funções citoprotetoras e antioxidantes como a hemeoxigenase-1 (HO-1), NADPH quinona oxidoreductase 1 (NQO1), GR e GPx (BAIRD; YAMAMOTO, 2020; WEI *et al.*, 2021).

A HO-1 é uma enzima capaz de degradar o grupamento heme, resultando nos produtos biliverdina, monóxido de carbono e ferro. A biliverdina, por sua vez, é convertida em bilirrubina e ambas desempenham atividade antioxidante. Ainda, a HO-1 possui regulação positiva na expressão da ferritina e esta se liga ao ferro, prevenindo a geração de EROs (CHIANG; CHEN; CHANG, 2021). NQO1 também impede a produção de radicais livres, pois atua na redução de compostos e detoxificação (JI *et al.*, 2014). Nesta conjuntura, o Nrf2 possui mecanismos de proteção endógena através da regulação da expressão de moléculas e garantindo a sobrevivência celular.

1.3. RESPOSTA INFLAMATÓRIA APÓS RADIAÇÃO UVB

A resposta inflamatória é desencadeada após o estímulo à radiação UVB por meio da ativação de vias de resposta como a do fator nuclear kappa B (NF- κ B), umas das principais vias inflamatórias. O NF- κ B desempenha papel fundamental na indução de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, dentre outros mediadores do processo inflamatório. A proteína I κ B inibe a translocação do NF- κ B para o núcleo. Quando essa proteína inibitória sofre degradação via ubiquitina-proteassoma, o fator de transcrição é liberado para exercer sua ação (ANSARY *et al.*, 2021; KUMARI; PASPARAKIS, 2017).

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) constituem uma via de sinalização bastante importante, sendo capaz de regular eventos celulares como proliferação, diferenciação, apoptose e carcinogênese. Essa família de proteínas é dividida em JNK (quinase c-Jun N-terminal), p38 e ERK (quinase regulada por sinal

extracelular) (LEE *et al.*, 2021). As proteínas JNK respondem a estímulos agressores como RUV, microrganismos, citocinas e é responsável por fosforilar moléculas-alvo como o ativador de proteína 1 (AP-1). A propósito, AP-1 possui papel na regulação do ciclo celular e também na deterioração de componentes da matriz extracelular por meio da expressão de enzimas metaloproteinases (HAMMOUDA *et al.*, 2020).

O processo inflamatório é complexo e envolve diversos componentes gerados na tentativa de resposta do organismo a uma lesão ou presença de um agente infeccioso (BÄSLER; BRANDNER, 2017). Neste contexto, queratinócitos formam uma barreira protetora contra a radiação UVB, tornando-se alvos diretos de danos e também são responsáveis pela expressão de citocinas pró-inflamatórias incluindo a interleucina (IL)-1 β e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Esses mediadores inflamatórios auxiliam no recrutamento de células, particularmente neutrófilos e macrófagos, para o foco inflamatório. Vale destacar que a ativação de queratinócitos amplia a resposta para as demais células imunes da pele como as células de Langerhans e mastócitos (MONTES DE OCA *et al.*, 2017).

IL-1 β é pertencente ao grupo das interleucinas (IL) -1 e demonstra atividade proeminente na inflamação frente a estímulos exógenos e endógenos. TNF- α apresenta ação similar e juntos desencadeiam a infiltração leucocitária. Por sua vez, esses leucócitos também liberam mais mediadores, englobando mais células e acentuando o processo inflamatório (KEADLE *et al.*, 2000; YAZDI; GHORESCHI, 2016). Para a limitação da magnitude da inflamação, citocinas anti-inflamatórias como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e IL-10 são produzidos e capazes de regular a ação das citocinas pró-inflamatórias e por conseguinte modular a resposta inflamatória. Recentemente, estudos demonstraram que a radiação UVB promove a síntese de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em modelos *in vivo*, reforçando seu potencial indutor. Ainda, a redução da síntese desses mediadores pró e anti-inflamatórios sugere conter o agravamento da injúria inflamatória (MARTINEZ *et al.*, 2020; MELO *et al.*, 2023; SAITO *et al.*, 2018).

Comumente, neutrófilos são as primeiras células a chegarem no foco inflamatório e uma de suas atividades compreende na liberação da enzima mieloperoxidase (MPO), que é armazenada principalmente em seus grânulos azurófilos para ação microbida. Na presença do peróxido de hidrogênio, a MPO catalisa a formação da espécie intermediária reativa denominada ácido hipocloroso.

Em vista disso, células inflamatórias representam uma fonte complementar de EROs, intensificando os danos teciduais e seus produtos podem estar associados com a carcinogênese (ARATANI, 2018; MONTES DE OCA *et al.*, 2017).

A radiação UVB é capaz de deteriorar componentes da camada dérmica. Esta camada consiste em proteínas da matriz extracelular que conferem suporte estrutural à pele. O colágeno faz parte da sua maior composição e é alvo da ação das enzimas metaloproteinases (MMP) via ativação AP-1 (LEE; HONG; KIM, 2021). As MMP, por sua vez, são proteases dependentes de zinco e podem ser produzidas por diversas células imunitárias incluindo os neutrófilos. Particularmente, a MMP-9 desempenha papel crítico na degeneração de fibras colágenas do tipo IV e sua expressão tem sido relatada em manifestações patológicas envolvendo o câncer e favorecendo a progressão tumoral e metástase, além de contribuir também ativamente no fotoenvelhecimento (CUI *et al.*, 2022; HUANG, 2018).

Queratinócitos mediados por fatores de crescimento em razão da exposição solar se proliferam resultando num espessamento epidérmico com a finalidade de proteger a pele contra os prejuízos solares. Se a lesão for suficientemente grande, a proteína p53 atua na ativação de vias apoptóticas formando as “*sunburn cells*” e exibindo alterações histológicas características. Esse processo colabora para restringir a multiplicação de células malignas e conseqüentemente o desenvolvimento da carcinogênese (SVOBODOVÁ *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012). A mutação do gene que codifica a p53 tem sido implicada em tumores de pele. Nesta condição, as células se tornam resistentes à apoptose facilitando a sua propagação clonal (BRASH, 2006).

Os principais sinais clínicos agudos derivados da resposta inflamatória induzida pela radiação UVB são eritema, edema, queimaduras solares e hiperpigmentação cutânea. O edema é resultado do aumento do líquido no espaço intersticial na pele em virtude da alteração da permeabilidade vascular. Estudos indicam que os prostanoídes com destaque para a prostaglandina E2 (PGE2) contribuem para a vasodilatação. As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico liberado das membranas celulares. Altas concentrações de PGE2 estão envolvidas na resposta inflamatória. De modo sinérgico, outros mediadores como a histamina, principal componente dos mastócitos, atua também nos eventos vasculares inflamatórios (BATTIE; VERSCHOORE, 2012; HOHJOH *et al.*, 2014; MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004).

1.4. LIPÍDIOS PRÓ-RESOLUÇÃO E POTENCIAL TERAPÊUTICO DA RESOLVINA D2 E 17(R)- RESOLVINA D1

A resposta inflamatória crônica colabora com o desenvolvimento de doenças graves. Com a finalidade de restabelecer a homeostase tecidual e controlar a injúria inflamatória, são produzidos mediadores pró-resolução especializados (SPMs), nos quais orquestram ativamente a resolução da inflamação. Esses mediadores ativam mecanismos de reparo tecidual e restringem a infiltração de células imunitárias. Assim sendo, a falha do término da inflamação é capaz de estender o processo e gerar modificações teciduais alarmantes, além de estar associada com doenças inflamatórias crônicas como aterosclerose, artrite reumatoide e doenças pulmonares (BRENNAN *et al.*, 2021; DEL CAMPO *et al.*, 2022).

Quatro grupos (lipoxinas, resolvinas, maresinas e protectinas) de SPMs foram identificados em exsudatos e demonstraram potencial terapêutico em ações resolutivas (SERHAN *et al.*, 2004). Essas moléculas são originadas a partir do ácido araquidônico e de ácidos graxos ômega-3. As lipoxinas foram os primeiros SPMs relatados e são derivados do ácido graxo poli-insaturado (ácido araquidônico) por ação de lipoxigenases (FATTORI *et al.*, 2020). Um trabalho utilizando o modelo de exposição à radiação UVB mostrou que o tratamento com a lipoxina A4 reduziu o dano tecidual cutâneo de maneira tempo-dependente (MARTINEZ *et al.*, 2018). Resolvinas, protectinas e maresinas são provenientes da conversão de ácidos graxos ômega-3 como ácido eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) (SERHAN, 2008). Ademais, um caminho adicional para a produção de SPMs é por meio da mudança funcional da enzima COX-2 para lipoxigenase na presença da aspirina. A aspirina efetua a acetilação do componente estrutural serina da COX-2, possibilitando a formação de epímeros de SPMs como o epímero da resolvina D1 (17(R)- resolvina D1) (FATTORI *et al.*, 2020).

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 constituem uma fonte nutritiva e apresentam ações benéficas à saúde humana. A configuração química possui insaturação a partir do terceiro carbono da cadeia. Além disso, sua origem majoritária é de fontes marinhas vindas da dieta, especialmente em óleos de peixe, sendo EPA e DHA os principais componentes encontrados (CHOLEWSKI; TOMCZYKOWA; TOMCZYK, 2018; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2018).

O DHA está presente em tecidos biológicos incluindo tecido nervoso e retina. Em níveis plasmáticos e em consequência de um dano inflamatório, o DHA é convertido em resolvinas da série D através de reações sequenciais por lipoxigenases como a enzima 15-lipoxigenase. As resolvinas apresentam diferenças estruturais entre si e neutralizam compostos oxidantes devido à sua capacidade de doar elétrons. Os mediadores lipídicos de interesse desse trabalho (resolvina D2 e 17(R)-resolvina D1) possuem peso molecular de 376,5 (CAYMAN CHEMICAL, 2024). A eficácia terapêutica desses mediadores ocorre por meio da ligação de receptores acoplados a proteína G (GPCR) (DOYLE; SADLIER; GODSON, 2018; SEKI *et al.*, 2010; SERHAN; CHIANG; DALLI, 2018).

As resolvinas da série D e epímeros de resolvinas efetuam atividade resolutive através de mecanismos multifatoriais baseados na fagocitose de leucócitos apoptóticos e restos celulares (eferocitose), redução de componentes pró-inflamatórios como as citocinas e infiltração de células inflamatórias e também bloqueio de vias de resposta do NF- κ B, gerando uma atenuação da extensão da resposta inflamatória e acelerando a sua resolução (CHENG; RONG, 2019; SERHAN, 2014).

O processo inflamatório até a sua resolução envolve etapas que são descritas na imagem a seguir (Figura 3).

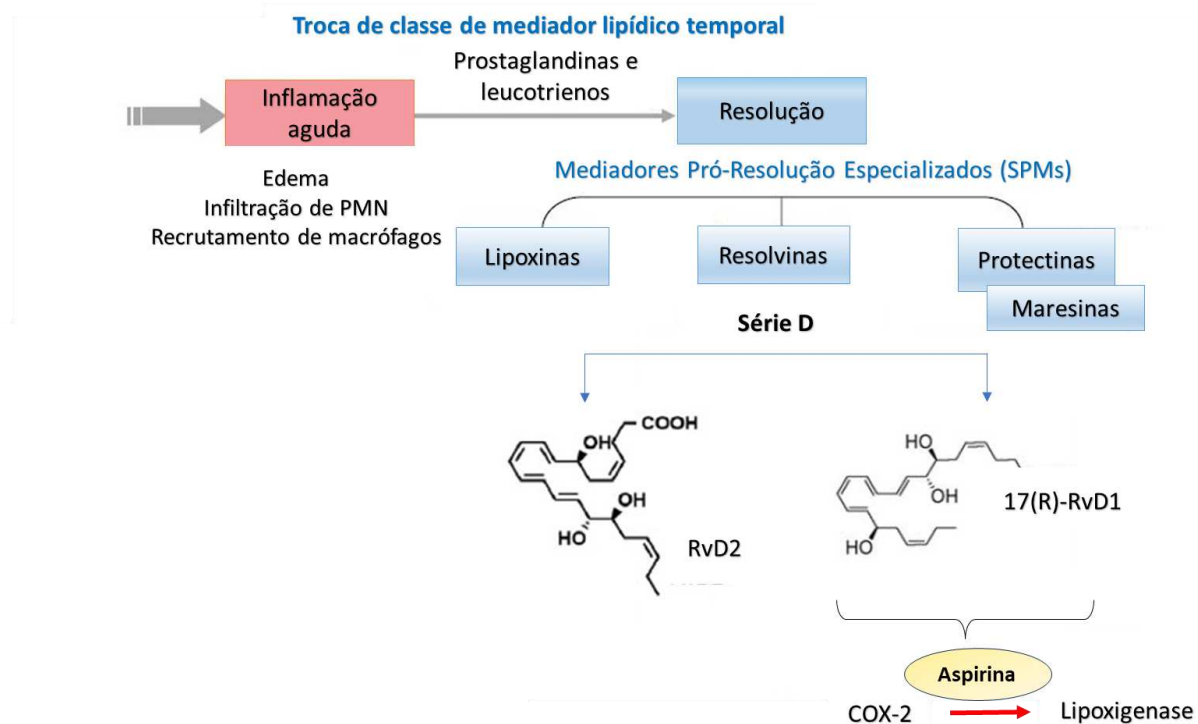


Figura 3: Mapeamento da resolução da inflamação aguda. A mudança temporal da classe de mediadores lipídicos inicia a resolução ativa e a biossíntese de SPMs. A fase de resolução inclui a redução do número de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) coincidindo com o aparecimento de SPMs (lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas) em exsudatos inflamatórios. Cada família de SPMs é estruturalmente distinta e possui potentes ações pró-resolutivas. Ainda, a produção do mediador lipídico 17(R)-RvD1 ocorre na presença da aspirina, a qual converte a função da COX-2 para lipoxigenase (Adaptado de SERHAN; JOUVENE, 2019).

A resolvina D2 (RvD2) faz parte da família de resolvinas da série D. Um dos primeiros estudos avaliando o potencial anti-inflamatório desse lipídio foi descrito por Spite e colaboradores (2009), no qual demonstrou que a RvD2 faz a contra regulação de neutrófilos e citocinas inflamatórias, além de aumentar a eferocitose, reprimindo então a sepse microbiana em um ensaio experimental (SPITE *et al.*, 2009). Alguns anos depois, a RvD2 foi capaz de inibir os canais iônicos TRPV1/TRPA1 correlacionados com a dor inflamatória induzida por estímulos inflamatórios em patas de camundongos (PARK *et al.*, 2011). É importante citar que a dor inflamatória é resultante da ativação de neurônios nociceptores, os quais são regulados por mediadores inflamatórios designados citocinas e quimiocinas (ZANINELLI *et al.*, 2022).

Especificamente, as ações terapêuticas da RvD2 estão vinculadas com a interação do receptor GPR18, expresso em leucócitos incluindo neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos (CHIANG *et al.*, 2015). A esse respeito, a expressão de mRNA desse receptor foi reduzida em linhagem de células de carcinoma oral (HSC-3), sinalizando que a fase resolutive da inflamação nessa circunstância foi prejudicada. Por outro lado, o tratamento com RvD2 revelou atividade anti-câncer e anti-inflamatória ao inibir a proliferação das células cancerosas orais e a produção de citocinas pró-inflamatórias como a TNF- α e IL-6. Ainda no mesmo trabalho, a RvD2 foi eficaz ao reduzir a atividade da MPO avaliada em tecidos da língua de camundongos inoculados com as células HSC-3 (xenoenxerto de câncer) (YE *et al.*, 2018).

Os macrófagos exercem participação relevante durante a resposta inflamatória e se diferenciam em dois subtipos de acordo com os estímulos ambientais. Os macrófagos M1 possuem caráter pró-inflamatório, isto é, estão associados com a secreção de citocinas pró-inflamatórias, EROs e encarregados no combate às infecções. Já os macrófagos M2 englobam o perfil anti-inflamatório com funções de remodelamento tecidual e angiogênese. Terapias farmacológicas que promovam a diferenciação para macrófagos M2 pode ser uma rota estratégica como tratamento de doenças inflamatórias (POPE *et al.*, 2016; YUNNA *et al.*, 2020). Pope *et al.*, 2016 relataram que a RvD2 impediu a formação do aneurisma da aorta abdominal induzido por elastase em modelo *in vivo*, pois diminuiu o dano inflamatório e alterou a polarização dos macrófagos para M2. Somado a isso, os níveis do marcador de degradação colágena (MMP-9) foram regulados negativamente, constatando a ação pró-resolução do mediador lipídico.

Na atualidade, nosso grupo de pesquisa demonstrou potencial terapêutico de alguns mediadores lipídicos frente a danos foto-oxidativos. Dentre eles, podemos destacar a resolvina D1 (RvD1), outro produto bioativo do DHA, que apresentou atividade anti-inflamatória e antioxidante no modelo de lesão cutânea induzida pela radiação UVB. Os achados mostram redução de parâmetros inflamatórios como edema, atividade de MPO e MMP-9 e finalmente a atenuação do dano oxidativo evidenciado pelos ensaios com aumento da expressão do gene que codifica enzimas antioxidantes (Nrf2) e dos níveis antioxidantes endógenos como catalase e glutathiona reduzida (SAITO *et al.*, 2018). Recentemente, o tratamento intravenoso com o análogo

da RvD1 induzido por aspirina (17(R)- resolvina D1 ou 17(R)-RvD1) também protegeu a pele contra o estresse oxidativo e inflamação causados pela radiação UVB. O reparo do tecido cutâneo foi mensurado pela redução de marcadores como a expressão da enzima inflamatória COX-2, produção de ânion superóxido e hidroperóxidos lipídicos, dano ao colágeno, entre outros (MELO *et al.*, 2023).

O papel endógeno da 17(R)-RvD1 foi investigado em outros modelos experimentais. Um estudo realizado por Bento *et al.*, 2011 identificou a sua ação terapêutica em camundongos submetidos a modelos de inflamação intestinal. Os mecanismos inibitórios pela 17(R)-RvD1 contra o dano inflamatório colônico foram demonstrados pela redução da expressão de RNAm para NF- κ B aliada aos seus componentes inflamatórios como moléculas de adesão VCAM-1 (molécula de adesão vascular-1) e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), como também ativação proteica limitada da subunidade p65 do NF- κ B analisada por imunohistoquímica e da quimiocina CXCL1/KC (quimiocina derivada de queratinócitos) por ensaio imunoenzimático. Quimiocinas e moléculas de adesão são encarregadas por guiar as células imunes para o local inflamado e são ativadas pela importante via indutora do NF- κ B. Ainda no mesmo trabalho, cultura de macrófagos estimulada com lipopolissacarídeo (LPS) foram tratadas com 17(R)-RvD1 e o antagonista seletivo do receptor de lipoxina A4 (ALX) (BOC-1), os resultados mostraram que BOC-1 reverteu o efeito inibitório do lipídio na liberação de citocinas, indicando que o efeito anti-inflamatório é dependente da ligação com o receptor ALX/FPR2 (BENTO *et al.*, 2011).

Outro mecanismo de ação da 17(R)-RvD1 é através da interação com o receptor GPR32, do mesmo modo que a resolvina D1 (CHIANG; SERHA, 2020; KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2012). Curiosamente, os epímeros de resolvinas induzidos pela aspirina são menos propensos à sofrerem ação de enzimas inativadoras oxirredutases, tornando-se mais estáveis e ampliando seu potencial (ORR *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2007).

Anteriormente, SPMs induzidos por aspirina incluindo 17(R)-RvD1 promoveram efeito antitumoral ao inibir a progressão de células da linhagem de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC), adenocarcinoma de cólon (MC38) e carcinoma mamário (4T1). Em seguida, observou-se que esses lipídios favorecem a fagocitose pelos macrófagos de restos celulares tumorais gerados por quimioterapia em modelo *in vitro* (GILLIGAN *et al.*, 2019). Resíduos celulares tumorais são formados na terapia do

câncer, desencadeando o processo inflamatório com mediação de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que a inflamação representa um papel crucial na tumorigênese (SULCINER *et al.*, 2018). Por fim, as comprovações do trabalho mostram que SPMs induzidos por aspirina em baixas concentrações constituem uma forma terapêutica eficaz contra a carcinogênese sem a possível toxicidade de doses mais altas do anti-inflamatório aspirina (GILLIGAN *et al.*, 2019).

De forma geral, fica evidente o potencial da RvD2 e 17(R)-RvD1 em conduzir a resolução da inflamação e conter os danos teciduais causados, tornando-se novos alvos terapêuticos. Além disso, a administração de formulações tópicas apresenta perspectivas interessantes para a fotoquimioprevenção, pois atua sobre a lesão cutânea de forma local e minimiza impactos negativos decorrentes de outras vias de administração como a toxicidade sistêmica e a atividade reduzida do ativo pelo efeito de primeira passagem (MARTINEZ *et al.*, 2018). Portanto, a finalidade do presente trabalho é avaliar a eficácia desses SPMs em formulação tópica contra a radiação UVB, dado que esse estudo ocorrerá de forma inédita e contribuirá para o esclarecimento dos efeitos que são desencadeados e também para o desenvolvimento de novos medicamentos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial terapêutico dos lipídios pró-resolução RvD2 e 17(R)-RvD1 administrados por via tópica para o controle dos danos oxidativos e inflamatórios induzidos pela radiação UVB.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito das formulações tópicas contendo RvD2 ou 17(R)-RvD1 em camundongos sem pelo, no modelo de lesão cutânea induzida pela radiação UVB através dos seguintes parâmetros:

- Edema de pele;
- Migração do infiltrado leucocitário (ensaio da mieloperoxidase);
- Atividade/secreção de metaloproteinase-9;
- Avaliação histopatológica para determinação da espessura epidérmica e apoptose de queratinócitos (coloração de hematoxilina-eosina), contagem de mastócitos (coloração de azul de toluidina) e degradação das fibras colágenas (tricroômico de masson);
- Produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β) e anti-inflamatórias (TGF- β e IL-10);
- Avaliação da capacidade antioxidante global cutânea por meio dos ensaios de FRAP (poder antioxidante de redução férrica) e ABTS (2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico);
- Níveis do antioxidante endógeno GSH e atividade da catalase;
- Produção de ânion superóxido e hidroperóxidos lipídicos;
- Expressão de RNAm para Nrf2, gp91^{phox} e COX-2 por reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Reagentes

RvD2 e 17(R)-RvD1 com pureza $\geq 95\%$ foram obtidas da Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA); terc-butil hidroperóxido, azul brilhante R, glutatona reduzida (GSH), brometo de hexadeciltrimetil amônio (HTAB), 2,2'azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ), Trolox, ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), o-dianisidina, *nitroblue tetrazolium* (NBT), bisacrilamida foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Hidroximetil aminometano (TRIS) da Amresco (Solon, OH, USA). Os excipientes usados para o preparo da formulação tópica foram obtidos da Galena (Campinas, SP, Brasil). Kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas da eBioscience (San Diego, CA, USA). Acrilamida, dodecil sulfato de sódio (SDS), enzima transcriptase reversa (Superscript® III), Oligo (dT)12-18 primers, Platinum SYBRGreen® e primers da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1.2. Equipamentos

Agitador mecânico, Fisatom®; Balança analítica, HR-120, A&d®, precisão de 4 casas; 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 985370); Lâmpada ultravioleta fluorescente PHILIPS TL/12 40W RS-UVB, MedicalHoland®; Leitor de microplaca, Enspire, Perkin Elmer®; Leitor de microplaca, Multiskan GO, Thermo Scientific; Luminômetro Glomax® 20/20; 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®.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Animais experimentais e modelo de indução da lesão cutânea pela radiação UVB

Foram utilizados camundongos sem pelo da linhagem HRS/J, de ambos os sexos e adultos, com peso de 20 a 30g. Os camundongos foram mantidos em uma sala com temperatura controlada (22 ± 2 °C) localizada no Biotério do Centro de Ciências da Saúde/UEL, utilizando ciclo de claro/escuro (12/12 h) com água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos conforme as normas da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (registrado no Ofício Circular CEUA nº148/2016, processo CEUA nº 11146.2016.97). Todos os esforços foram feitos para minimizar o uso de animais e seu sofrimento.

A fonte de luz utilizada nos experimentos de indução de estresse oxidativo e processo inflamatório agudo foi uma lâmpada UVB fluorescente modelo PHILIPS TL/12 40W RS (MEDICAL-HOLANDA). A lâmpada emite radiação na faixa de 270 a 400 nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm e foi acoplada no interior de uma caixa retangular de madeira desenvolvida especificamente para a indução da lesão cutânea, com capacidade máxima para 6 caixas de polipropileno para acondicionamento de camundongos. A medida da irradiância desta lâmpada 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), tornando-se possível a posterior padronização da dose de radiação para 4,14 J/cm² (CAMPANINI *et al.*, 2013; IVAN *et al.*, 2014).

Os camundongos foram distribuídos nas caixas a 20 cm de distância da lâmpada e posteriormente cobertos com tela plástica para que eles permanecessem dentro delas com livre movimentação, além de estarem completamente expostos à luz ultravioleta. Devido à variação de emissão de luz ao longo da lâmpada, foi realizada uma rotatividade entre as caixas.

3.2.2. Protocolo experimental de avaliação da formulação tópica contendo RvD2 em camundongos

Os animais foram tratados com formulação tópica contendo RvD2 ou tratados com a formulação base (somente o veículo). Com o auxílio de um pincel, as formulações foram distribuídas em todo o dorso dos animais (0,5 g de formulação) 1h antes, 5 min antes e 5 min após o fim da irradiação (KUMAGAI *et al.*, 2021). A dose de RvD2 (1,0 ng/tratamento) utilizada na formulação foi baseada em resultados obtidos em experimentos de dose resposta via intraperitoneal realizados no laboratório.

Camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais contendo 6 animais cada de acordo com a descrição a seguir:

- (1) grupo não radiado;
- (2) grupo radiado e não tratado;
- (3) grupo radiado e tratado com a formulação controle (sem RvD2);
- (4) grupo radiado e tratado com a formulação contendo 1,0 ng/tratamento de RvD2.

3.2.3. Protocolo experimental de avaliação da formulação tópica contendo 17(R)-resolvina D1 em camundongos

A dose de 17(R)-RvD1 (0,9 ng/tratamento) incorporada na formulação foi estabelecida de acordo com experimentos de dose resposta deste trabalho e um estudo recente do nosso grupo de pesquisa utilizando outra via de administração (MELO *et al.*, 2023). Os animais foram tratados por via tópica com 0,5 g da formulação (com ou sem 17(R)-RvD1) na parte dorsal de 6 em 6 horas com total de três tratamentos, dando início 6 horas antes da irradiação (MELO *et al.*, 2021), como demonstrado na figura 5.

Para os ensaios, os camundongos foram alocados de forma aleatória em quatro grupos com 6 animais cada:

-Grupo 1: controle não irradiado;

- Grupo 2: controle irradiado e não tratado;
- Grupo 3: irradiado e tratado com formulação tópica sem 17(R)-RvD1;
- Grupo 4: irradiado e tratado com formulação tópica contendo 0,9 ng/tratamento de 17(R)-RvD1.

3.2.4. Preparo das formulações tópicas

As porcentagens dos componentes utilizados para o preparo das formulações constam na Tabela 1. É importante citar que as formulações foram elaboradas com a mesma proporção, diferenciando somente na adição do lipídio pró-resolução (RvD2 ou 17(R)-RvD1).

Tabela 1: Componentes da formulação tópica

Matérias-primas		%
A	Polawax® ¹ (emulsionante e doador de viscosidade)	2%
	Triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico (emoliente)	5%
B	Água	qsp* 100%
	Dispersão de Aristoflex® ² 5%	20%
C	Propilenoglicol (umectante e solubilizante)	6%
	Phenonip® ³ (conservante)	0,8%

¹Polawax®: Base auto emulsionante não-iônica (álcool cetosteárilico + monoestearato de sorbitol polioxietileno 20 0E);

²Aristoflex®: Co-polímero do ácido sulfônico acriloldimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado (formador de gel aniônico);

³Phenonip®: mistura de parabenos e fenoxietanol;

*Quantidade suficiente para preparação.

Para o preparo da formulação foram aquecidas separadamente a fase A e a fase B até a temperatura de 70 °C. Após a fusão dos sólidos e quando as duas fases atingiram a temperatura determinada, verteu-se a fase B sobre a fase A com agitação

constante até a formação de uma emulsão e resfriamento completo. Em seguida, a fase C foi incorporada. Após 24 horas do preparo da formulação foi adicionada a RvD2 (1,0 ng/0,5 g de formulação) ou 17(R)-RvD1 (0,9 ng/0,5 g de formulação) para o tratamento dos animais.

3.2.5. Procedimento para a coleta das amostras de pele

Os animais foram anestesiados terminalmente com isoflurano e amostras de pele da região dorsal foram coletadas 12 horas após a radiação para os testes de edema, atividade da MPO, MMP-9, histologia, avaliação do FRAP, ABTS e níveis de GSH. Em outra série de experimentos, as amostras foram coletadas após 2 horas do fim da exposição à UVB para os testes de catalase, produção de ânion superóxido (NBT) e hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Por último, citocinas e expressão do mRNA por PCR quantitativo foram analisados por meio das amostras de pele coletadas 4 horas após a radiação. Nestes últimos tempos citados (2 e 4 horas), os animais foram anestesiados com isoflurano e decaptados. Cada parâmetro foi analisado em um tempo específico de coleta após determinação prévia em outros trabalhos do grupo (MELO *et al.*, 2023; SAITO *et al.*, 2018).

As peles foram separadas para cada teste e armazenadas a -80°C para as análises, exceto para o teste de edema cutâneo, que foi realizado logo após a coleta, e para a avaliação histopatológica, que foram coletadas e adicionadas em formol a 10% até serem processadas.

A seguir, as figuras 4 e 5 demonstram o esquema do tratamento tópico e os tempos de coleta das amostras de pele para avaliação da eficácia dos mediadores lipídicos de interesse.

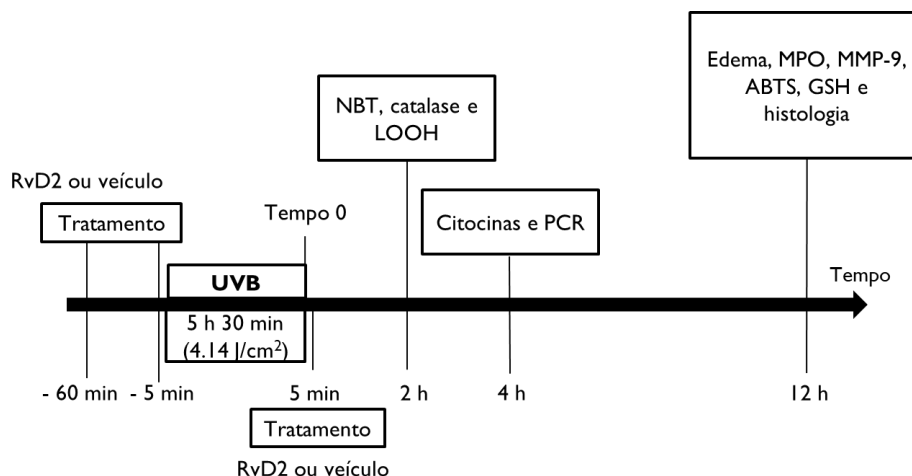


Figura 4: Fluxograma dos tempos de tratamentos tópicos e coletas das peles para avaliação da formulação tópica contendo RvD2 através de parâmetros inflamatórios e oxidativos. Foi realizado um pré-tratamento com a RvD2 (1,0 ng/tratamento) 1 h antes, 5 min antes e 5 min após o fim da irradiação. Os animais foram submetidos à radiação UVB por 5 h e 30 min (4,14 J/cm²). Os animais foram eutanasiados e as amostras foram coletadas em tempos distintos: 2, 4 e 12 h após a radiação UVB de acordo com o teste a ser realizado (Adaptado de KUMAGAI *et al.*, 2021).

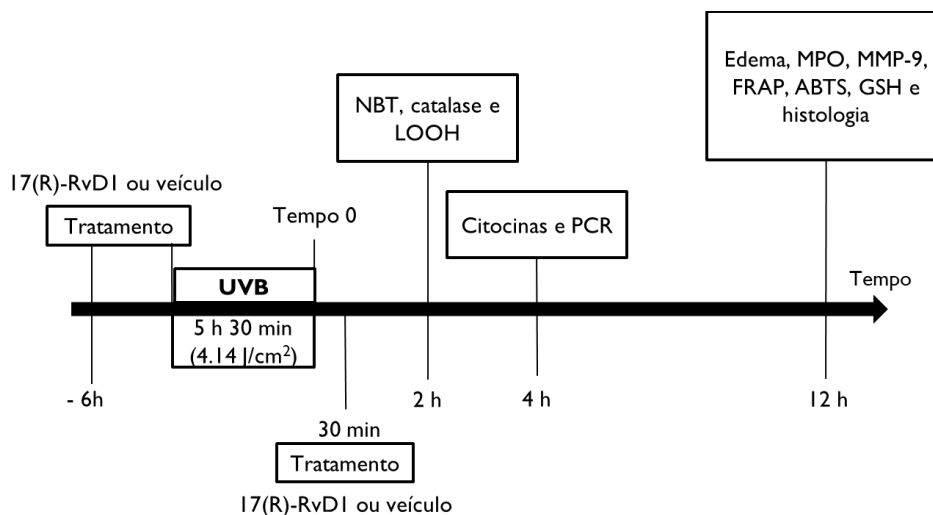


Figura 5: Fluxograma dos tempos de tratamentos tópicos e coletas das peles dos animais para avaliação da formulação tópica contendo 17(R)-RvD1 através de parâmetros inflamatórios e oxidativos. Foi realizado um tratamento com a 17(R)-RvD1 (0,9 ng/tratamento) 6 h antes, logo antes e 30 min após a irradiação. Os animais foram irradiados por 5 h e 30 min (4,14 J/cm²). Os animais foram eutanasiados e as amostras de pele foram coletadas em tempos distintos: 2, 4 e 12 h após a radiação UVB de acordo com o teste a ser realizado (Adaptado de KUMAGAI *et al.*, 2021).

3.2.6. Parâmetros inflamatórios cutâneos

3.2.6.1. Avaliação do edema de pele

Um dos sinais clínicos agudos após a exposição da radiação UVB é o edema, fenômeno que ocorre em seguimento a modificação da permeabilidade vascular e apresenta como característica o extravasamento do conteúdo plasmático para o espaço intersticial (KAJIYA; HIRAKAWA; DETMAR, 2006). As amostras de pele foram coletadas com um molde de área fixa (5 mm de diâmetro) e a análise foi determinada pela comparação do peso cutâneo entre os diferentes grupos (expresso em mg de pele) (IVAN *et al.*, 2014).

3.2.6.2. Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

O ensaio avalia de forma indireta o influxo de neutrófilos pela atividade da enzima mieloperoxidase após a radiação UVB. O princípio do teste se baseia na formação de um composto colorido em decorrência da oxidação do substrato orto-dianisidina promovida pela MPO (CAMPANINI *et al.*, 2013; IVAN *et al.*, 2014).

As amostras de pele foram coletadas e homogeneizadas com o tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetil amônio (HTAB). Elas foram homogeneizadas com o auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370) e posteriormente centrifugadas (16.100 g por 2 min a 4 °C). Para a reação colorimétrica, foram adicionados 30 µL do sobrenadante de cada amostra juntamente com 200 µL de uma solução contendo 10% de tampão fosfato 0,05 M (pH 6,0), 0,0167 % de *orto*-dianisidina e 0,015% de H₂O₂ em água deionizada. A atividade da MPO das amostras foi determinada espectrofotometricamente em 450 nm (EnSpire, Perkin Elmer) e comparada a uma curva padrão de neutrófilos com concentração conhecida. Os resultados obtidos foram expressos em números de neutrófilos/mg de pele (CASAGRANDE *et al.*, 2006).

3.2.6.3. Determinação da atividade/secreção de metaloproteinase-9 (MMP-9)

Para a determinação da enzima MMP-9, o método de zimografia em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi empregado com a finalidade de identificar enzimas que degradam a gelatina do gel (FONSECA *et al.*, 2011). A MMP-9 é uma enzima proteolítica que deteriora a matriz extracelular e está associada com o fotoenvelhecimento (CUELHO *et al.*, 2018; SAITO *et al.*, 2016).

Foi feito um pool das amostras de pele de cada grupo e foram homogeneizadas com auxílio do Tissue-Tearor (Biospec 985370), na proporção 1:4 em tampão fosfato Tris/HCl 50 mM (pH 7,4) com cloreto de cálcio (CaCl_2) e 1% de inibidores de proteinases (fenantrolina, fluoreto de fenilmetilsulfonila e N-etilmaleimida). Os homogenatos foram duplamente centrifugados a 12.000 g por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes foram utilizados para o ensaio. 50 µL do sobrenadante das amostras foi diluído em 10 µL de tampão Tris/HCl (pH 6,8) contendo 20% de glicerol, 4% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,001% de azul de bromofenol. Posteriormente, estas amostras foram colocadas em banho-maria a 37 °C durante 8 minutos imediatamente antes de ser aplicada no gel de eletroforese.

O gel contém 1 mm de espessura e é composto por duas partes, um gel de separação e de concentração, preparados conforme a tabela 2.

Tabela 2: Componentes 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 o preparo da solução contendo os dois géis, os mesmos foram aplicados um por vez no aparato do sistema de eletroforese Mini Vertical (Bio-RAD®). Posteriormente, o gel foi acoplado no suporte que fica no interior da cuba de eletroforese, preenchida 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-corrida de 10 mA por 15 minutos. Em seguida, foram aplicados 15 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.

Após o término da corrida com as amostras, o gel de poliacrilamida foi retirado da cuba e submetido à lavagem, sob agitação constante, com a solução de Triton X-100 2% durante 1 hora. Posteriormente, o gel foi incubado por 16 horas a 37 °C em tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7.4) contendo CaCl₂ 10 mM. Na etapa seguinte, 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). Zonas de atividade enzimática foram detectadas como regiões de coloração negativa contra um fundo

escuro. A atividade proteolítica foi analisada por meio da comparação das diferenças de densidades de cor entre as bandas de cada grupo pelo programa Image J® (NIH, Bethesda, MD, USA).

3.2.6.4. Avaliação histopatológica por microscopia óptica

As amostras de pele foram coletadas 12 horas após UVB, fixadas em formol a 10% até serem processadas. Posteriormente, foram desidratadas em banhos de soluções de etanol com concentrações crescentes (70%, 95% e 100%) e diafanizadas com xilol para inclusão de parafina. Foram preparadas secções de 5 µm de amostras de pele e coradas com hematoxilina-eosina (H&E), sendo examinadas utilizando microscopia óptica a ampliações de 400 e 1000x para determinação da espessura epidérmica (DENG *et al.*, 2015) e número de queratinócitos apoptóticos (SCHWARZ *et al.*, 1995), respectivamente.

Além disso, secções dos tecidos também foram coradas com o azul de toluidina para determinação de mastócitos e foram observados por microscopia óptica com o aumento de 400x. As análises foram feitas com o Infinity Analyze (Lumenera® Software) (MOURET *et al.*, 2015). Por fim, secções dos tecidos foram coradas com tricrômico de masson para análise de possíveis alterações nas fibras de colágeno (ampliação de 100x) e a intensidade da coloração azul nas áreas dérmicas da pele foi analisada pelo software Image J® (NIH) (SONG *et al.*, 2016).

3.2.6.5. Dosagem da citocina pró-inflamatória IL-1β e citocinas anti-inflamatórias TGF-β e IL-10

As amostras de pele foram coletadas em salina (500 µL) e homogeneizadas com o Tissue-Tearor (Biospec 985370). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 2.000 g por 15 min a 4 °C e os sobrenadantes foram coletados para a análise. A quantificação das citocinas foi realizada por meio da técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche com diferentes kits comerciais disponíveis de acordo com as instruções de uso do fabricante e conforme descrito previamente (VERRI *et al.*, 2008). Os resultados foram obtidos comparando as densidades ópticas em 490 nm das amostras com as densidades das respectivas

curvas padrões das citocinas (expressos em picogramas de citocina/mg de proteína).

3.2.7. Parâmetros oxidativos cutâneos

3.2.7.1. Avaliação da capacidade antioxidante global pelos ensaios de FRAP (poder antioxidante redutor do ferro) e ABTS (atividade doadora de elétrons ao radical ABTS - (2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

As amostras de pele dos diferentes grupos foram coletadas e homogeneizadas em 400 µL de KCl (1,15%) com auxílio do Tissue-Tearor (Biospec 985370), centrifugadas a 1.000 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi retirado e armazenado para os dois ensaios.

Para a reação de FRAP foram utilizados 30 µL do sobrenadante do homogenato da amostra e 150 µL de reagente FRAP. O reagente de FRAP foi preparado adicionando 2,5 mL de uma solução 10 mM de 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ) em HCl 40 mM com 2,5 mL de cloreto de ferro hexahidratado 20 mM 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. Em seguida, foi realizada a leitura em 595 nm (EnSpire, Perkin Elmer). Soluções padrão com diferentes concentrações de Trolox (0,039 a 40 nmol) (antioxidante análogo da vitamina E) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como nmol de equivalente de Trolox/mg de pele. O ensaio de FRAP mede a redução férrica do TPTZ para um produto colorido por meio da ação de antioxidantes que doam elétrons para a reação (KATALINIC *et al.*, 2005). Além disso, foi adaptado e utilizado para avaliar o poder antioxidante de amostras da pele (MARTINEZ *et al.*, 2015).

Para a reação de ABTS, foram utilizados 7 µL do sobrenadante das amostras e 200 µL da solução de ABTS diluída previamente. A solução de ABTS foi produzida reagindo 7 mM da solução de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. A mistura foi armazenada em frasco âmbar a temperatura ambiente por 16 horas antes do uso. A solução ABTS foi diluída com tampão fosfato (pH 7.4) até atingir uma absorbância de 0,8 em 730 nm. A reação foi incubada por 6 min e a leitura das amostras foi também realizada a 730 nm (EnSpire, Perkin Elmer). Uma curva padrão foi preparada com

diferentes concentrações de trolox (0,039 a 40 nmol) e os resultados foram expressos em nmol de equivalente de trolox/mg de pele. A capacidade antioxidante de cada amostra é medida através do decaimento da coloração do radical cátion ABTS⁺ quando ocorre doação de elétrons a ele feita pelo antioxidante (KATALINIC *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2015).

3.2.7.2. Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno GSH

O antioxidante GSH possui o grupamento sulfidrila que neutraliza substâncias oxidantes e doa elétrons para essas moléculas reativas, tornando-se importante para a homeostasia da pele após a radiação UVB (D'ORAZIO *et al.*, 2013). Neste ensaio, GSH doa elétrons para o ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), convertendo em um produto colorido (AEBI, 1984; SRINIVASAN; SABITHA; SHYAMALADEVI, 2007).

As amostras de pele foram diluídas (1:4) em EDTA 0,02 M e trituradas utilizando o Tissue-Tearor (Biospec 985370). Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 50% na proporção de 1:0,2 de EDTA e TCA, respectivamente. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 2.700 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente a 2.700 g por mais 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante final foi removido para análise. Para a quantificação dos níveis de GSH, foram adicionados 50 µL do sobrenadante da segunda centrifugação em microplaca juntamente com 100 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e 5 µL de uma solução de 1,9 mg/mL de DTNB em metanol. Após 5 minutos de incubação, a leitura da microplaca foi realizada no espectrofotômetro (EnSpire, Perkin Elmer) em 405 nm. A curva padrão foi preparada com 0 a 150 µM de GSH. Os resultados foram expressos em µM de GSH/mg de pele (SRINIVASAN; SABITHA; SHYAMALADEVI, 2007).

3.2.7.3. Avaliação da atividade da catalase (CAT)

A enzima CAT tem como função converter o H₂O₂ em água e oxigênio. O princípio da técnica se baseia na decomposição do H₂O₂ seguida da diminuição de absorvância. A diferença de absorvância por unidade de tempo mede a atividade da enzima (AEBI, 1984). As amostras de pele dos animais foram homogeneizadas em

500 µL de EDTA 0,02 M com auxílio do Tissue-Tearor (Biospec 985370). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 2.700 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante final foi retirado para análise. Para a reação, foram adicionados 10 µL amostra, 160 µL tampão Tris-HCl 1M com EDTA 5 mM pH 8,0, 20 µL água deionizada e 20 µL H₂O₂ 200 mM. Foi incluído um branco para cada amostra preparado com 10 µL do sobrenadante da 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 através 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 microplacas (EnSpire, Perkin Elmer) a 240 nm com temperatura mantida em 25 °C. Os valores de catalase foram expressos como unidade de catalase/mg de pele/minuto (AEBI, 1984).

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

A quantidade do radical ânion superóxido é excessiva em contato com os raios UVB (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HIRAMOTO *et al.*, 2012). Este método foi baseado na redução do *nitroblue tetrazolium* (NBT). As amostras de pele foram homogeneizadas com o Tissue-Tearor (Biospec 985370) em EDTA 0,02 M e centrifugadas (2.000 g por 20 segundos a 4°C). Primeiramente, 50 µL do sobrenadante de cada amostra foi adicionado em microplaca e incubado por 1 hora. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e foi adicionado o NBT (1 mg/mL) ao meio. Depois de incubar por 15 minutos, o sobrenadante foi retirado 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 o composto formazan (NBT reduzido). A formação desse composto foi medida em espectrofotômetro (EnSpire, Perkin Elmer) a 620 nm e os resultados foram apresentados como densidade óptica (OD)/10 mg de pele (CAMPANINI *et al.*, 2013).

3.2.7.5. Avaliação da produção de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)

Hidroperóxidos lipídicos constituem os produtos primários da peroxidação lipídica. O método utilizado é fundamentado na quimiluminescência iniciada pelo terc-

butil hidroperóxido descrito anteriormente (GONZALEZ-FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991) e adaptado por Martinez et al. (2015). As amostras de pele foram coletadas e homogeneizadas em 800 μ L de tampão fosfato (pH 7.4) com o homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370) e posteriormente centrifugadas a 700 g por 2 minutos a 4 °C. Para o ensaio, 70 μ L do sobrenadante foram adicionados para a reação com 420 μ L de tampão de reação (KH_2PO_4 20 mM e NaCl 0,9%, pH 7,4), 10 μ L de terc-butil e 10 μ L de luminol. Cada amostra foi analisada por 3.600 segundos no equipamento Glomax® 20/20 (Madison, Wisconsin, EUA), resultando na mesma quantidade de pontos de quimioluminescência. 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.

3.2.7.6. Expressão de RNAm para IL-1 β , Nrf2, gp91^{phox} e COX-2 por reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa

As amostras de pele foram coletadas em reagente Trizol e homogeneizadas para a extração do RNA total. O RNA total foi transcrito por ação da enzima transcriptase reversa, e o DNAc obtido foi usado para amplificação específica do RNAm de interesse. A expressão quantitativa de RNAm para Nrf2, gp91^{phox} e COX-2 foi analisada por meio de reações de PCR em tempo real, em que foram utilizados o reagente SYBRGreen Master Mix (o qual contém fluoróforo SYBRGreen; enzima DNA polimerase; DNTPs e fluoróforo ROX), a solução de DNAc, água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato e uma solução contendo cada primer. O sistema utilizado realiza as reações de amplificação e detecção, e quantifica as amostras no termociclador ABI5700 (APPLIED BIOSYSTEMS, WARRINGTON, REINO UNIDO) por meio da análise do nível de fluorescência gerado pela incorporação de nucleases fluorogênicas (SYBRGreen) aos produtos de amplificação durante o curso da reação. Os resultados foram analisados com base no valor do limiar do ciclo, em que a amplificação das amostras atinge um limiar que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. O gene Gapdh (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi utilizado como controle endógeno para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo (VERRI *et al.*, 2008).

3.2.8. Análise estatística dos resultados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). 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 6 animais em cada grupo por experimento. Os resultados foram representativos de 2 experimentos separados e foram considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1. THERAPEUTIC EFFICACY OF TOPICAL FORMULATION CONTAINING RESOLVIN D2 (RVD2) IN MICE EXPOSED TO UVB RADIATION

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

Ingrid Caroline Pinto^a, Priscila Saito^a, Camilla C. A. Rodrigues^a, Clovis M. Kumagai^a, David L. Vale^a, Cristina P. B. Melo^a, Ricardo Luís Nascimento de Matos^b, Ana P. F. R. L. Bracarense^b, Marcela M. Baracat^a, Sandra R. Georgetti^a, Renata M. Martinez^a, Waldiceu A. Verri Jr.^c, Rúbia Casagrande^{a*}

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

^bLaboratório de Patologia Animal, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, Londrina, Paraná, 86057-970, Brazil

^cDepartamento 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: rubiacasa@yahoo.com.br (R. Casagrande).

Highlights

- Topical formulation containing RvD2 protects the skin barrier against UVB radiation.
- Topical formulation with RvD2 inhibits inflammation induced by UVB radiation.
- Topical formulation with RvD2 restores the skin's antioxidants after UVB radiation.

Abbreviations

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
COX	cyclooxygenase
DHA	docosahexaenoic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
GPR18	G protein-coupled receptor 18
GSH	reduced glutathione
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
IL	interleukin
LOOH	lipid hydroperoxides
MMP	matrix metalloproteinase
MPO	myeloperoxidase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NF-κB	nuclear factor-κB
NBT	nitroblue tetrazolium
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NOX2	NADPH oxidase 2

Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
QL	chemiluminescence
ROS	reactive oxygen species
RvD2	resolvin D2
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error mean
SPM	specialized pro-resolution mediators
T-butyl	Tert-butyl
TGF- β	transforming growth factor beta
TNF- α	tumor necrosis factor
UV	ultraviolet

Abstract

Resolvin D2 (RvD2) is the result of the conversion of docosahexaenoic acid (DHA), which is a member of the omega-3 fatty acid family. Its therapeutic actions are based on multifactorial mechanisms that participate in the inflammation-resolving process. This work intends to evaluate the efficacy of the topical formulation containing RvD2 in the UVB radiation-induced skin lesion model, considering that the solar spectrum causes alarming damage to skin tissue. Topical administration of RvD2 (1.0 ng/treatment) reduced the inflammatory parameters of skin edema, the neutrophil influx, myeloperoxidase (MPO) and metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, collagen fiber degradation, epidermal thickness, keratinocyte apoptosis, mast cell proliferation, levels of pro-inflammatory cytokine IL-1 β and anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β and mRNA expression for cyclooxygenase 2 (COX-2) and IL-1 β . In addition, RvD2 showed antioxidant properties by restoring the levels of the antioxidants reduced glutathione (GSH) and catalase, the ability to reduce the ABTS radical (2,2' azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and increased expression of nuclear factor [erythroid derivative-2] type 2 (Nrf2), and finally, decreased generation of superoxide anion and lipid hydroperoxides and mRNA expression of the gp91^{phox} subunit. In conclusion, the topical formulation with RvD2 has unprecedented potential for controlling the damage caused by UVB radiation to the skin and could contribute to the development of new drugs.

Keywords: pro-resolution lipid, photoaging, skin damage, inflammation.

1. Introduction

Omega-3 polyunsaturated fatty acids are a nutritional source and benefit human health. Its majority origin is from marine sources from the diet, especially in fish oils, with eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) being the main components found [1,2]. EPA and DHA are precursors of important elements denominated specialized pro-resolution mediators (SPMs). These mediators actively manage the resolution of the inflammatory response, activate tissue repair mechanisms, and restrict the infiltration of immune cells, reversing tissue homeostasis and controlling inflammatory injury [3,4].

DHA is an important component found in biological tissues, including nerve tissue and retina. When there is inflammatory damage, DHA present in plasma levels gets converted into resolvins of the D series through sequential reactions by enzymes known as lipoxygenases, such as the 15-lipoxygenase enzyme. Resolvins have different chemical structures and can neutralize oxidizing compounds by donating electrons. These mediators work therapeutically by binding to G protein-coupled receptors (GPCR) [5–7].

The D-series resolvins carry out the resolution of inflammation through a variety of mechanisms, including the phagocytosis of apoptotic leukocytes and cellular debris (known as efferocytosis), the reduction of pro-inflammatory mediators such as cytokines, and the inhibition of the nuclear factor kappa B (NF- κ B) response pathways. These actions lead to a decrease in the inflammatory response and a faster resolution of the inflammation [8,9].

Resolvin D2 (RvD2) belongs to the resolvin family of the D series. Its therapeutic actions are linked to the GPR18 receptor, which is expressed in leukocytes, including polymorphonuclear neutrophils (PMN) and macrophages [10]. Studies have described the anti-inflammatory and pro-resolution potential of RvD2. For instance, RvD2 reduced the levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in oral carcinoma cell lines (HSC-3) [11], regulated neutrophils and increased efferocytosis to control experimental sepsis [12]. In addition, our research group has demonstrated the therapeutic activity of some SPMs derived from DHA, such as resolvin D1 [13] and maresin 1 [14] against photo-oxidative damage.

Exposure to ultraviolet radiation has been connected to an increase in skin diseases [15]. Therefore, new therapeutic forms are being investigated to prevent and treat damage caused by the sun's harmful rays. Specifically, UVB radiation is known to interact directly with deoxyribonucleic acid (DNA), increase the production of reactive oxygen species (ROS), and activate inflammatory response pathways such as NF- κ B. These factors play a key role in photocarcinogenesis, making UVB radiation a major contributor to the harmful effects of the sun spectrum [16,17].

The purpose of this research is to examine the effect of a topical formulation that includes RvD2 on a skin lesion model induced by UVB radiation in hairless mice. The objective of this study is to make an original contribution to the development of new drugs that can be used for the prevention and/or treatment of different skin disorders.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Resolvin D2 purity $\geq 95\%$ was obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA); tert-butyl hydroperoxide from Acros (Pittsburgh, PA, USA); Brilliant blue R, reduced glutathione (GSH), 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), Trolox, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), o-dianisidine, nitroblue tetrazolium (NBT) and bisacrylamide were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Hydroxymethyl aminomethane (Tris) from Amresco (Solon, OH, USA). The ingredients used in the formulation (Polawax®, caprylic/capric triglyceride, Phenonip®) were sourced from Galena (Campinas, SP, Brazil). Glycerol, propylene glycol from Biotec (Pinhais, PR, Brazil) and Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer (Aristoflex AVC®) from Pharmaspecial (São Paulo, SP, Brazil). Acrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS), platinum SYBRGreen, and superscript III kits were obtained from Invitrogen. Immunoenzymatic assay kits (ELISA) for cytokine dosing from eBioscience (San Diego, CA, USA).

2.2. Experimental groups and model of induction of skin lesion by UVB radiation

The study utilized hairless mice (HRS/J) weighing 20-30g under the approved conditions of the Animal Ethics Committee (CEUA) of the State University of Londrina (registration number 11146.2016.97).

Mice were allocated to the following groups (six animals per group):

- (1) non-irradiated and control: group without exposure to UVB radiation.
- (2) irradiated and control: group exposed to UVB radiation.
- (3) irradiated and treated with emulsion without RvD2.
- (4) irradiated and treated with 1.0 ng/treatment RvD2.

The groups that received treatment were given either a topical application of 0.5 g of the formulation containing either only the vehicle (RvD2-free emulsion) or RvD2 on the dorsal surface at three specified times (1 hour before, 5 minutes before, and 5 minutes after exposure to UVB radiation). The dosage was determined based on dose-response experiments, which have not been published.

UVB radiation was submitted to the irradiated groups simultaneously at a dose of 4.14 J/cm². A fluorescent UVB lamp model PHILIPS TL/12 40W RS (MEDICAL-NETHERLANDS) induced acute inflammatory process and oxidative stress with a maximum emission peak of around 313 nm [18].

2.3. Topical formulation containing RvD2

The emulsion was prepared using Polawax® non-ionic self-emulsifying wax (cetostearyl alcohol and sorbitan monostearate 20 OE) (2%), dispersion of Aristoflex® AVC 5% (acryloyldimethyltaurate/VP copolymer) (20%), Caprylic/capric triglyceride (5%), propylene glycol (6%), Phenonip® preservative solution (0.8%) and purified water to complete 100% of formulation. RvD2 (1.0 ng/0.5 g formulation) was incorporated into the emulsion after 24 hours. As part of the analysis, an emulsion that only consisted of the vehicle was also included.

2.4. Procedures for sample collection

Mice were terminally anesthetized with isoflurane. Skin samples were collected from their dorsal side to be analyzed after 2, 4, and 12 hours after UVB exposure, depending on the specific test. Catalase activity, superoxide anion production (nitroblue tetrazolium reduction), and lipid hydroperoxide levels were measured on samples collected 2 hours after the end of irradiation. In another set of experiments, skin samples were collected 4 hours after exposure to assess cytokine levels and mRNA gene expression. Finally, 12 hours after exposure, edema, MPO and MMP-9 activity, GSH, ABTS, and histopathological evaluation were analyzed. For the skin edema test, the skin sample was weighed and discarded. The samples were soaked in formaldehyde for histopathological evaluation and underwent the histological process. The time intervals were previously standardized [19,20].

2.5. Skin edema

Edema was measured by comparing the weights of the experimental groups, which were expressed in milligrams. The skin size was fixed using a 5 mm mold [21].

2.6. Neutrophil influx and MPO activity

To investigate neutrophil infiltration, an indirect assay was conducted. This assay evaluates the activity of the myeloperoxidase (MPO) enzyme, which was previously described. The change in color of the o-dianisidine is caused by MPO and is detected using a spectrophotometer at 450 nm. The results obtained were expressed as the number of neutrophils per milligram of skin tissue [22].

2.7. Determination of the activity of metalloproteinase-9 (MMP-9) by zymography

The activity of this protease is evaluated by the previously described sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) zymography assay [13,23]. The assay is based on the detection of gelatin degradation by MMP-9, which is visible as

discolored bands in the gel. The enzyme activity was quantified by the comparison of data from groups using ImageJ® program (NIH, Bethesda, MD, USA).

2.8. Histopathological evaluation by optical microscopy

The standard process for examining skin samples involves several steps. First, the samples are fixed in formaldehyde and then dehydrated using alcohol baths. Next, clarified with xylene and embedded in paraffin. Finally, sections of tissue (5 µm) are taken and stained. One of the stains used is hematoxylin-eosin to evaluate the epidermal thickness and the number of apoptotic keratinocytes (sunburn cells) using an optical microscope at 400x and 1000x, respectively [24,25]. Collagen fibers were visualized using Masson's trichrome staining at a magnification of 100x, and histological sections were made and stained with toluidine blue to quantify mast cells at a magnification of 400x [26–28].

2.9. Evaluation of endogenous antioxidant levels (GSH) and antioxidant power by ABTS radical sequestration test (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))

The GSH sulfhydryl group facilitates the breakage of disulfide bond by 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), which results in the formation of a yellow compound (5-mercapto-2-nitrobenzoic acid) that can be measured colorimetrically at 405 nm. The results were compared with a GSH standard curve and expressed as µM GSH/mg of skin [29].

During the ABTS assay, the antioxidant capacity of each sample is determined by measuring the color decay of the ABTS⁺ cation radical as it receives an electron from an antioxidant in absorbance at 730 nm. The results were compared to a Trolox curve ranging from 0.01 to 20 nmol and evidenced as nmol Trolox equivalent per mg of skin [30,31].

2.10. Evaluation of catalase activity, superoxide anion and lipid hydroperoxide (LOOH) production analysis

The measurement of catalase activity was determined by the reduction of UV absorbance resulting from the degradation of hydrogen peroxide (H_2O_2) and the subsequent production of oxygen. The difference between the initial reading and the reading was taken 30 seconds after the addition of H_2O_2 was used to obtain the results in absorbance at 240 nm. The catalase values were reported in units of catalase per milligram of skin per minute [28,32].

To quantify superoxide anion production in the skin, the nitroblue tetrazolium (NBT) assay was used. The reduction of NBT to formazan was determined using a spectrophotometer at 620 nm, and the results were calculated as optical density (OD)/10 mg of skin), as previously described [13,18].

The experiment involved adding tert-butyl (T-butyl) to stimulate a chemiluminescence reaction and recording the resulting luminescence. This technique was adapted from a previous experiment [33]. A luminometer was used to conduct the reading, which measured 3600 points of chemiluminescence per sample. The results were presented in counts per minute (cpm) per milligram of skin.

2.11. Dosage of cytokines

Quantification of cytokines in the skin was conducted by sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in absorbance at 450 nm according to eBioscience recommendations. The results are reported in picograms of IL-1 β , IL-10, or TGF- β /milligram of protein [34].

2.12. mRNA Expression for gp91^{phox}, Nrf2, COX-2 and IL-1 β

Skin samples were collected and stored in trizol reagent for RNA extraction, followed by RNA purification. Next, complementary DNA was obtained by reverse transcribing the RNA. Reverse transcription for cDNA and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was executed using the GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, WI, USA) on a StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Relative gene expression was measured using the $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ comparative method, with glyceraldehyde

3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene as a standard. The results were analyzed based on the cycle's threshold value, where the samples' amplification reaches a threshold that allows quantitative analysis of the expression of the factor [13,34].

2.13. Statistical analysis

The statistical analysis was performed using GraphPad Prism 9 software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). The data was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparisons test. The mean $\pm$ standard error (SEM) of measurements made with 6 animals in each group per experiment were presented as results. The results were representative of 2 separate experiments and were considered significantly different at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

The impact of ultraviolet radiation on human health necessitates an intensive investigation of the mechanisms it triggers and the therapeutic targets to control its negative effects. This work focuses on UVB radiation, which causes damage to the epidermal layer, where the primordial cells called keratinocytes are located. When UVB radiation interacts with the skin, it stimulates the formation of ROS and triggers an inflammatory response. The main inflammatory manifestations are edema, erythema, sunburn, and skin hyperpigmentation. Prostanoids, particularly prostaglandin E2 (PGE2), contribute to edema, which results from intumescence in the cutaneous interstitial space due to altered vascular permeability [35–37].

The inflammatory process is a complex defense mechanism that involves various components generated in response to an injury or infectious agent [38]. Neutrophils are responsible for this function and release the MPO enzyme from their cytoplasmic granules for microbicidal operation. Additionally, these inflammatory cells represent a complementary source of ROS, contributing to the development of reactive intermediate species [39,40]. The deterioration of dermal layer components also occurs under the influence of exposure to UVB radiation. Immune cells, including neutrophils, produce metalloproteinases, which cause damage to extracellular matrix

elements such as collagen fibers. MMP-9 is reported to be involved in the progression of tumorigenesis as well as skin photoaging [41,42]. Increased gene expression of MMP-9 has been shown in keratinocyte cell lines exposed to UVB radiation. Therefore, therapeutic forms that attenuate extracellular matrix degradation via MMP-9 may be a promising way to prevent photoaging [43].

Consistent with the findings in the literature, the present study showed that the experimental groups exposed to UVB radiation and treated with the vehicle-containing formulation significantly increased the parameters of skin edema (Figure 1A), MPO activity (Figure 1B) and MMP-9 (Figure 1C) compared to the non-irradiated control group. These inflammatory parameters were reduced with the administration of the topical formulation containing RvD2 1.0 ng/treatment compared to the radiated and untreated and radiated and treated with the formulation without the lipid, indicating its anti-inflammatory potential.

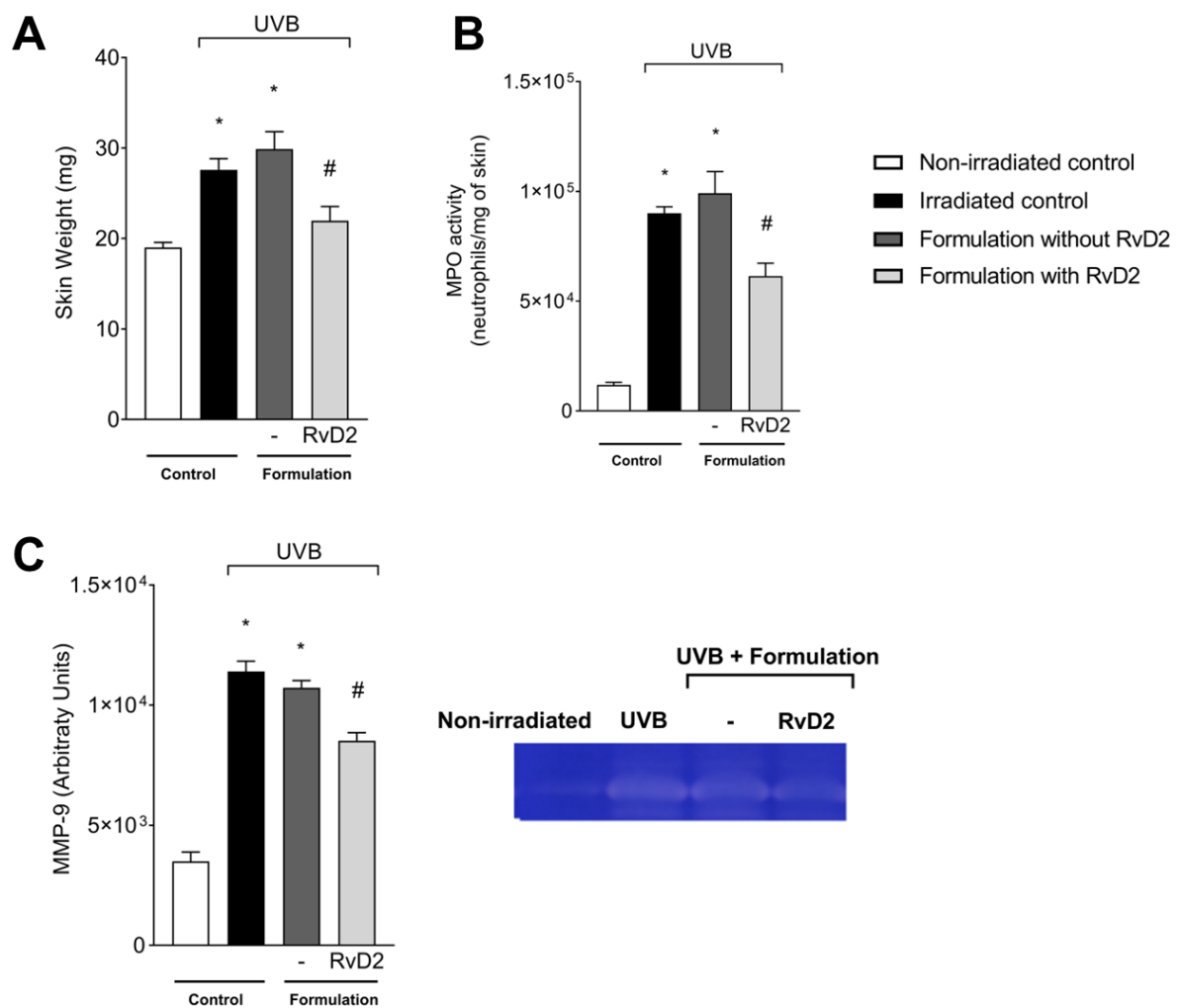


Figure 1. Topical formulation containing RvD2 1.0 ng/treatment reduces skin edema, myeloperoxidase activity and MMP-9 activity triggered by UVB. The skin edema (A), myeloperoxidase activity (B), and MMP-9 activity (C) were determined in samples collected 12 h after the end of irradiation. Panel (C) presents data analysis of the activity of MMP-9 and a representative image. Bars are means $\pm$ SEM of 6 mice per group and represent two separate experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ versus the control group without UVB exposure; # $p < 0.05$ versus UVB-stimulated groups.

The skin tissue sections were analyzed using Masson's trichrome stain to check for changes in the intensity of the collagen fibers. Damage to the collagen fibers was observed in the radiated and untreated group and the radiated group treated with the

formulation without the lipid. In contrast, the topical treatment containing the formulation with RvD2 was able to significantly recover the collagen fiber damage induced by UVB radiation (Figure 2).

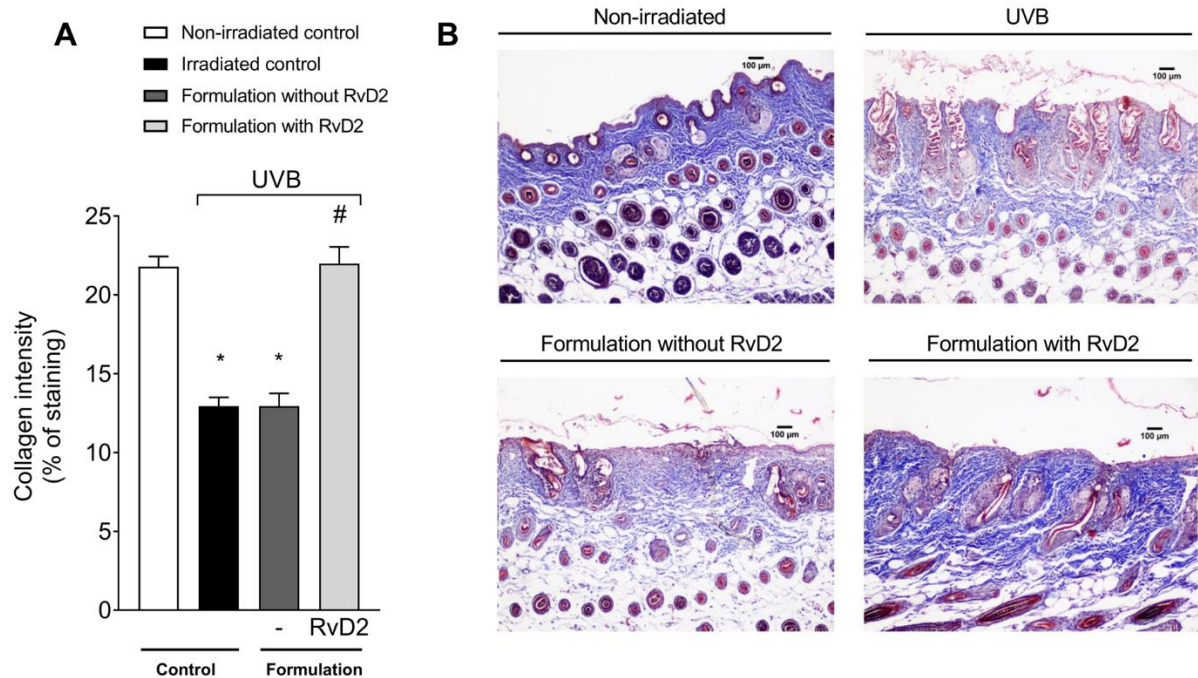


Figure 2. Topical formulation containing RvD2 1.0 ng/treatment inhibits UVB irradiation-induced damage to the skin collagen fiber of hairless mice. Collagen fiber intensity was evaluated using Masson's trichrome in samples collected 12 h after the exposure and analyzed by Image J Program (100x magnification). The intensity of the collagen fibers was measured as a percentage of staining (A) and histological images of the skin with evidence for the collagen fibers shown in blue (B). Bars are means $\pm$ SEM of 6 mice per group and represent two separate experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ versus the control group without UVB exposure; # $p < 0.05$ versus UVB-stimulated groups.

Growth factor-mediated keratinocytes proliferate due to acute sun exposure, promoting epidermal thickening to preserve the skin from sun damage. If the lesion is extensive enough, the p53 protein executes to activate apoptotic pathways, forming sunburn cells and displaying characteristic histological changes. This process helps to

restrict the multiplication of malignant cells and consequently the development of carcinogenesis [44,45]. Interestingly, mutation of the gene encoding p53 has been associated with skin tumors. In this disorder, the cells resist apoptosis, facilitating their clonal propagation [46]. The microscopic observation of the skin carried out in our study reaffirms the cellular modifications induced by UVB radiation, as the groups affected by exposure showed epidermal hyperplasia. On the other hand, a topical treatment containing RvD2 was able to suppress this effect (Figure 3A-B).

Chromophores absorb UVB rays in the skin, which transfer the light energy into a biochemical signal, leading to the formation of ROS. One of the most influential chromophores is DNA because the result of its chemical reactions gives rise to mutagenic photoproducts. The generation of sunburn cells enables the extinction of defective cells. The apoptotic phenomenon is coordinated by proteases known as caspases, which guarantee cell compaction. In histological analysis, these cells are identified with a constriction of the cytoplasm and a condensed nucleus [47]. The data are consistent with this study, in compensation, the presence of apoptotic keratinocytes was attenuated in topical treatment with RvD2 when compared to the other groups exposed to UVB (Figure 3C-D).

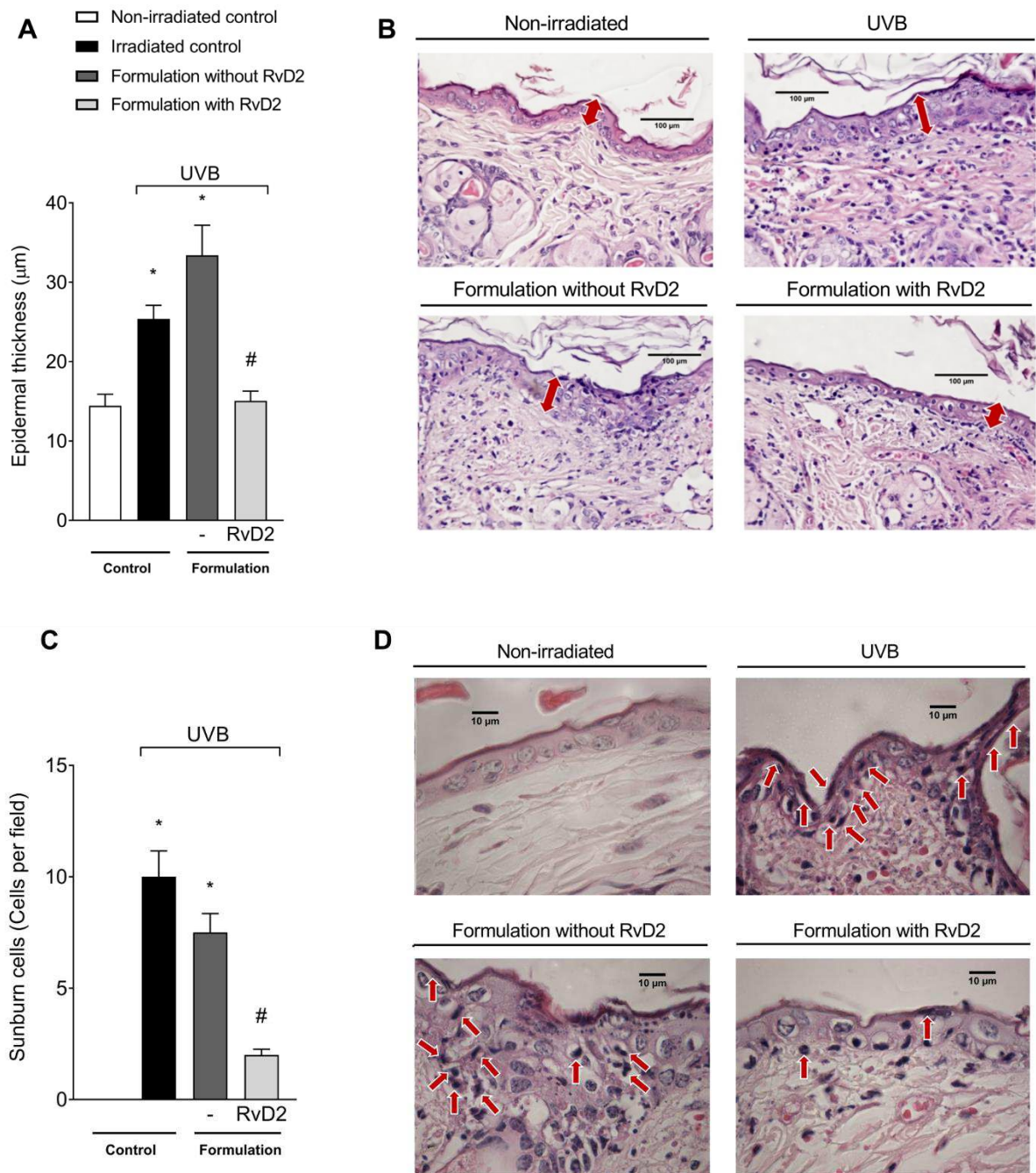


Figure 3. Topical formulation containing RvD2 1.0 ng/treatment reduces UVB irradiation-induced increase of epidermal thickness and sunburn cells. Epidermal thickness and sunburn cell counts were analyzed using hematoxylin and eosin stained in skin samples collected 12 h after the end of irradiation and were examined using light microscopy at 400x (B) magnification and 1000x (D) magnification respectively. Bars are means $\pm$ SEM of 6 mice per group and represent two separate experiments (A, C). One-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ versus the control group without UVB exposure; # $p < 0.05$ versus UVB-stimulated groups.

The excessive radiation dose, combined with the restriction of the immune response, favors the promotion of photocarcinogenesis. Although UVB absorption has primary consequences in the epidermis, dermal cells such as mast cells play a substantial role in UVB-induced immunomodulation. Studies show an elevated number of mast cells is detected in malignant skin disorders. These cells participate in angiogenesis, disruption of the extracellular matrix, and immunosuppression through the secretion of mediators such as cytokines and histamine, regulating the immune response and inflammatory process [48–50]. Corroborating previous reports, we found a significant increase in mast cell count after exposure to UVB radiation and it was minimized with topical administration of RvD2, demonstrating its anti-inflammatory efficacy (Figure 4).

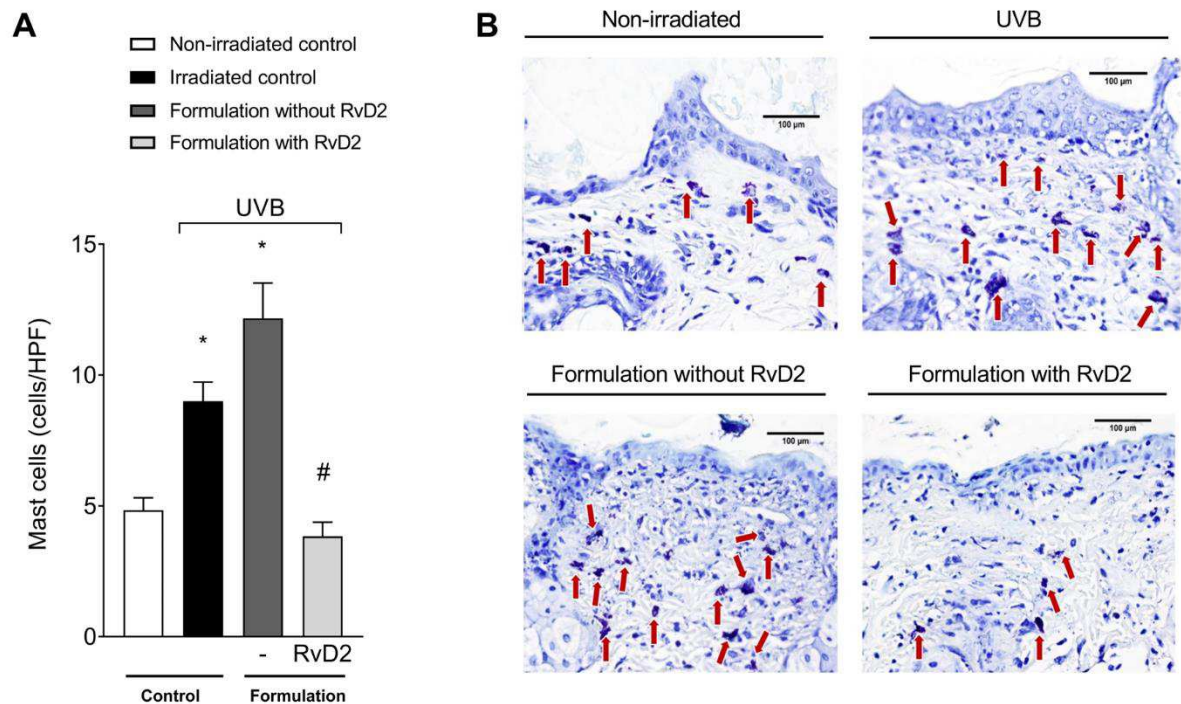


Figure 4. Topical formulation containing RvD2 1.0 ng/treatment inhibits UVB irradiation-induced mast cell proliferation. Mast cell numbers (A) were evaluated using toluidine blue in skin samples collected 12 h after the irradiation and were examined using light microscopy (400x magnification) (B). Bars are means $\pm$ SEM of 6 mice per group and represent two separate experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ versus the control group without UVB exposure; # $p < 0.05$ versus UVB-stimulated groups.

The activation of signaling pathways after UVB radiation initiates the inflammatory response. Nuclear factor kappa B (NF- κ B) is one of the most significant inflammatory routes and its activity is adjusted at the nuclear level by the I κ B protein. NF- κ B has a crucial role to play in the induction of cytokines, chemokines, adhesion molecules, and other mediators of the inflammatory process [51,52]. Keratinocytes form a blocking layer that protects against UVB. They are tasked with the expression of pro-inflammatory cytokines including interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α). These inflammatory mediators assist in the influx of immune cells, especially neutrophils and macrophages, to the inflammatory center, as well as expanding the response to other immune cells in the skin, such as Langerhans cells and mast cells. To contain the magnitude of inflammation, anti-inflammatory cytokines such as transforming growth factor beta (TGF- β) and IL-10 are produced and can control the action of pro-inflammatory cytokines and therefore modulate the inflammatory response [39,53].

Recently, studies have demonstrated that UVB radiation promotes the secretion of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines *in vivo* models, emphasizing its inductive potential. Furthermore, the decline in the synthesis of these pro and anti-inflammatory mediators suggests that the aggravation of inflammatory injury is contained [13,14,54]. The evidence cited in the literature was confirmed in this work, as the inflammatory effect of UVB radiation was noted with a significant increase in the levels of the cytokines IL-1 β , IL-10, and TGF- β . In contrast, topical administration of the pro-resolution lipid RvD2 had an anti-inflammatory action by inhibiting the production assessed by the immunoenzymatic technique and mRNA expression by quantitative polymerase chain reaction (Figure 5).

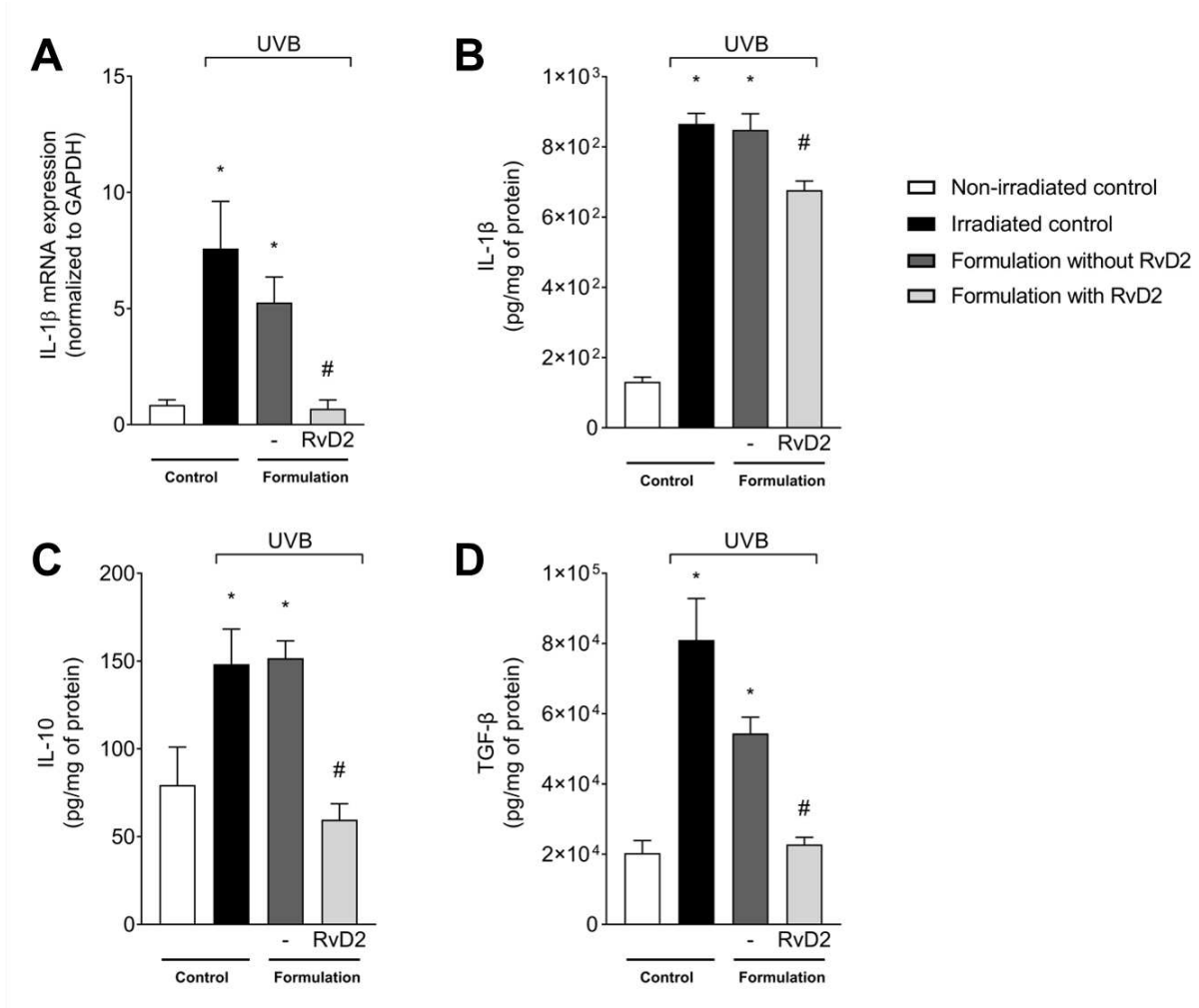


Figure 5. Topical formulation containing RvD2 1.0 ng/treatment declines UVB irradiation-induced cytokines production. IL-1 β (A) mRNA expression was analyzed by a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and IL-1 β (B), IL-10 (C), and TGF- β (D) protein levels by ELISA in samples obtained 4 hours after UVB radiation. Bars are means $\pm$ SEM of 6 mice per group and represent two separate experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ versus the control group without UVB exposure; # $p < 0.05$ versus UVB-stimulated groups.

The mechanisms associated with the development of ROS following UVB exposure have become attractive because they cause significant tissue damage such as premature aging [55]. For this reason, oxidative markers were also evaluated in this research. Free radicals from oxygen are formed for physiological purposes, such as cellular respiration. In addition, a complementary form of ROS is produced by phagocytic cells (monocytes and neutrophils) for microbicidal applications, indicating

the associated link between inflammation and oxidative stress. The uptake and reduction of oxygen by phagocytes occurs through the enzyme nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 2 (NOX2), leading to an overall increase in the intensity of tissue lesions [56]. In the present study, the expression of the NOX2 subunit (gp91^{phox}) was stimulated by UVB and we found that it showed a reduction in its activity in the experimental group combined with the RvD2 formulation (Figure 6A).

The transcription factor Nrf2 (nuclear factor [erythroid-derived-2] type 2) is responsible for orchestrating the activity of cytoprotective and antioxidant elements, safeguarding the skin barrier. In addition, in response to ROS, Nrf2 restricts the action of NF- κ B by preventing its translocation to the nucleus and consequently inhibiting its activation with an inflammatory outcome [57,58]. In summary, Nrf2 has endogenous protection mechanisms by regulating the expression of antioxidant compounds such as heme oxygenase-1 (HO-1) and glutathione peroxidase (GPx), ensuring cell viability [59,60]. In consonance with the literature, after UVB the expression of the transcription factor Nrf2 was negatively affected, and topical treatment containing RvD2 recovered the antioxidant response, suggesting that the lipid mediator is an activator of Nrf2 (Figure 6B).

In the presence of environmental sources such as UVB radiation, arachidonic acid can be released from biological membranes and then converted into components of the inflammatory response such as prostaglandins. This occurs under the action of enzymes named cyclooxygenases (COX). COX-2, in particular, is correlated with inflammatory disorders and its activation results from the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, stimulating other nuclear factors such as NF- κ B and activator protein-1 (AP-1) [61,62]. Our data ratified the negative impact of UVB radiation through the increase in COX-2 expression measured by qPCR and the reduction in its expression due to topical treatment with RvD2 at a dose of 1 ng/treatment (Figure 6C).

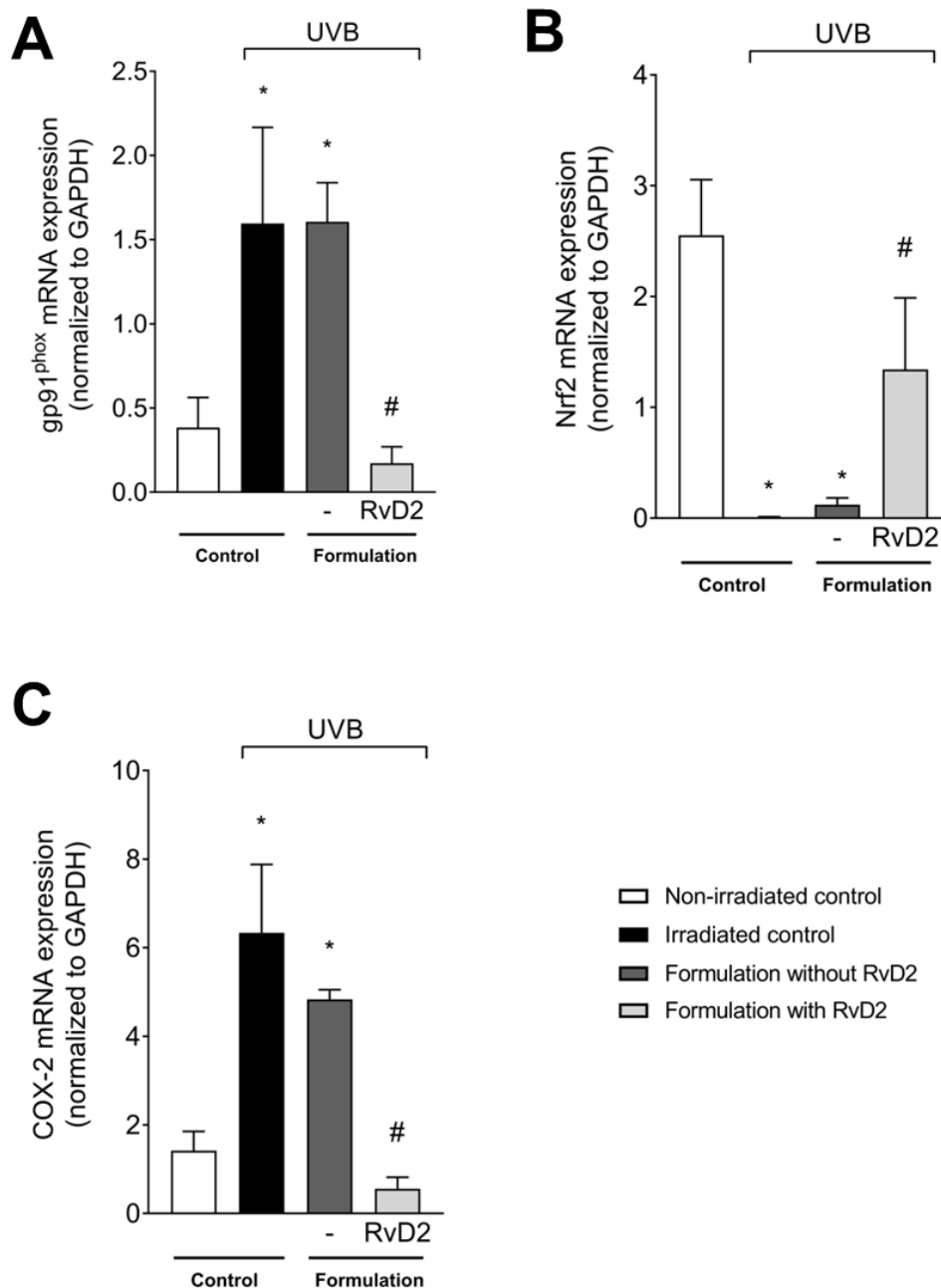


Figure 6. Topical formulation containing RvD2 1.0 ng/treatment reduces mRNA expression of gp91^{phox} and COX-2, as well as increasing the nuclear factor Nrf2. gp91^{phox} (A), Nrf2 (B), and COX-2 (C) mRNA expression were analyzed by a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in samples obtained 4 hours after UVB radiation. Bars are means $\pm$ SEM of 6 mice per group and represent two separate experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ versus the control group without UVB exposure; # $p < 0.05$ versus UVB-stimulated groups.

The maleficent effects of ROS are counterbalanced by the antioxidant defense system, but an imbalance between the two caused by excessive UVB exposure directs to oxidative stress. Thus, exogenous therapeutic forms with antioxidant activity are essential for the prevention of skin diseases [31,55]. Antioxidant markers were checked in this study. One of them is reduced glutathione (GSH), a non-enzymatic antioxidant that blocks the oxidation of elements by donating electrons [63,64]. In conjunction with this, the overall antioxidant potential of the skin was determined by the assay that measures the sample's activity in capturing the ABTS radical [30]. Our discoveries revealed that UVB radiation was able to reduce antioxidant sources obtained through GSH assays and ABTS electron-donating activity. In opposition, the topical formulation containing RvD2 demonstrated its therapeutic action by improving the skin's antioxidant capacity (Figure 7).

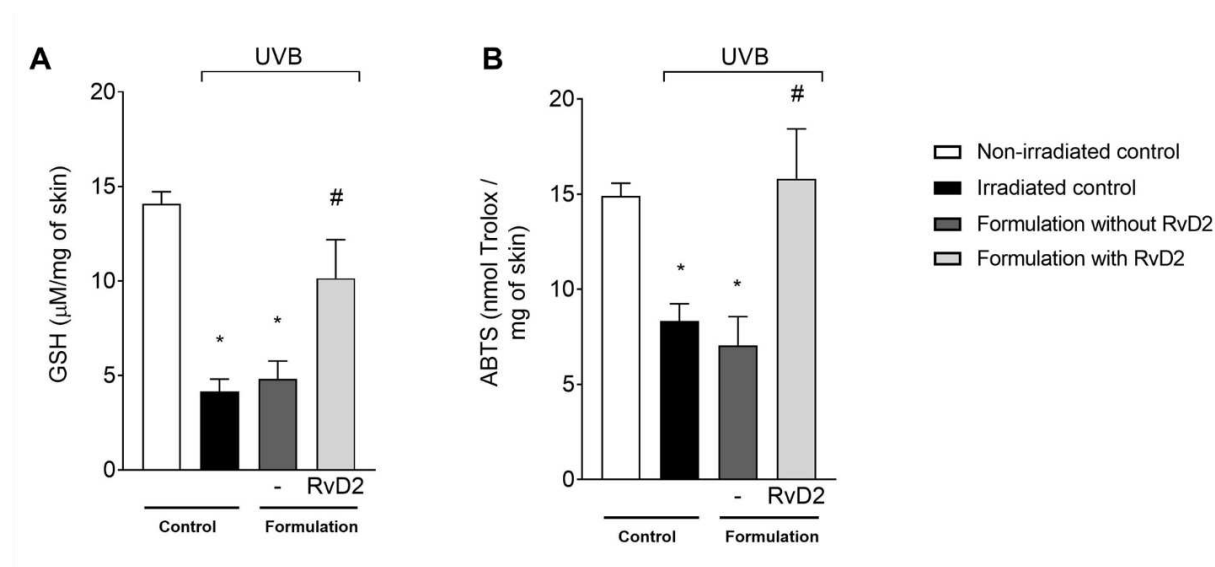


Figure 7. Topical formulation containing RvD2 1.0 ng/treatment restores the antioxidant capacity of skin exposed to UVB radiation. GSH values (A) and ABTS electron-donating activity (B) were assessed in samples obtained 12 hours after UVB radiation. Bars are means $\pm$ SEM of 6 mice per group and represent two separate experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ versus the control group without UVB exposure; # $p < 0.05$ versus UVB-stimulated groups.

One of the metabolic products of oxygen induced by ultraviolet radiation is superoxide anion, a primary radical that is neutralized by the enzyme superoxide dismutase. Another radical worth mentioning is hydroxyl, as it is considered the most dangerous because it reacts quickly with the biomolecules around it and one of its targets includes DNA. In addition, hydrogen peroxide is recognized as a non-radical intermediate species that also comes from oxygen, however, it can be converted into hydroxyl and the enzymatic antioxidant that prevents the formation of the toxic radical is catalase [65,66].

Catalase activity was analyzed in this paper by reducing hydrogen peroxide in a spectrophotometric assay [32]. The results obtained indicate a depletion of antioxidant capacity after UVB radiation. Nevertheless, antioxidant levels were subsequently optimized with topical administration of RvD2 (Figure 8A). Also, the measurement of the superoxide anion was investigated for its ability to reduce the NBT compound. According to our findings, the treatment containing RvD2 inhibited the production of the free radical induced by UVB radiation (Figure 8B).

Finally, oxidative damage was also detected via lipid peroxidation. The relationship between ROS and lipids results in structural degradation of biological membranes, including alteration of their permeability. Sequences of reactions derive from the combination of fatty acids with oxygen, leading to the formation of fatty acid radicals such as peroxy [67,68]. Confirming the evidence in the literature, exposure to UVB radiation promoted an increase in the production of lipid hydroperoxides and was significantly reduced after topical treatment containing RvD2 (Figure 8C).

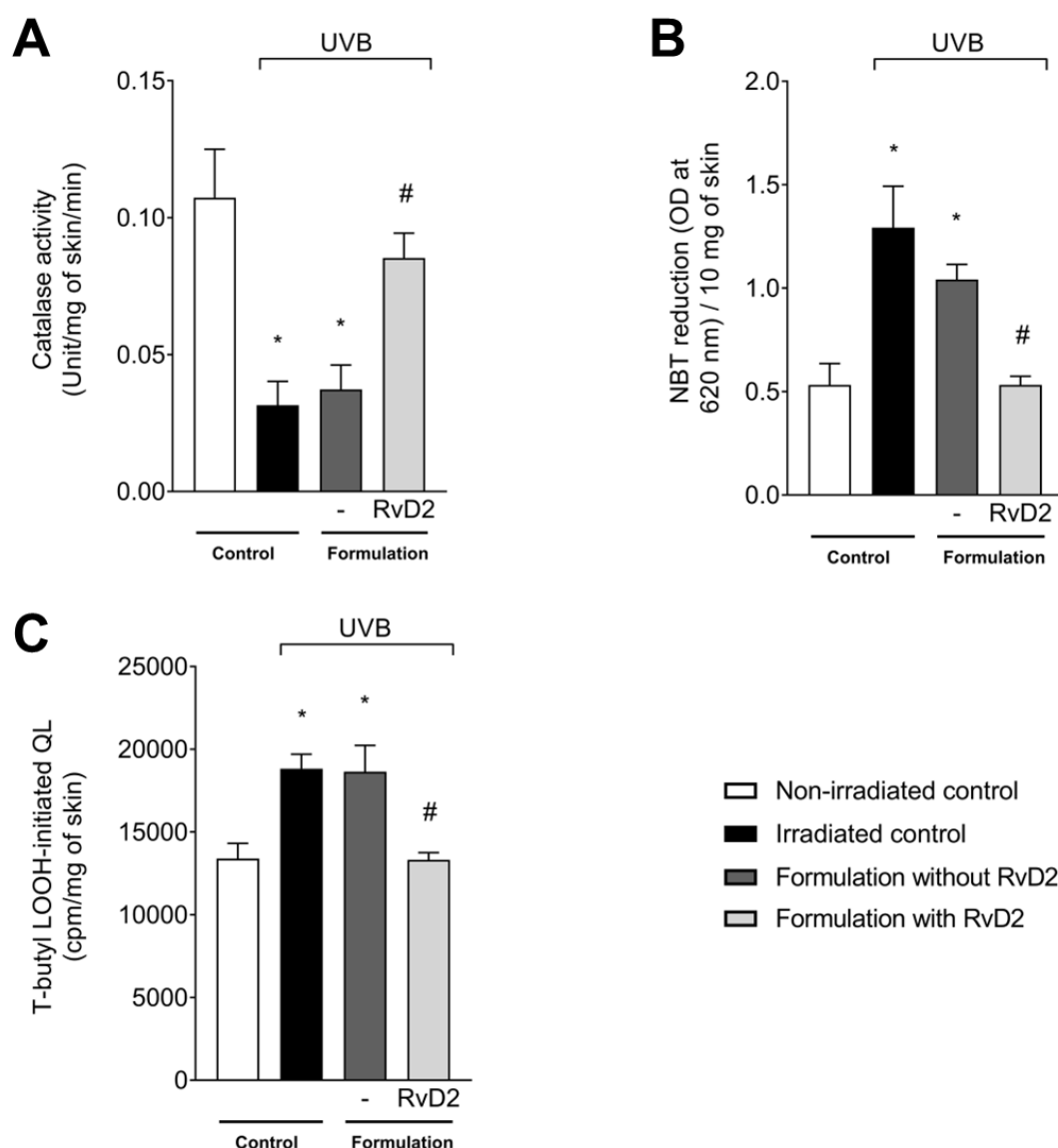


Figure 8. Topical formulation containing RvD2 1.0 ng/treatment improves antioxidant profile by maintaining catalase levels and reducing the production of superoxide anion and lipid hydroperoxides. Catalase levels (A), superoxide anion (B) and lipid hydroperoxides (C) production were evaluated in samples obtained 2 hours after UVB radiation. Bars are means $\pm$ SEM of 6 mice per group and represent two separate experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ versus the control group without UVB exposure; # $p < 0.05$ versus UVB-stimulated groups.

The defensive effect of RvD2 has been reported in other experimental models. Treatment containing the lipid mediator was able to prevent elastase-induced abdominal aortic aneurysm formation in vivo model, as it reduced inflammatory

damage and altered the macrophage polarization towards an anti-inflammatory/resolution phenotype of this phagocyte. In conjunction with this, levels of the collagen degradation marker (MMP-9) were negatively regulated [69]. In an experimental model of diabetic retinopathy, mice were treated with RvD2 and observed a reduction in inflammation by inhibiting the expression of mRNA for NF- κ B, TNF- α and the chemokine monocyte chemoattractant protein (MCP)-1. Additionally, oxidative damage was limited with RvD2, as GSH levels were improved and the lipid peroxidation product malondialdehyde was repressed [70]. Currently, other pro-resolution lipids have shown therapeutic action in a skin model of oxidative stress and inflammation in opposition to UVB radiation [13,14,31,54].

Finally, *in vivo* results of this study revealed a decline in inflammation by inhibiting skin edema, the neutrophil influx, MPO and MMP-9 activity, collagen fiber degradation, epidermal thickness, keratinocyte apoptosis, mast cell proliferation, inflammatory and anti-inflammatory cytokines, and COX-2 expression. Furthermore, RvD2 was able to reduce oxidative stress by decreasing the production of superoxide anion, lipid hydroperoxides, and expression of gp91^{phox}, as well as improving antioxidant capacity by maintaining levels of GSH, catalase, reducing the ABTS radical, and enhanced expression of Nrf2. It's important to note that the group receiving the topical treatment without RvD2 did not show any protection against UVB damage to the skin.

Topical formulations are an effective way of treating skin lesions because they deliver the treatment directly to the affected area, are easy to apply, and safeguard bioavailability [71]. The results of our research are consistent with previous studies and indicate that a topical formulation containing RvD2 can be a promising and innovative option for developing pharmaceutical products that can address skin damage caused by UVB radiation. This formulation contains a concentration of RvD2 measured in nanograms, which has a significant effect and is useful to the pharmaceutical industry.

4. Acknowledgments

This study was supported by Brazilian grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária and Parana State Government. Authors declare no conflict of interest.

5. References

- [1] M. Cholewski, M. Tomczykowa, M. Tomczyk, A comprehensive review of chemistry, sources and bioavailability of omega-3 fatty acids, *Nutrients* 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/nu10111662>.
- [2] F. Shahidi, P. Ambigaipalan, Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits, *Annu Rev Food Sci Technol* 25 (2018) 345–381. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317>.
- [3] E. Brennan, P. Kantharidis, M.E. Cooper, C. Godson, Pro-resolving lipid mediators: regulators of inflammation, metabolism and kidney function, *Nat Rev Nephrol* 17 (2021) 725–739. <https://doi.org/10.1038/s41581-021-00454-y>.
- [4] L.S.D. Del Campo, R. Rodrigues-Díez, M. Salaices, A.M. Briones, A.B. García-Redondo, Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators: New Therapeutic Approaches for Vascular Remodeling, *Int J Mol Sci* 23 (2022). <https://doi.org/10.3390/ijms23073592>.
- [5] H. Seki, T. Sasaki, T. Ueda, M. Arita, Resolvins as regulators of the immune system, *ScientificWorldJournal* 10 (2010) 818–831. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.72>.
- [6] R. Doyle, D.M. Sadlier, C. Godson, Pro-resolving lipid mediators: Agents of anti-ageing?, *Semin Immunol* 40 (2018) 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.09.002>.

- [7] C.N. Serhan, N. Chiang, J. Dalli, New pro-resolving n-3 mediators bridge resolution of infectious inflammation to tissue regeneration, *Mol Aspects Med* 64 (2018) 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.08.002>.
- [8] C.N. Serhan, Novel pro-resolving lipid mediators in inflammation are leads for resolution physiology, *Nature* 510 (2014) 92–101. <https://doi.org/10.1038/nature13479>.
- [9] Y. Cheng, J. Rong, Pro-resolving lipid mediators as therapeutic leads for cardiovascular diseases, *Expert Opin Ther Targets* 23 (2019) 423–436. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1599360>.
- [10] N. Chiang, J. Dalli, R.A. Colas, C.N. Serhan, Identification of resolvin D2 receptor mediating resolution of infections and organ protection, *Journal of Experimental Medicine* 212 (2015) 1203–1217. <https://doi.org/10.1084/jem.20150225>.
- [11] Y. Ye, N.N. Scheff, D. Bernabé, E. Salvo, K. Ono, C. Liu, R. Veeramachaneni, C.T. Viet, D.T. Viet, J.C. Dolan, B.L. Schmidt, Anti-cancer and analgesic effects of resolvin D2 in oral squamous cell carcinoma, *Neuropharmacology* 139 (2018) 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.07.016>.
- [12] M. Spite, L. V. Norling, L. Summers, R. Yang, D. Cooper, N.A. Petasis, R.J. Flower, M. Perretti, C.N. Serhan, Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis, *Nature* 461 (2009) 1287–1291. <https://doi.org/10.1038/nature08541>.
- [13] P. Saito, C.P.B. Melo, R.M. Martinez, V. Fattori, T.L.C. Cezar, I.C. Pinto, A.J.C. Bussmann, J.A. Vignoli, S.R. Georgetti, M.M. Baracat, W.A. Verri, R. Casagrande, The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice, *Front Pharmacol* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01242>.
- [14] T.L.C. Cezar, R.M. Martinez, C. da Rocha, C.P.B. Melo, D.L. Vale, S.M. Borghi, V. Fattori, J.A. Vignoli, D. Camilios-Neto, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Treatment with maresin 1, a docosahexaenoic acid-derived pro-resolution lipid, protects skin from inflammation and oxidative stress caused by UVB irradiation, *Sci Rep* 9 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39584-6>.

- [15] S.A. Umar, S.A. Tasduq, Ozone Layer Depletion and Emerging Public Health Concerns - An Update on Epidemiological Perspective of the Ambivalent Effects of Ultraviolet Radiation Exposure, *Front Oncol* 12 (2022). <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.866733>.
- [16] G. Emri, G. Paragh, Á. Tósaki, E. Janka, S. Kollár, C. Hegedűs, E. Gellén, I. Horkay, G. Koncz, É. Remenyik, Ultraviolet radiation-mediated development of cutaneous melanoma: An update, *J Photochem Photobiol B* 185 (2018) 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.06.005>.
- [17] T.M. Ansary, M.R. Hossain, K. Kamiya, M. Komine, M. Ohtsuki, Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging, *Int J Mol Sci* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22083974>.
- [18] M.Z. Campanini, F.A. Pinho-Ribeiro, A.L.M. Ivan, V.S. Ferreira, F.M.P. Vilela, F.T.M.C. Vicentini, R.M. Martineza, A.C. Zarpelon, M.J.V. Fonseca, T.J. Faria, M.M. Baracat, W.A. Verri, S.R. Georgetti, R. Casagrande, Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice, *J Photochem Photobiol B* 127 (2013) 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.08.007>.
- [19] R.M. Martinez, F.A. Pinho-Ribeiro, D.L. Vale, V.S. Steffen, F.T.M.C. Vicentini, J.A. Vignoli, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Trans-chalcone added in topical formulation inhibits skin inflammation and oxidative stress in a model of ultraviolet B radiation skin damage in hairless mice, *J Photochem Photobiol B* 171 (2017) 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.05.002>.
- [20] R.M. Martinez, F.A. Pinho-Ribeiro, V.S. Steffen, C. V. Caviglione, J.A. Vignoli, D.S. Barbosa, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice, *J Nat Prod* 78 (2015) 1647–1655. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00198>.
- [21] A.L.M. Ivan, M.Z. Campanini, R.M. Martinez, V.S. Ferreira, V.S. Steffen, F.T.M.C. Vicentini, F.M.P. Vilela, F.S. Martins, A.C. Zarpelon, T.M. Cunha, M.J.V. Fonseca, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in

hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro, *J Photochem Photobiol B* 138 (2014) 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.05.010>.

[22] R. Casagrande, S.R. Georgetti, W.A. Verri, D.J. Dorta, A.C. dos Santos, M.J.V. Fonseca, Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice, *J Photochem Photobiol B* 84 (2006) 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.01.006>.

[23] Y.M. Fonseca, F. Marquele-Oliveira, F.T.M.C. Vicentini, N.A.J.C. Furtado, J.P.B. Sousa, Y.M. Lucisano-Valim, M.J.V. Fonseca, Evaluation of the potential of Brazilian propolis against UV-induced oxidative stress, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011 (2011) 1–8. <https://doi.org/10.1155/2011/863917>.

[24] Y. Deng, A. Ediriwickrema, F. Yang, J. Lewis, M. Girardi, W.M. Saltzman, A Sunblock Based On Bioadhesive Nanoparticles, *Nat Mater* 14 (2015) 1278–1285. <https://doi.org/10.1038/nmat4422.A>.

[25] A. Schwarz, R. Bhardwaj, Y. Aragane, K. Mahnke, H. Riemann, D. Metze, T.A. Luger, T. Schwarz, Ultraviolet-B-Induced Apoptosis of Keratinocytes: Evidence for Partial; Involvement of Tumor Necrosis Factor- α in the Formation of Sunburn Cells, *J Invest Dermatol* 104 (1995) 922–927. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12606202>.

[26] S. Mouret, J. Wartelle, M. Batal, S. Emorine, M. Bertoni, T. Poyot, C. Cléry-Barraud, N. El Bakdouri, A. Peinnequin, T. Douki, I. Boudry, Time course of skin features and inflammatory biomarkers after liquid sulfur mustard exposure in SKH-1 hairless mice, *Toxicol Lett* 232 (2015) 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.09.022>.

[27] J.A.E.H. Song, M.E.I.J. Piao, X.I.A. Han, K.A.H. Kang, H.E.E.K. Kang, W.J. Yoon, M.I.H.E.E. Ko, N.A.M.H.O. Lee, M.I.Y. Lee, S. Chae, J.I.N.W.O.N. Hyun, Anti-wrinkle effects of *Sargassum muticum* ethyl acetate fraction on ultraviolet B-irradiated hairless mouse skin and mechanistic evaluation in the human HaCaT keratinocyte cell line, *Mol Med Rep* 14 (2016) 2937–2944. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5655>.

[28] R.M. Martinez, V. Fattori, P. Saito, I. C. Pinto, C. C. A. Rodrigues, C. P. B. Melo, A. J. C. Bussmann, L. Staurengo-Ferrari, J. R. Bezerra, J. A. Vignoli, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, The Lipoxin Receptor/FPR2 Agonist BML-

111 Protects Mouse Skin against Ultraviolet B Radiation, *Molecules* 25 (2020) 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules25122953>.

[29] P. Srinivasan, K.E. Sabitha, C.S. Shyamaladevi, Attenuation of 4-Nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols, *Life Sci* 80 (2007) 1080–1086. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.11.051>.

[30] V. Katalinic, D. Modun, I. Music, M. Boban, Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by reducing antioxidant power (FRAP) assays, *Comp Biochem Physiol* 140 (2005) 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.005>.

[31] R.M. Martinez, V. Fattori, P. Saito, C.B.P. Melo, S.M. Borghi, I.C. Pinto, A.J.C. Bussmann, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A.V. Jr, R. Casagrande, Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice, *J Dermatol Sci* 91 (2018) 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2018.04.014>.

[32] H. Aebi, Catalase in Vitro, *Methods Enzymol* 105 (1984) 121–6.

[33] B. Gonzalez Flecha, S. Llesuy, A. Boveris, Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle, *Free Radic Biol Med* 10 (1991) 93–100. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90002-K](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90002-K).

[34] W.A. Verri, A.T.G. Guerrero, S.Y. Fukada, D.A. Valerio, T.M. Cunha, D. Xu, S.H. Ferreira, F.Y. Liew, F.Q. Cunha, IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (2008) 2723–2728. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712116105>.

[35] Y. Matsumura, H.N. Ananthaswamy, Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin, *Toxicol Appl Pharmacol* 195 (2004) 298–308. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.08.019>.

[36] C. Battie, M. Verschoore, Cutaneous solar ultraviolet exposure and clinical aspects of photodamage, *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 78 (2012) 9–14. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.97350>.

[37] H. Hohjoh, T. Inazumi, S. Tsuchiya, Y. Sugimoto, Prostanoid receptors and acute inflammation in skin, *Biochimie* 107 (2014) 78–81. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.08.010>.

- [38] K. Bäsler, J.M. Brandner, Tight junctions in skin inflammation, *Pflügers Arch* 469 (2017) 3–14. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1903-9>.
- [39] M.K. Montes de Oca, R.L. Pearlman, S.F. McClees, R. Strickland, F. Afaq, Phytochemicals for the Prevention of Photocarcinogenesis, *Photochem Photobiol* 93 (2017) 956–974. <https://doi.org/10.1111/php.12711>.
- [40] Y. Aratani, Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function, *Arch Biochem Biophys* 640 (2018) 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004>.
- [41] H. Huang, Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: Recent advances, *Sensors (Switzerland)* 18 (2018). <https://doi.org/10.3390/s18103249>.
- [42] H. Lee, Y. Hong, M. Kim, Structural and functional changes and possible molecular mechanisms in aged skin, *Int J Mol Sci* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms222212489>.
- [43] B. Cui, Y. Wang, J. Jin, Z. Yang, R. Guo, X. Li, L. Yang, Z. Li, Resveratrol Treats UVB-Induced Photoaging by Anti-MMP Expression, through Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antiapoptotic Properties, and Treats Photoaging by Upregulating VEGF-B Expression, *Oxid Med Cell Longev* 2022 (2022). <https://doi.org/10.1155/2022/6037303>.
- [44] A.R. Svobodová, A. Galandáková, J. Šianská, D. Doležal, R. Lichnovská, J. Ulrichová, J. Vostálová, DNA damage after acute exposure of mice skin to physiological doses of UVB and UVA light, *Arch Dermatol Res* 304 (2012) 407–412. <https://doi.org/10.1007/s00403-012-1212-x>.
- [45] Q. Wang, Y. Ye, W. Liu, S. Jiang, S.I. Tashiro, S. Onodera, F. Gu, Y. Wang, T. Ikejima, Dual effects of silibinin treatment on autophagy-regulated dermal apoptosis retardation and epidermal apoptosis up-regulation in UVB-induced skin inflammation, *J Asian Nat Prod Res* 14 (2012) 688–699. <https://doi.org/10.1080/10286020.2012.685725>.
- [46] D.E. Brash, Roles of the transcription factor p53 in keratinocyte carcinomas, *British Journal of Dermatology* 154 (2006) 8–10.

- [47] A. Van Laethem, S. Claerhout, M. Garmyn, P. Agostinis, The sunburn cell: Regulation of death and survival of the keratinocyte, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37 (2005) 1547–1553. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.02.015>.
- [48] S. Ch'ng, R.A. Wallis, L. Yuan, P.F. Davis, S.T. Tan, Mast cells and cutaneous malignancies, *Modern Pathology* 19 (2006) 149–159. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800474>.
- [49] I.T. Harvima, G. Nilsson, Mast cells as regulators of skin inflammation and immunity., *Acta Derm Venereol* 91 (2011) 644–650. <https://doi.org/10.2340/00015555-1197>.
- [50] A. Kaukinen, J. Pelkonen, I.T. Harvima, Mast cells express CYP27A1 and CYP27B1 in epithelial skin cancers and psoriasis, *European Journal of Dermatology* 25 (2015) 548–555. <https://doi.org/10.1684/ejd.2015.2645>.
- [51] V. Muthusamy, T.J. Piva, The UV response of the skin: A review of the MAPK, NF κ B and TNF α signal transduction pathways, *Arch Dermatol Res* 302 (2010) 5–17. <https://doi.org/10.1007/s00403-009-0994-y>.
- [52] S. Kumari, M. Pasparakis, Epithelial cell death and inflammation in skin, in: *Curr Top Microbiol Immunol*, Springer Verlag, 2017: pp. 77–93. https://doi.org/10.1007/82_2015_466.
- [53] Y.S. Ryu, K.A. Kang, M.J. Piao, M.J. Ahn, J.M. Yi, Y.M. Hyun, S.H. Kim, M.K. Ko, C.O. Park, J.W. Hyun, Particulate matter induces inflammatory cytokine production via activation of NF κ B by TLR5-NOX4-ROS signaling in human skin keratinocyte and mouse skin, *Redox Biol* 21 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101080>.
- [54] C.P.B. Melo, P. Saito, R.M. Martinez, L. Staurengo-ferrari, I.C. Pinto, C.C.A. Rodrigues, S. Badaro-garcia, J.A. Vignoli, M.M. Baracat, A.J.C. Bussmann, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Aspirin-Triggered Resolvin D1 (AT-RvD1) Protects Mouse Skin against UVB-Induced Inflammation and Oxidative Stress, *Molecules* 28 (2023) 1–21.

- [55] K. Neha, M.R. Haider, A. Pathak, M.S. Yar, Medicinal prospects of antioxidants: A review, *Eur J Med Chem* 178 (2019) 687–704. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>.
- [56] J.P. Kehrer, L.O. Klotz, Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: Implications for Health, *Crit Rev Toxicol* 45 (2015) 765–798. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1074159>.
- [57] E. Hwang, H.T.T. Ngo, S.A. Seo, B. Park, M. Zhang, T.H. Yi, Protective effect of dietary *Alchemilla mollis* on UVB-irradiated premature skin aging through regulation of transcription factor NFATc1 and Nrf2/ARE pathways, *Phytomedicine* 39 (2018) 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.12.025>.
- [58] S. Saha, B. Buttari, E. Panieri, E. Profumo, L. Saso, An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation, *Molecules* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25225474>.
- [59] L. Baird, M. Yamamoto, The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway, *Mol Cell Biol* 40 (2020). <https://doi.org/10.1128/mcb.00099-20>.
- [60] R. Wei, Y. Zhao, J. Wang, X. Yang, S. Li, Y. Wang, X. Yang, J. Fei, X. Hao, Y. Zhao, L. Gui, X. Ding, Tagitinin c induces ferroptosis through perk-nrf2-ho-1 signaling pathway in colorectal cancer cells, *Int J Biol Sci* 17 (2021) 2703–2717. <https://doi.org/10.7150/ijbs.59404>.
- [61] Y.S. Keum, H.G. Kim, A.M. Bode, Y.J. Surh, Z. Dong, UVB-induced COX-2 expression requires histone H3 phosphorylation at Ser10 and Ser28, *Oncogene* 32 (2013) 444–452. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.71>.
- [62] I. Dobrzyńska, B. Szachowicz-Petelska, E. Skrzydlewska, Z.A. Figaszewski, Effects of UVB Radiation on the Physicochemical Properties of Fibroblasts and Keratinocytes, *Journal of Membrane Biology* 249 (2016) 319–325. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9870-9>.
- [63] Vladimir.A. Kostyuk, A.I. Potapovich, Mechanisms of the suppression of free radical overproduction by antioxidants, *Frontiers in Bioscience* E1 1 (2009) 179–188.

- [64] S.S. Ali, H. Ahsan, M.K. Zia, T. Siddiqui, F.H. Khan, Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players, *J Food Biochem* 44 (2020). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13145>.
- [65] M. Dizdaroglu, P. Jaruga, Mechanisms of free radical-induced damage to DNA, *Free Radic Res* 46 (2012) 382–419. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.653969>.
- [66] B. Halliwell, Free radicals and antioxidants: Updating a personal view, *Nutr Rev* 70 (2012) 257–265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>.
- [67] H. Yin, L. Xu, N.A. Porter, Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis, *Chem Rev* 111 (2011) 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>.
- [68] F. Khoshkharesh, M. Siahkuhain, G. Fisher, B. Nakhostin-Rooh, Influence of a low-dose cox-2 inhibitor drug on exercise-induced inflammation, muscle damage and lipid peroxidation, *Biol Sport* 30 (2013) 61–65. <https://doi.org/10.5604/20831862.1029824>.
- [69] N.H. Pope, M. Salmon, J.P. Davis, A. Chatterjee, G. Su, M.S. Conte, G. Ailawadi, G.R. Upchurch, D-series resolvins inhibit murine abdominal aortic aneurysm formation and increase M2 macrophage polarization, *FASEB Journal* 30 (2016) 4192–4201. <https://doi.org/10.1096/fj.201600144RR>.
- [70] J.-P. Chen, H.-Y. Xu, L. Liao, Z. Zhang, Resolvin D2 prevents inflammation and oxidative stress in the retina of streptozocin-induced diabetic mice, *Int J Clin Exp Pathol* 13 (2020) 1986–1994. www.ijcep.com/.
- [71] R. M. Martinez, A. L. M. Ivan, D. L. Vale, M. Z. Campanini, V. S. Ferreira, V. S. Steffen, F. T. M. C. Vicentini, F. M. P. Vilela, M. J. V. Fonseca, M. M. Baracat, S. R. Georgetti, W. A. Verri Jr, R. Casagrande, Topical emulsion containing pyrrolidine dithiocarbamate: effectiveness against ultraviolet B irradiation-induced injury of hairless mouse skin, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 70 (2018) 1461–1473. <https://doi.org/10.1111/jphp.12997>.

4.2. TOPICAL FORMULATION WITH 17(R)-RESOLVIN D1 SUPPRESSES OXIDATIVE AND INFLAMMATORY INJURY AGAINST UVB RADIATION IN HAIRLESS MICE

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

Ingrid Caroline Pinto^a, Priscila Saito^a, Camilla C. A. Rodrigues^a, David L. Vale^a, Cristina P. B. Melo^a, Ricardo Luís Nascimento de Matos^b, Ana P. F. R. L. Bracarense^b, Marcela M. Baracat^a, Sandra R. Georgetti^a, Renata M. Martinez^a, Waldiceu A. Verri Jr.^c, Rúbia Casagrande^{a*}

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

^bLaboratório de Patologia Animal, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, Londrina, Paraná, 86057-970, Brazil

^cDepartamento 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: rubiacasa@yahoo.com.br (R. Casagrande).

Highlights

- Topical formulation containing 17(R)-RvD1 improves the skin antioxidant profile.
- Topical formulation containing 17(R)-RvD1 mitigates inflammation triggered by UVB.
- Topical formulation with 17(R)-RvD1 protects skin against UVB rays.

Abbreviations

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
COX-2	cyclooxygenase-2
CXCL1/KC	keratinocyte-derived chemokine
DHA	docosahexaenoic acid
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FRAP	iron-reducing power
GPR32	G protein-coupled receptor 32
GSH	reduced glutathione
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
HO-1	heme oxygenase-1
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IL	interleukin
LOOH	lipid hydroperoxides
MMP	matrix metalloproteinase

MPO	myeloperoxidase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NBT	nitroblue tetrazolium
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NOX2	NADPH oxidase 2
NQO1	NADPH:quinone oxidoreductase-1
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PMN	polymorphonuclear neutrophil
QL	chemiluminescence
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
ROS	reactive oxygen species
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error mean
SOD1	superoxide dismutase1
SPM	specialized pro-resolution mediators
T-butyl	Tert-butyl
TPTZ	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine
UV	ultravioleta
VCAM-1	vascular adhesion molecule-1
17(R)-RvD1-TF	topical formulation containing 17(R)-resolvin D1

Abstract

The skin barrier is constantly damaged by UVB rays. Innovative therapies that address the effects of oxidative stress and inflammation are effective. 17(R)-resolvin D1 (17(R)-RvD1) is a pro-resolution lipid mediator derived from docosahexaenoic acid (DHA) that is induced by aspirin and has surprising therapeutic potential. This study intends to investigate the effect of a topical formulation containing 17(R)-RvD1 (0.9 ng/treatment) against UVB-induced photooxidative damage in hairless mice. Our research has shown that the skin's antioxidant capacity is improved after treatment with the formulation containing 17(R)-RvD1 by ABTS (2,2' azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), iron-reducing power (FRAP), reduced glutathione (GSH), and catalase assays. We have also observed increased expression of nuclear factor [erythroid derivative-2] type 2 (Nrf2), as well as reduced formation of superoxide anion, lipid hydroperoxides (LOOH), and restricted expression of the gp91^{phox} subunit. Furthermore, we have found that topical application of the lipid reduces the inflammatory process observed in the reduction of inflammatory cytokine parameters, edema, myeloperoxidase (MPO) and metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and histopathological alterations examined by microscopy. Overall, the topical application of 17(R)-RvD1 has unprecedented therapeutic efficacy against tissue damage caused by UVB radiation.

Keywords: pro-resolution lipid, photocarcinogenesis, resolvin, antioxidant.

1. Introduction

The skin barrier is extremely important for the organism, offering direct protection against external aggressors. Ultraviolet B (UVB) radiation is part of the solar spectrum and has been associated with a major source of skin cancer, a cutaneous malignancy found all over the world [1]. In the skin, UVB primarily affects the epidermis by impacting its main cells, denominated keratinocytes, resulting in the production of mutagenic elements when UVB interacts with the genetic material of these cells [2,3].

UVB radiation creates an imbalance in the cell's redox state by boosting the formation of reactive oxygen species (ROS) and reducing endogenous antioxidants. This insufficient antioxidant system favors oxidative stress and can cause structural consequences to the cell, potentially leading to its death. Measures to reduce oxidative damage, such as the incorporation of substances with antioxidant properties are useful for containing tissue injury [4,5].

In addition, high concentrations of ROS foment the initiation of the inflammatory process. The regulation of the response involves signaling mechanisms such as nuclear factor kappa B (NF- κ B), an established factor in this ambit that causes the generation of various important elements of inflammation. The migration of immune cells including neutrophils, the secretion of mediators entitled cytokines and chemokines are substantial events that restrict injury to the affected parenchyma. Unending and unregulated responses can exacerbate damage and prevent tissue integrity from being restored [6,7].

A class referred to as specialized pro-resolving mediators (SPMs) has aroused a great deal of interest due to their therapeutic capabilities. These SPMs manage the resolution process of inflammation by stimulating tissue restoration processes and blocking components of the inflammatory response [8,9]. One of the groups of SPMs consists of the resolvins of the D series, which originate from docosahexaenoic acid (DHA) [10]. Another route to producing SPMs is by functionally changing the cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme to lipoxygenase in the presence of aspirin, enabling the formation of SPM epimers such as the resolvin D1 epimer (17(R)-resolvin D1) [11].

In experimental research, the endogenous beneficial effect of 17(R)-RvD1 has been investigated. Mice were exposed to cigarette smoke associated with bacterial infection (*Haemophilus influenzae*) and treated with 17(R)-RvD1. The evaluation of parameters such as the restriction of the synthesis of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α revealed a significant reduction in lung inflammation [12]. The treatment containing 17(R)-RvD1 showed anti-inflammatory action in animals with hydrochloric acid-induced acute lung injury. The lipid mediator was able to decrease inflammatory cytokines, polymorphonuclear neutrophil (PMN) recruitment, and NF- κ B p65 nuclear translocation [13]. A recent study reports that intravenous application of RvD1 analog protected the skin of mice against inflammation and oxidative stress caused by UVB radiation [14].

The therapeutic properties of 17(R)-RvD1 have been well documented in experimental disease models. However, there are no reports of this lipid being used as a topical preparation against UVB photo-oxidative damage. This work aims to contribute innovatively towards the search for new compounds that can advance the treatment of skin diseases.

2. Materials and methods

2.1. Chemical compounds

The constituents used in the formulation (Polawax®, caprylic/capric triglyceride, Phenonip®) were sourced from Galena (Campinas, SP, Brazil) and Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer (Aristoflex AVC®) from Pharmaspecial (São Paulo, SP, Brazil). Glycerol, propylene glycol from Biotec (Pinhais, PR, Brazil). 17(R)-resolvin D1 with purity $\geq 95\%$ (Cayman Chemical, MI, USA). Hydroxymethyl aminomethane (Tris) from Amresco (Solon, OH, USA). Tert-butyl hydroperoxide from Acros (Pittsburgh, PA, USA). Acrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS), platinum SYBRGreen, and superscript III kits were obtained from Invitrogen. Immunoenzymatic assay kits (ELISA) for cytokine dosing from eBioscience (San Diego, CA, USA). Brilliant blue R, reduced glutathione (GSH), 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ), Trolox, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), o-dianisidine, nitroblue tetrazolium (NBT) and bisacrylamide were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

2.2. Preparation of a topical formulation containing 17(R)-RvD1 and a procedure for evaluating its efficacy in mice exposed to UVB radiation

This research was developed using hairless mice (HRS/J) weighing between 20-30g. The animals were maintained under conditions that complied with the Animal Ethics Committee (CEUA) of the Londrina State University standards (Registration number 11146.2016.97). The mice were divided into four groups of 6 animals each for the tests. These groups were the negative control (without irradiation), positive control (with irradiation), base formulation (irradiated and treated with a formulation without lipid), and 17(R)-RvD1-TF (irradiated and treated with a formulation of 0.9 ng/treatment 17(R)-RvD1).

The dose of 17(R)-RvD1 (0.9 ng/0.5g of formulation) incorporated into the formulation was established according to dose-response experiments in this work and

a recent study by our research group using another route of administration [14]. The animals were treated with 0.5 g of the formulation topically on their dorsal side. Treatment occurred 6h before, just before, and 30 min after irradiation, with or without 17(R)-RvD1 [15].

The emulsion was created using Polawax® non-ionic self-emulsifying wax (cetostearyl alcohol and sorbitan monostearate 20 OE) (2%). The formulation also contains a dispersion of Aristoflex® AVC 5% (acryloyldimethyltaurate/VP copolymer) (20%), caprylic/capric triglyceride (5%), propylene glycol (6%), Phenonip® preservative solution (0.8%) and purified water to complete 100% of the formulation. 17(R)-RvD1 (0.9 ng/0.5g of formulation) was integrated into the mixture after 24 hours. An emulsion containing only the base formulation (without 17(R)-RvD1) was also analyzed.

2.3. Experimental model of exposure to UVB radiation

The light source used in the skin damage experiments was a fluorescent UVB lamp model PHILIPS TL/12 40W RS (MEDICAL-HOLLAND) with a maximum emission peak of around 313 nm. The dose of radiation sufficient to cause alterations in the parameters analyzed between the groups was 4.14 J/cm² [16].

After exposing and treating the animals, their dorsal skins were removed at different intervals for testing purposes [17]:

- Samples were extracted 12 hours after irradiation to evaluate endogenous levels of reduced glutathione (GSH), ABTS radical scavenging capacity, iron-reducing power (FRAP), skin edema, myeloperoxidase (MPO) and metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, as well as for histological examination (collagen damage, mast cell and apoptotic keratinocyte count, and epidermal thickness).
- Dorsal skin samples were taken 4 hours after irradiation for cytokine measurement and gene expression assays.
- The skins were used 2 hours after irradiation to investigate the production of lipid hydroperoxides (LOOH), superoxide anion using the nitroblue tetrazolium assay, and the activity of the enzyme catalase.

2.4. Global antioxidant potential by FRAP and ABTS tests

The skin samples from different groups were mixed in potassium chloride and then centrifuged for 10 min at 4°C to obtain the final supernatant for the two tests. The antioxidant present in the sample donates electrons which help in the ferric reduction of TPTZ (FRAP) and ABTS radical. The colorimetric reactions were monitored in the spectrophotometer and correlated to a Trolox standard curve. The values were estimated in nmol Trolox equivalent/mg of skin [18,19].

2.5. Determination of the reduced glutathione (GSH) and catalase

The supernatant of interest was obtained by homogenizing the skin with EDTA and trichloroacetic acid. The endogenous antioxidant levels were quantified in a microplate with the addition of the reagent DTNB. The colorimetric reaction was observed at 405 nm and represented in μM of GSH/mg of skin [20,21].

The homogenate extracted from the skin samples for the catalase test was centrifuged. An aliquot of the final supernatant was then added to a microplate for analysis. Hydrogen peroxide was included in the medium to trigger the start of the reaction. Analyses were measured on the spectrophotometer initially and after 30 seconds at 240 nm (unit of catalase/mg of skin/minute) [22].

2.6. Nrf2 and gp91^{phox} expression

RT-qPCR comprises the reverse transcription of RNA into cDNA, after which the genetic sequence of interest is amplified and quantified as previously described [23]. The assay uses the GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, WI, USA) on a StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Data are calculated using the comparative 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} method and employing glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as the reference marker.

2.7. Superoxide anion generation assay based on nitroblue tetrazolium (NBT) reduction

The sample supernatant was first placed in a microplate and left for some time. The NBT compound was then added to the medium to be reduced. The superoxide radical was indirectly quantified by detecting the colorimetric reaction in a spectrophotometer at 620 nm. The findings were presented in optical density (OD)/10 mg of skin [16].

2.8. Quantification of lipid hydroperoxides (LOOH)

The method used to detect lipid hydroperoxides involves the initiation of oxidation of lipid molecules present in skin tissue using tert-butyl hydroperoxide. This process results in the emission of photons, which can be captured by a luminometer. The chemiluminescence signal is recorded for 3.600 seconds for each sample [19,24].

2.9. Levels of the cytokine IL-1 β

The sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to prepare the test in a microplate. The supernatant obtained from the homogenization of the skin with saline was utilized for quantification. The values found at 490 nm were correlated with curves of defined concentration and measured in picograms of IL-1 β per milligram of protein [23].

2.10. Analysis of skin edema

The effectiveness of the lipid treatment after UVB radiation was tested by analyzing the difference in skin weights of animals (in milligrams), with skin collected from a constant area [25].

2.11. Performance of the enzymes myeloperoxidase (MPO) and metalloproteinase-9 (MMP-9)

The influx of neutrophils was measured indirectly by the action of the MPO enzyme (numbers of neutrophils/mg of skin). The formation of a colored compound is revealed in a spectrophotometer at 450 nm and is the product of the oxidation of the substrate o-dianisidine by MPO [17,26].

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel zymography (SDS-PAGE) was employed to identify the MMP-9 enzyme that breaks down the gelatin present in the medium. The Mini Vertical electrophoresis system (Bio-RAD®) was used to run the samples and subjected to electric current. The gel was stained with brilliant blue and destained with acetic acid to visualize the enzyme activity stripes, which were then examined using the Image J® software (NIH, Bethesda, MD, USA) [27,28].

2.12. Evaluation of histological modifications to the skin using optical microscopy

Skin tissue samples of 5 µm thickness were prepared using standard histological processing techniques, including paraffin immersion. Masson trichrome staining was performed to analyze possible modifications in collagen fibers (100x magnification), which are recognized in blue in the dermal region, and analyzed using Image J® software (NIH) [29]. The mast cell count was also observed using optical microscopy on sections of tissue stained with toluidine blue, at a magnification of 400x [30]. Finally, the epidermal thickness and the number of apoptotic keratinocytes were characterized using hematoxylin-eosin staining, and examined at magnifications of 400x and 1000x, respectively [31,32].

2.13. Statistical analysis

In vivo statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 9 software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). One-way analysis of variance (ANOVA) was performed on the data, followed by Tukey's multiple comparisons test ($p < 0.05$). The results were presented as mean $\pm$ standard error (SEM) of measurements obtained from 6 animals in each group per experiment and were representative of two separate experiments.

3. Results

3.1. 17(R)-RvD1-TF avoids the depletion of the antioxidant capacity triggered by UVB radiation

In this study, the skin's antioxidant capacity was evaluated using ABTS and FRAP global parameters, as well as endogenous levels of GSH and catalase activity. The positive control group exposed to UVB radiation along with the group exposed and treated with the formulation without the lipid (base formulation) showed a decrease in the antioxidant system compared to the negative control group (non-irradiated and untreated). However, the group treated with 17(R)-RvD1-TF was able to improve the antioxidant parameters mentioned above and the group containing the formulation without the lipid had no significant effect, as shown in Figure 1.

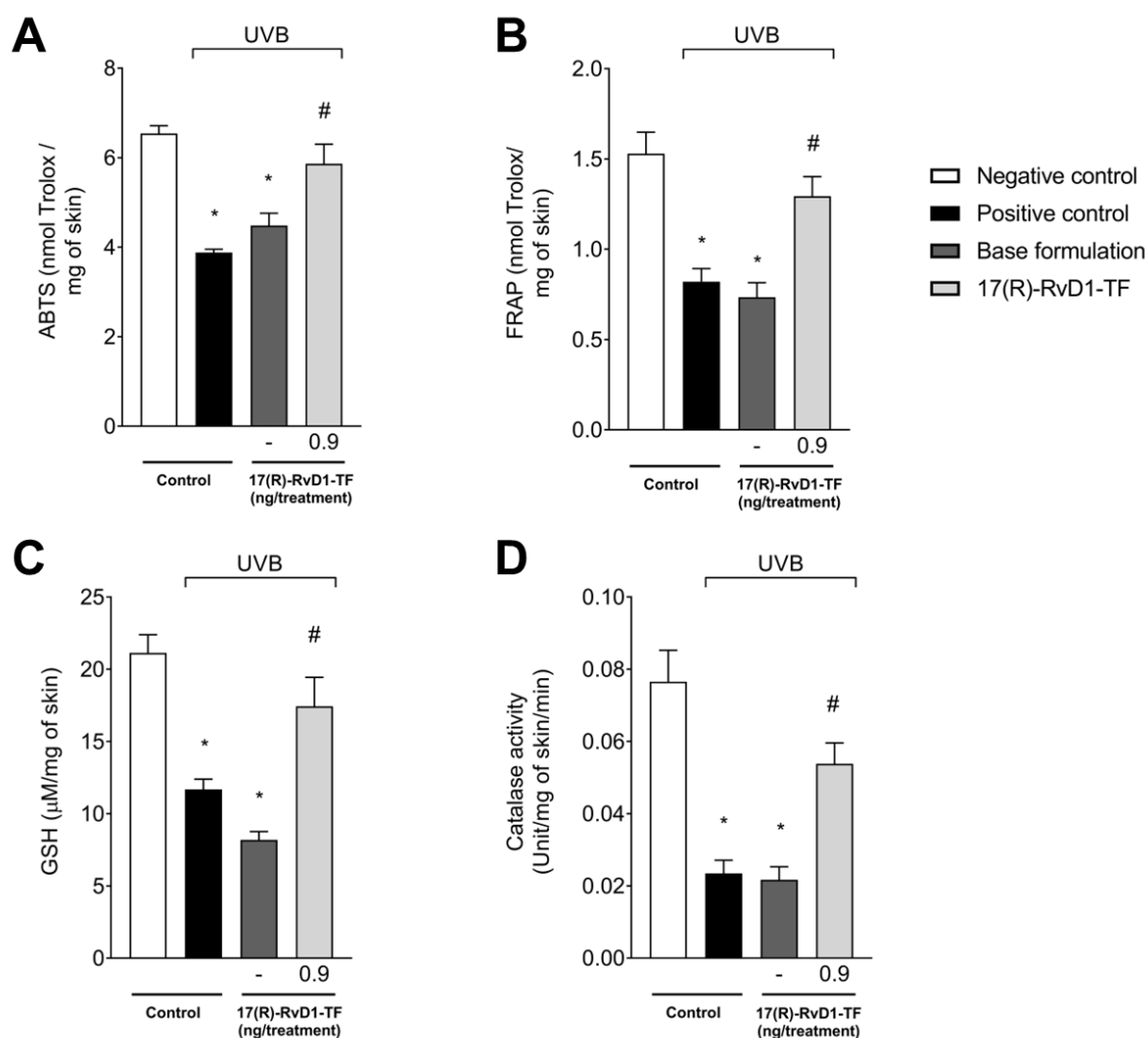


Figure 1. 17(R)-RvD1-TF (0.9 ng/treatment) improves the antioxidant system of skin exposed to UVB radiation. The samples were collected 12 hours after the end of irradiation and the antioxidant capacity was measured using ABTS (A), FRAP (B) and GSH (C). Catalase activity (D) was analyzed in skin samples obtained 2 hours after the end of irradiation. Bars are means $\pm$ SEM of 6 mice per group and represent two separate experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ versus the negative control group; # $p < 0.05$ versus UVB- induced groups.

3.2. 17(R)-RvD1-TF attenuates oxidative damage even after UVB radiation and enhances mRNA expression of gene involved in antioxidant response

The work measured the oxidative damage induced by UVB radiation on the skin. Two tests were used to measure the injury: the superoxide anion radical production (NBT reduction) and the lipid hydroperoxide (LOOH) assay. The groups that were exposed to UVB radiation showed significantly higher results in both tests. However, the group that was exposed to UVB radiation and treated with 17(R) RvD1 reported a reduction in the oxidative damage caused by the UVB radiation on the skin (as shown in Figure 2A-B).

As part of our research on the antioxidant effects of the lipid mediator, we studied the gene expression of Nrf2 - the factor responsible for regulating the response against oxidative injury - and the gp91^{phox} subunit associated with ROS. Our findings indicate that 17(R)-RvD1-TF can improve the skin's oxidative profile. Specifically, it increases the expression of mRNA for Nrf2 and reduces the action of gp91^{phox} after exposure to UVB radiation (Figure 2C-D). The base formulation (without 17(R)-RvD1) had no favorable effect.

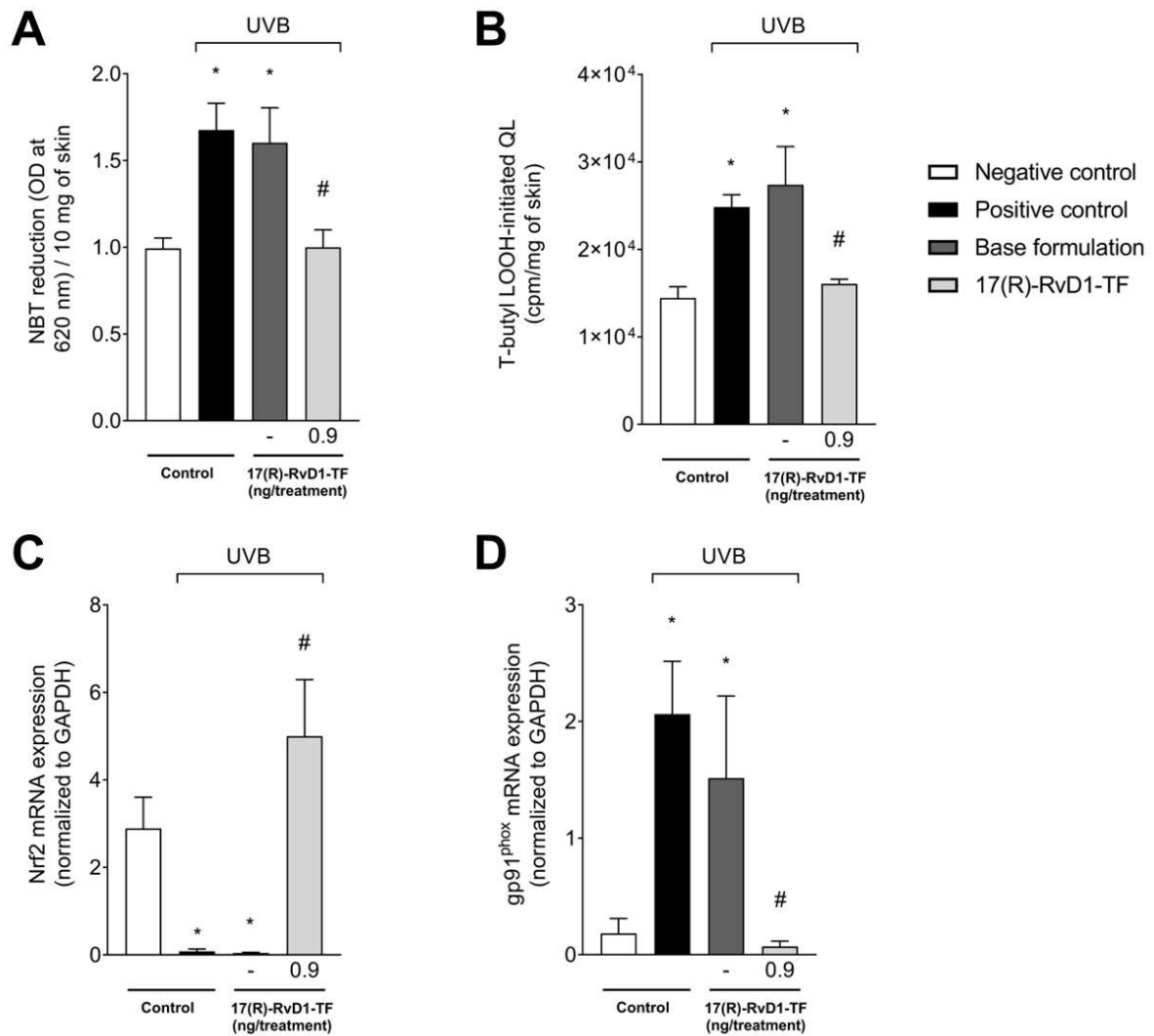


Figure 2. 17(R)-RvD1-TF (0.9 ng/treatment) increases mRNA expression of Nrf2 and minimizes oxidative damage by downregulating gp91^{phox}, superoxide anion and lipid hydroperoxide production after UVB. Superoxide anion (A) and lipid hydroperoxides production (B) were analyzed at 2 h after UVB. Nrf2 (C) and gp91^{phox} (D) mRNA expression were evaluated by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in samples collected 4 h after UVB radiation. Bars are means $\pm$ SEM of 6 mice per group and represent two separate experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ versus the negative control group; # $p < 0.05$ versus UVB- induced groups.

3.3. 17(R)-RvD1-TF suppresses skin inflammation induced by UVB irradiation, reducing the production of the cytokine IL-1 β

One of the main pro-inflammatory cytokines was investigated to evaluate the inflammatory response and the activity of 17(R)-RvD1-TF versus UVB. The results showed that UVB radiation increased the production of the pro-inflammatory cytokine. In contrast, 17(R)-RvD1-TF had an anti-inflammatory effect by reducing the production of the same cytokine (Figure 3).

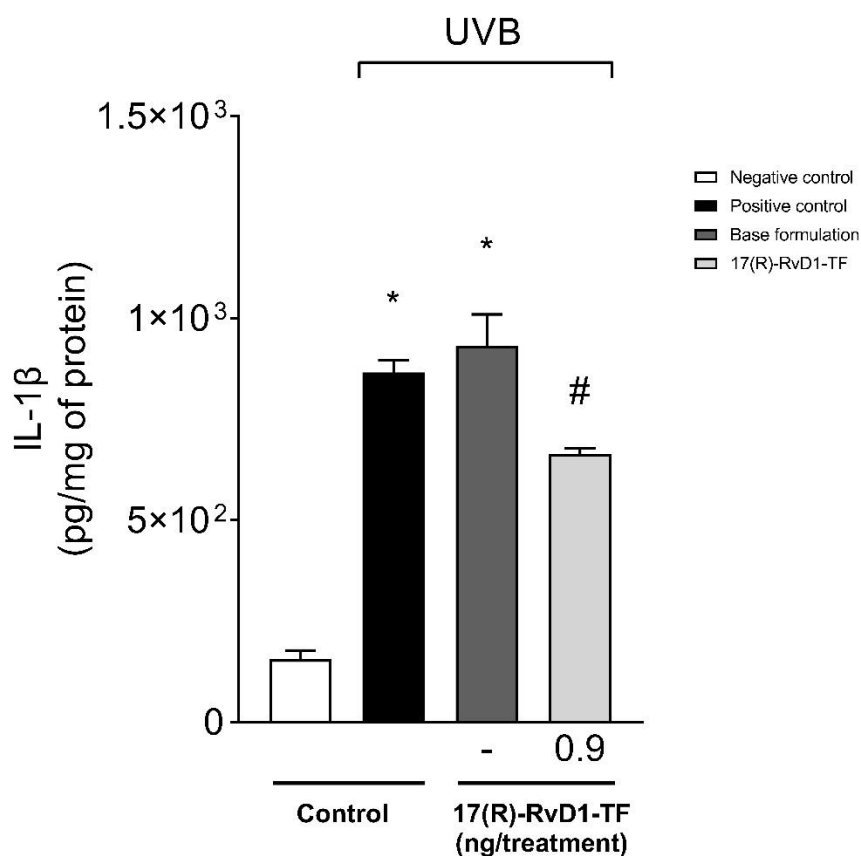


Figure 3. 17(R)-RvD1-TF (0.9 ng/treatment) reduces inflammatory cytokine production after UVB. IL-1 β protein levels by ELISA in samples obtained 4 hours after UVB radiation. Bars are means $\pm$ SEM of 6 mice per group and represent two separate experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test. * p <0.05 versus the negative control group; # p <0.05 versus UVB- induced groups.

3.4. 17(R)-RvD1-TF decreases skin edema and the action of the enzymes myeloperoxidase (MPO) and metalloproteinase-9 (MMP-9).

After UVB exposure, significant increases in the radiated and untreated group (positive control) and the radiated and treated with topical formulation without 17(R)-RvD1 group (vehicle) were observed in the results obtained by the indirect neutrophil influx assay (MPO), skin edema, and electrophoresis gel zymography for MMP-9 activity when compared to the negative control group. Additionally, the topical application of 17(R)-RvD1-TF revealed significant inhibition of inflammatory parameters and the base formulation did not show a positive result (Figure 4).

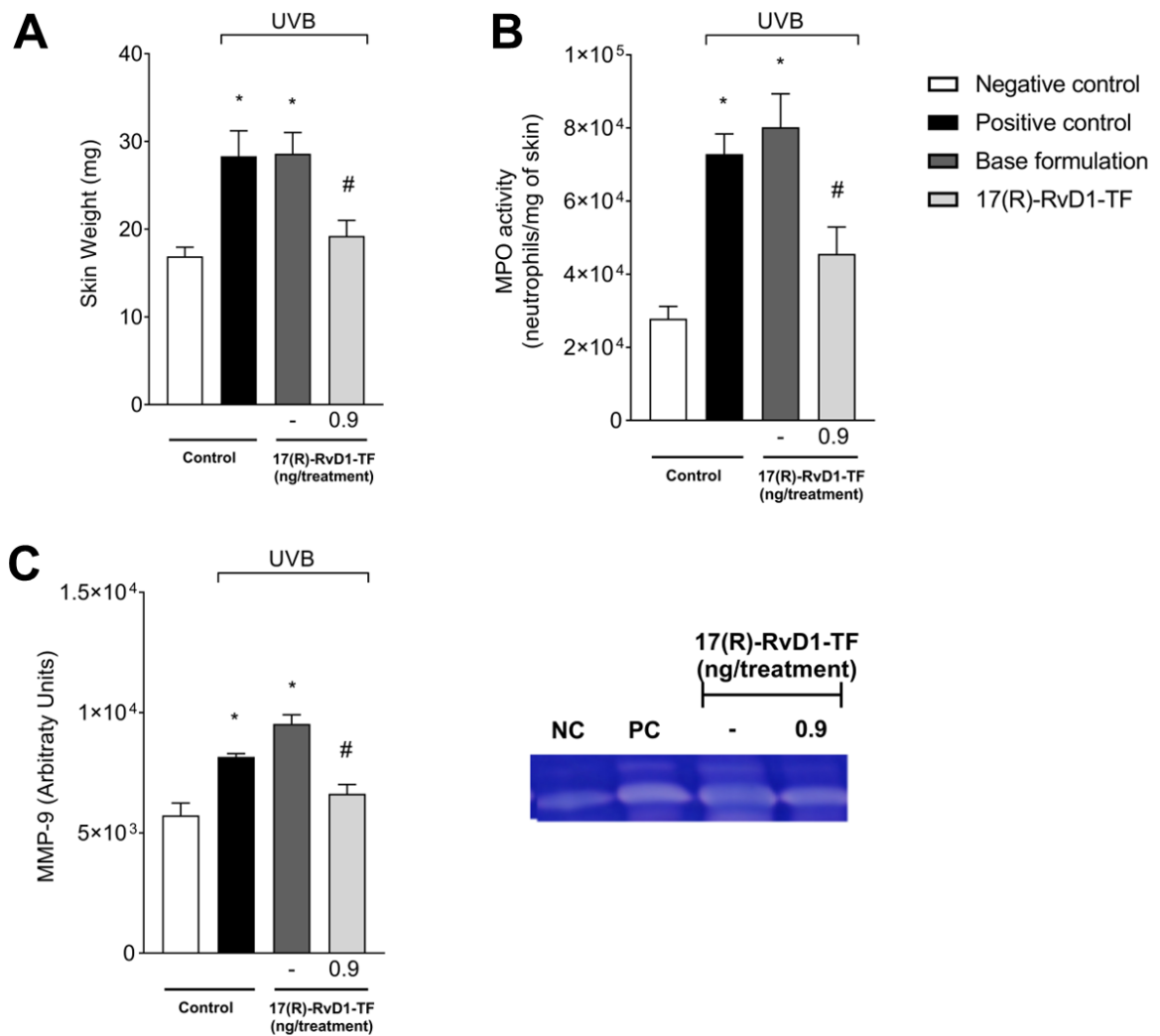


Figure 4. 17(R)-RvD1-TF (0.9 ng/treatment) inhibits the inflammatory parameters of skin edema, MPO and MMP-9 activity triggered by UVB. The skin edema (A), myeloperoxidase (B) and MMP-9 activity (C) were determined in samples collected 12 h after the end of irradiation. Panel (C) presents data analysis of the activity of MMP-9 and a representative image. NC: negative control; PC: positive control. Bars are means $\pm$ SEM of 6 mice per group and represent two separate experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test. *p<0.05 versus the negative control group; #p<0.05 versus UVB- induced groups.

3.5. 17(R)-RvD1-TF recovers collagen fiber decomposition after UVB radiation

UVB radiation has an impact on the collagen fibers situated in the dermis. The behavior of the positive control and vehicle groups was similar. However, the treatment that included 17(R)-RvD1 had a positive effect and could repair the collagen damage, in contrast to the other irradiated groups as shown in Figure 5.

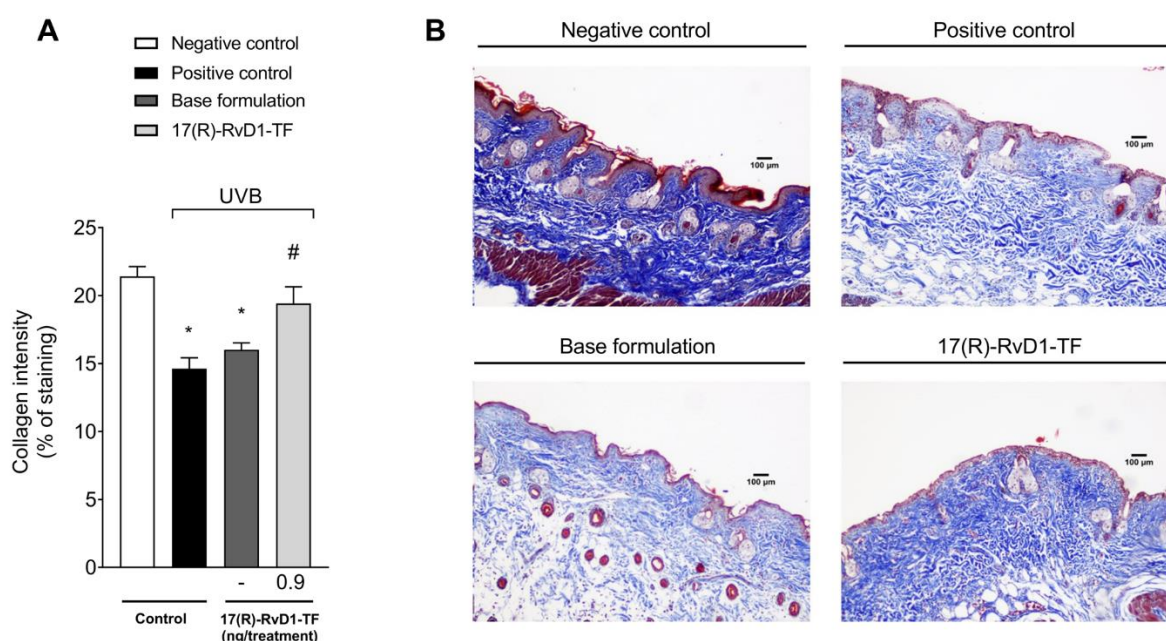


Figure 5. 17(R)-RvD1-TF (0.9 ng/treatment) reduces the deterioration of collagen fibers after UVB. Skin samples were collected and evaluated for collagen fiber intensity 12 hours after exposure to UVB. The skin sections were stained with Masson's trichrome and observed in blue. The images were analyzed using Image J software at 100x magnification. Bars are means $\pm$ SEM of 6 mice per group and represent two separate experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ versus the negative control group; # $p < 0.05$ versus UVB- induced groups.

3.6. 17(R)-RvD1-TF declines mast cell proliferation in mice exposed to UVB radiation

Mast cells suppress the immune system and are found in the skin's dermis layer. In the groups exposed to UVB and treated without the lipid, the proliferation of these cells was observed. On the other hand, the results showed that using treatment containing 17(R)-RvD1-TF significantly reduced the number of mast cells compared to the other groups exposed to UVB (Figure 6).

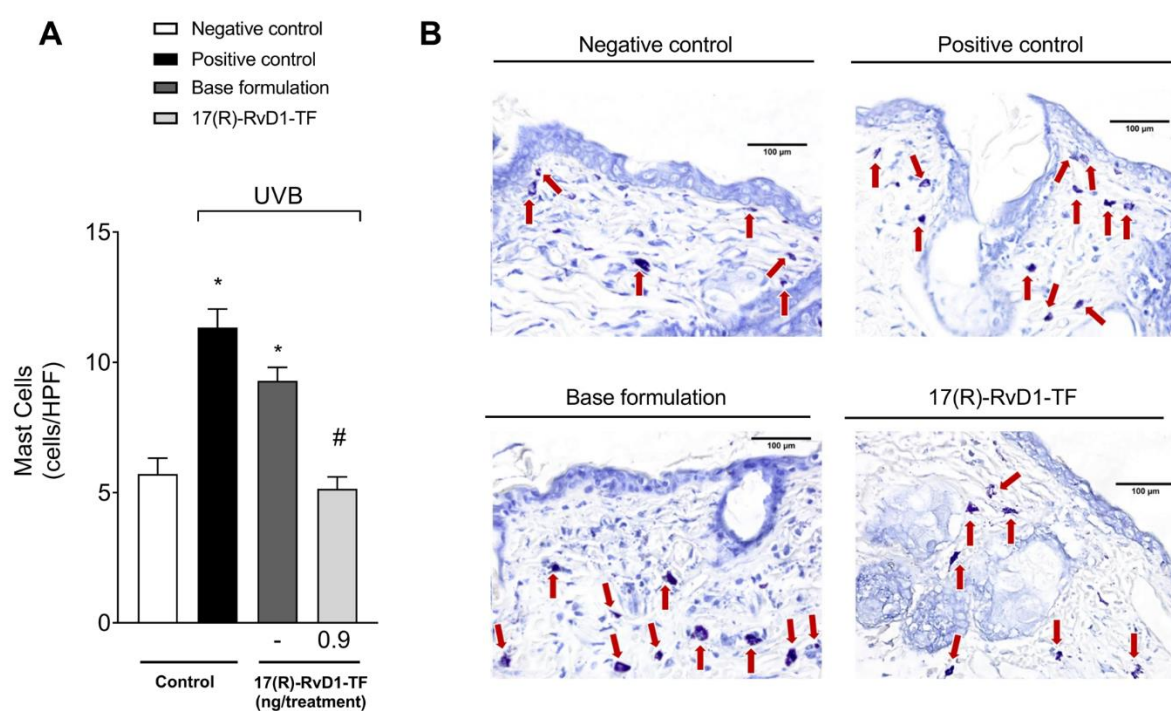


Figure 6. 17(R)-RvD1-TF (0.9 ng/treatment) inhibits UVB irradiation-induced mast cell count. Mast cell numbers were evaluated using toluidine blue in skin samples collected 12 h after the irradiation and were examined using light microscopy (400x magnification). Bars are means $\pm$ SEM of 6 mice per group and represent two separate experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ versus the negative control group; # $p < 0.05$ versus UVB- induced groups.

3.7. 17(R)-RvD1-TF oppresses the increase in epidermal thickness and sunburn cell count

Sections of cutaneous tissue stained with hematoxylin-eosin demonstrated that the thickness of the upper layer of skin on the back was significantly enhanced after exposure to UVB radiation in the groups that were exposed and not treated with a lipid mediator. In contrast, when treated with a topical application containing 17(R)-RvD1, the thickening of the skin was reduced (Fig. 7).

The exposure to UVB radiation triggered an increase in the number of sunburn cells, which are keratinocytes that undergo apoptosis. This increase was observed in both the group that was exposed to UVB radiation without any lipid mediator treatment and the positive control group. Nevertheless, the group that was exposed to UVB radiation and treated with 17(R)-RvD1-TF showed a considerably limited apoptotic process, in comparison to the other groups that were exposed to UVB radiation (as shown in Fig. 8).

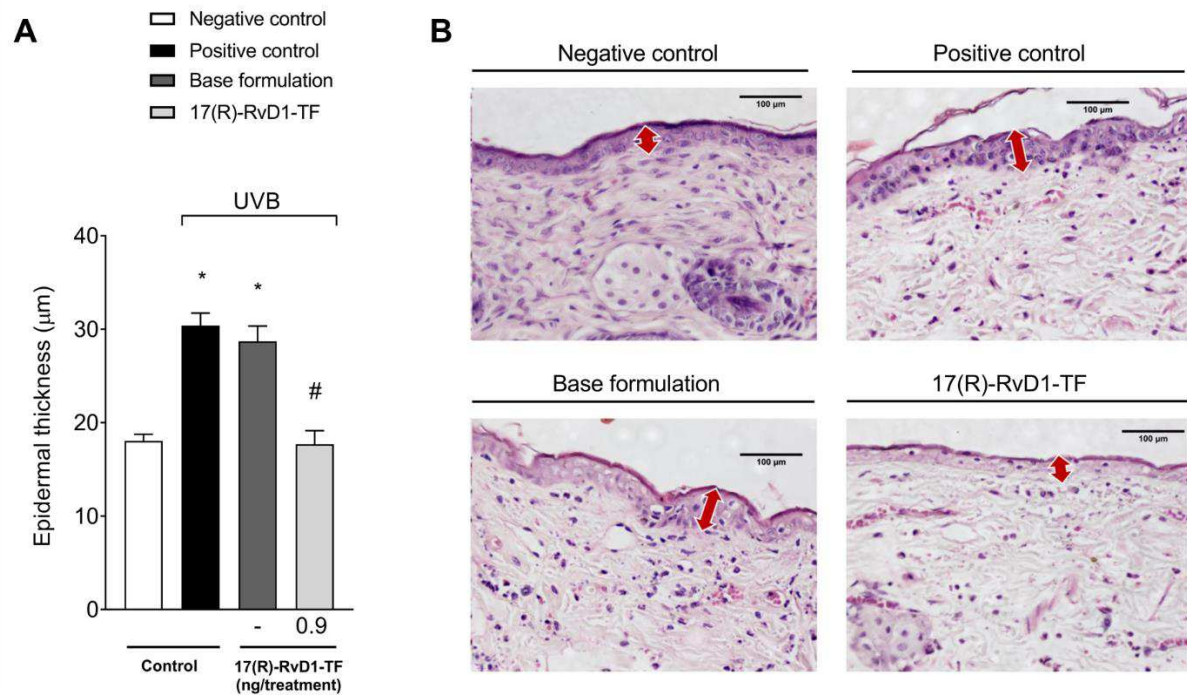


Figure 7. 17(R)-RvD1-TF (0.9 ng/treatment) reduces UVB irradiation-induced increase of epidermal thickness. Epidermal thickness was assessed by examining hematoxylin-eosin-stained skin samples collected 12 hours after irradiation using light microscopy at 400x magnification. Bars are means $\pm$ SEM of 6 mice per group and represent two separate experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ versus the negative control group; # $p < 0.05$ versus UVB- induced groups.

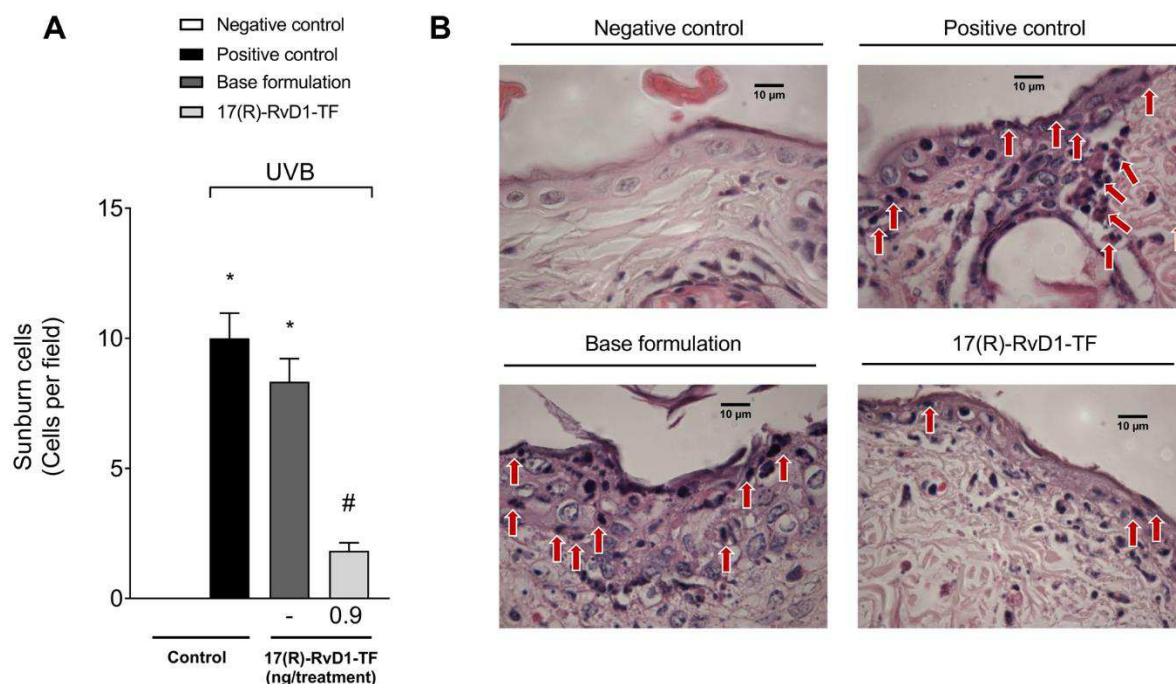


Figure 8. 17(R)-RvD1-TF (0.9 ng/treatment) decreases the multiplication of apoptotic keratinocytes after UVB. Sunburn cells were evaluated by examining hematoxylin-eosin-stained skin samples collected 12 hours after irradiation using light microscopy at 1000x magnification. Bars are means $\pm$ SEM of 6 mice per group and represent two separate experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ versus the negative control group; # $p < 0.05$ versus UVB-induced groups.

4. Discussion

Previous studies have shown that certain bioactive compounds derived from DHA, such as resolvin D1 and maresin 1, exhibit antioxidant and anti-inflammatory properties in the context of UVB-induced skin lesions [17,33]. Lipoxin A4, a lipid obtained from arachidonic acid, has also demonstrated therapeutic activity against UVB [20]. Additionally, an intravenously administered analog of resolvin D1 (induced by aspirin) has been found effective in countering ultraviolet rays [14]. These findings emphasize that specialized pro-resolution lipid mediators (SPMs) hold significant potential in mitigating damage caused by solar spectrum component. However, there is currently no documented evidence regarding the efficacy of topical application of

resolvin D1 epimer (17(R)-RvD1) about UVB-induced photo-oxidative damage. Therefore, this paper discusses the therapeutic potential of this mediator incorporated into a topical formulation in the absence of any existing reports.

The pathophysiological mechanisms of severe diseases such as cardiovascular, pulmonary and rheumatoid arthritis involve chronic inflammation process. To prevent irreversible tissue changes, monitoring inflammatory injury is critical [34]. Four groups of SPMs have been recognized in inflammatory exudates. These groups include lipoxins, resolvins, maresins, and protectins and have revealed therapeutic capabilities in resolving inflammation [35]. One of their primary sources is the consumption of marine products rich in omega-3 fatty acids [36]. DHA, a constituent of omega-3 fatty acids, is found in biological structures. The transformation of D-series resolvins is the culmination of a sequence of reactions involving enzymes known as lipoxygenases [37,38].

Complementary, the biosynthesis of potent endogenous mediators can occur with the addition of aspirin. One study confirmed this claim using inflammation models in mice treated with aspirin and DHA. Lipidomic analysis of inflammatory exudates identified these components by the aspirin-induced pathway with functional change of COX-2. In addition, the anti-inflammatory effects of these components were evidenced by a reduction in neutrophil infiltration and cytokines at the focus of inflammation [11,39]. To clarify, the potential action of 17(R)-RvD1 is similar to resolvin D1. It works by binding to specific receptors, ALX/FPR2 and GPR32, which promotes its resolving effects [40,41]. Interestingly, aspirin-induced resolvin epimers are less susceptible to the action of inactivating oxidoreductase enzymes, which makes them more stable and extends their activity [42,43].

This study focuses on skin lesions caused by the UVB spectrum of ultraviolet radiation. Understanding the effects of UVB radiation encourages the search for more effective therapy methods. Exposure to sources like ultraviolet radiation and carcinogenic compounds, or even from metabolism, creates unstable molecules that react with biological components. Fortunately, the body has an antioxidant defense system that can block the oxidation of elements and reduce the amount of ROS [44,45].

The measurement of antioxidants is an important parameter in determining oxidative damage in this study. The ABTS and FRAP assays are used to characterize non-skin-specific antioxidants. Both assays assess the ability of skin tissue to donate electrons to stabilize the compounds present in each test [18]. Additionally, the levels of GSH and catalase were also determined. GSH's sulfhydryl group establishes a vital role in neutralizing effects, while catalase regulates the number of radical species, such as hydrogen peroxide and other toxic products that are harmful to cells [46,47]. In a work that used skin cell culture (L929), a decrease in antioxidant defenses was observed after exposure to UVB radiation. This was determined through negative regulation of the ABTS and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical capture assays, as well as depletion of the antioxidants GSH and catalase [48]. Our findings support this evidence and confirm that UVB radiation has an oxidative effect on the skin, as all the tests conducted showed that the exposed groups had exhausted antioxidant properties. In compensation, the group treated with a topical formulation of 17(R)-RvD1 showed an improvement in the skin's antioxidant response and demonstrated cytoprotective action.

The ability of antioxidant components to regulate cellular balance is controlled by nuclear factors like nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). Nrf2 enables the expression and transcription of components that help fight against stressful conditions [49,50]. In an animal model of acute kidney injury produced by the herbicide paraquat, the potential activity of 17(R)-RvD1 was determined to inhibit nephrotoxicity. The attenuation of oxidative stimulation after lipid treatment was associated with the activation of Nrf2 and the expression of its target genes with antioxidative action, such as NADPH:quinone oxidoreductase-1 (NQO1), heme oxygenase-1 (HO-1), and superoxide dismutase1 (SOD1) [51]. Our research validated the information in the literature, showing that the topical application of 17(R)-RvD1-TF reduced oxidative injury to the skin when exposed to UVB photo-oxidative damage by positively regulating the Nrf2 signaling route.

It is known that ROS can be stimulated by the enzyme system nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX), which transfers electrons across membranes to oxygen [52,53]. Neutrophils have a specific type of NOX enzyme called NOX2, which is also involved in secreting the superoxide radical during the respiratory burst phenomenon to combat aggressors [54,55]. In our study, we

investigated the expression of the NOX 2 subunit (gp91^{phox}) and measured the superoxide radical using the NBT assay. Our results showed that 17(R)-RvD1-TF had an antioxidant effect on the skin, as evidenced by a decrease in these indicators.

Oxidative damage to lipids can occur due to higher levels of ROS caused by UVB radiation. This can lead to the worsening of existing tissue injuries. In biological membranes, the formation of peroxy radicals can cause damage to other fatty acids and proteins, resulting in disruption of their integrity [56]. Study have shown that exposure to UVB radiation leads to increased levels of the lipid peroxidation product, malondialdehyde, in fibroblast and keratinocyte cultures [57]. Lipid decomposition can cause iron-dependent cell death (ferroptosis) and the production of pro-inflammatory mediators [58]. After consolidating scientific literature, this report demonstrated that 17(R)-RvD1, a pro-resolution lipid, reduced UVB-induced lipid oxidation as measured by chemiluminescence.

The inflammatory process is an eminent episode in the damage caused by exposure to UVB radiation [59]. One of the main inflammatory biomarkers that triggers immune cell activation towards the injured area is the cytokine IL-1 β [60,61]. This biomarker is produced by phagocytic cells and epithelial cells such as keratinocytes. It activates other inflammatory components, such as adhesion molecules, and also leads to edema (vasodilation) [62,63]. With the guidance of cytokines and chemokines, neutrophils move towards the zone of operation to protect the body. The defense mechanism involves the secretion of enzymatic and oxidative substances. Myeloperoxidase contributes to oxidative stress by synthesizing oxidants for antimicrobial purposes. Additionally, neutrophils secrete metalloproteinases that break down the extracellular matrix to insert leukocytes to enter the injury scene [64,65].

The effects of 17(R)-RvD1 on inhibiting inflammatory processes were studied in a model of intestinal inflammation. The results showed that colonic inflammatory damage was reduced, with decreased expression of mRNA for NF- κ B and its inflammatory components such as adhesion molecules VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1) and ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), as well as limited activation of the p65 subunit of NF- κ B analyzed through immunohistochemistry and the chemokine CXCL1/KC (keratinocyte-derived chemokine) through enzyme-linked immunosorbent assay. It's important to note that inflammatory mediators are activated

by the relevant NF- κ B inducing pathway [66]. The *in vivo* findings of the present study also revealed that UVB radiation triggered an increase in inflammatory markers such as edema, pro-inflammatory cytokine IL-1 β , activity of enzymes MPO and MMP-9, and degradation of the dermal matrix by collagen analysis. However, topical application of 17(R)-RvD1-TF showed anti-inflammatory potential by limiting all of the investigated markers.

After being exposed to UVB rays, the p53 tumor suppressor gene loses its ability to repair DNA damage, which can lead to the development of malignant cells. The appearance of sunburn cells can help prevent the spread of these mutated cells and reduce the risk of tumor formation [67,68]. UVB exposure can also cause histopathological disorders such as hyperproliferation of the epidermis and the presence of mast cells in the dermis, which help to support the skin structure against produced damage [28,69,70]. Finally, the histological disturbances visualized by optical microscopy in our study were controlled after topical treatment containing 17(R)-RvD1. The use of topical application of medicaments has a local action on the injury and minimizes the alteration of the absorption of the active substance [71]. In short, all the evidence points out that, for the first time, topical application of 17(R)-RvD1-TF is an innovative therapy for skin lesions caused by UVB radiation, revealing its importance in the context of new pharmaceutical products.

5. Acknowledgments

This study was supported by Brazilian grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária and Parana State Government. Authors declare no conflict of interest.

6. References

- [1] T.G. Polefka, T.A. Meyer, P.P. Agin, R.J. Bianchini, Effects of Solar Radiation on the Skin, *J Cosmet Dermatol* 11 (2012) 134–143.
- [2] D. Mohania, S. Chandel, P. Kumar, V. Verma, K. Digvijay, D. Tripathi, K. Choudhury, S.K. Mitten, D. Shah, Ultraviolet radiations: Skin defense-damage mechanism, *Adv Exp Med Biol* 996 (2017) 71–87. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_7.
- [3] M. Wang, P. Charareh, X. Lei, J.L. Zhong, Autophagy: Multiple Mechanisms to Protect Skin from Ultraviolet Radiation-Driven Photoaging, *Oxid Med Cell Longev* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/8135985>.
- [4] G.N. Sharma, G. Gupta, P. Sharma, A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 28 (2018) 139–154. www.begellhouse.com.
- [5] N. Gupta, K. Verma, S. Nalla, A. Kulshreshtha, R. Lall, S. Prasad, Free Radicals as a Double-Edged Sword: The Cancer Preventive and Therapeutic Roles of Curcumin, *Molecules* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25225390>.
- [6] B. Cui, Y. Wang, J. Jin, Z. Yang, R. Guo, X. Li, L. Yang, Z. Li, Resveratrol Treats UVB-Induced Photoaging by Anti-MMP Expression, through Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antiapoptotic Properties, and Treats Photoaging by Upregulating VEGF-B Expression, *Oxid Med Cell Longev* 2022 (2022). <https://doi.org/10.1155/2022/6037303>.

- [7] L. Subedi, T.H. Lee, H.M. Wahedi, S.H. Baek, S.Y. Kim, Resveratrol-Enriched Rice Attenuates UVB-ROS-Induced Skin Aging via Downregulation of Inflammatory Cascades, *Oxid Med Cell Longev* 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/8379539>.
- [8] W. Torres, J.L. Pérez, M.P. Díaz, L. D'Marco, A. Checa-Ros, R. Carrasquero, L. Angarita, Y. Gómez, M. Chacín, P. Ramírez, N. Villasmil, S. Durán-Agüero, C. Cano, V. Bermúdez, The Role of Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators in Inflammation-Induced Carcinogenesis, *Int J Mol Sci* 24 (2023). <https://doi.org/10.3390/ijms241612623>.
- [9] E. Brennan, P. Kantharidis, M.E. Cooper, C. Godson, Pro-resolving lipid mediators: regulators of inflammation, metabolism and kidney function, *Nat Rev Nephrol* 17 (2021) 725–739. <https://doi.org/10.1038/s41581-021-00454-y>.
- [10] C.N. Serhan, Controlling the Resolution of Acute Inflammation: A New Genus of Dual Anti-Inflammatory and Proresolving Mediators, *J Periodontol* 79 (2008) 1520–1526. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080231>.
- [11] V. Fattori, T.H. Zaninelli, F.S. Rasquel-Oliveira, R. Casagrande, W.A. Verri, Specialized pro-resolving lipid mediators: A new class of non-immunosuppressive and non-opioid analgesic drugs, *Pharmacol Res* 151 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104549>.
- [12] T.A. Bhat, S.G. Kalathil, P.N. Bogner, P. V. Lehmann, T.H. Thatcher, P.J. Sime, Y. Thanavala, AT-RvD1 Mitigates Secondhand Smoke–Exacerbated Pulmonary Inflammation and Restores Secondhand Smoke–Suppressed Antibacterial Immunity, *The Journal of Immunology* 206 (2021) 1348–1360. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001228>.
- [13] O. Eickmeier, H. Seki, O. Haworth, J.N. Hilberath, F. Gao, M. Uddin, R.H. Croze, T. Carlo, M.A. Pfeffer, B.D. Levy, Aspirin-triggered resolvin D1 reduces mucosal inflammation and promotes resolution in a murine model of acute lung injury, *Mucosal Immunol* 6 (2013) 256–266. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.66>.
- [14] C.P.B. Melo, P. Saito, R.M. Martinez, L. Staurengo-Ferrari, I.C. Pinto, C.C.A. Rodrigues, S. Badaro-Garcia, J.A. Vignoli, M.M. Baracat, A.J.C. Bussmann, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Aspirin-Triggered Resolvin D1 (AT-RvD1)

Protects Mouse Skin against UVB-Induced Inflammation and Oxidative Stress, *Molecules* 28 (2023). <https://doi.org/10.3390/molecules28052417>.

- [15] C.P.B. Melo, P. Saito, D.L. Vale, C.C.A. Rodrigues, I.C. Pinto, R.M. Martinez, J.R. Bezerra, M.M. Baracat, W.A. Verri, Y.M. Fonseca-Bazzo, S.R. Georgetti, R. Casagrande, Protection against UVB deleterious skin effects in a mouse model: effect of a topical emulsion containing *Cordia verbenacea* extract, *Photochemical and Photobiological Sciences* 20 (2021) 1033–1051. <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00079-x>.
- [16] M.Z. Campanini, F.A. Pinho-Ribeiro, A.L.M. Ivan, V.S. Ferreira, F.M.P. Vilela, F.T.M.C. Vicentini, R.M. Martinez, A.C. Zarpelon, M.J.V. Fonseca, T.J. Faria, M.M. Baracat, W.A. Verri, S.R. Georgetti, R. Casagrande, Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice, *J Photochem Photobiol B* 127 (2013) 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.08.007>.
- [17] P. Saito, C.P.B. Melo, R.M. Martinez, V. Fattori, T.L.C. Cezar, I.C. Pinto, A.J.C. Bussmann, J.A. Vignoli, S.R. Georgetti, M.M. Baracat, W.A. Verri, R. Casagrande, The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice, *Front Pharmacol* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01242>.
- [18] V. Katalinic, D. Modun, I. Music, M. Boban, Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays, *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 140 (2005) 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.005>.
- [19] R.M. Martinez, F.A. Pinho-Ribeiro, V.S. Steffen, C. V. Caviglione, J.A. Vignoli, D.S. Barbosa, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice, *J Nat Prod* 78 (2015) 1647–1655. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00198>.
- [20] R.M. Martinez, V. Fattori, P. Saito, C.P.B. Melo, S.M. Borghi, I.C. Pinto, A.J.C. Bussmann, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri Jr, R. Casagrande, Lipoxin A4

inhibits UV radiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice, *J Dermatol Sci* 91 (2018) 164–174.

- [21] P. Srinivasan, K.E. Sabitha, C.S. Shyamaladevi, Attenuation of 4-Nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols, *Life Sci* 80 (2007) 1080–1086. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.11.051>.
- [22] H. Aebi, Catalase in Vitro, *Methods Enzymol* 105 (1984). [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3).
- [23] W.A. Verri, A.T.G. Guerrero, S.Y. Fukada, D.A. Valerio, T.M. Cunha, D. Xu, S. Rgio, H. Ferreira, F.Y. Liew, F.Q. Cunha, IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice, *PNAS* 105 (2008) 2723–2728. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0712116105.
- [24] B. Gonzalez-Flecha, S. Llesuy, A. Boveris, HYDROPEROXIDE-INITIATED CHEMILUMINESCENCE: AN ASSAY FOR OXIDATIVE STRESS IN BIOPSIES OF HEART, LIVER, AND MUSCLE, *Free Radic Biol Med* 10 (1991) 93–100.
- [25] A.L.M. Ivan, M.Z. Campanini, R.M. Martinez, V.S. Ferreira, V.S. Steffen, F.T.M.C. Vicentini, F.M.P. Vilela, F.S. Martins, A.C. Zarpelon, T.M. Cunha, M.J.V. Fonseca, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro, *J Photochem Photobiol B* 138 (2014) 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.05.010>.
- [26] R. Casagrande, S.R. Georgetti, W.A. Verri, D.J. Dorta, A.C. dos Santos, M.J.V. Fonseca, Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice, *J Photochem Photobiol B* 84 (2006) 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.01.006>.
- [27] M.J.V. Fonseca, Y.M. Fonseca, F. Marquele-Oliveira, F.T.M.C. Vicentini, N.A.J.C. Furtado, J.P.B. Sousa, Y.M. Lucisano-Valim, Evaluation of the potential of Brazilian propolis against UV-induced oxidative stress, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011 (2011). <https://doi.org/10.1155/2011/863917>.
- [28] C.M. Kumagai, R.M. Martinez, B.B. Colombo, P. Saito, I.C. Pinto, C.C.A. Rodrigues, D.L. Vale, R.L.N. Matos, A.P.F.R.L. Bracarense, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, J.T.

- Clemente-Napimoga, M.H. Napimoga, V. Fattori, W.A. Verri, R. Casagrande, Topical Administration of 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 Using a Nonionic Cream: Effect on UVB-Induced Skin Oxidative, Inflammatory, and Histopathological Modifications in Mice, *Mediators Inflamm* 2021 (2021). <https://doi.org/10.1155/2021/9330596>.
- [29] J.H. Song, M.J. Piao, X. Han, K. Ah Kang, H.K. Kang, W.J. Yoon, M.H. Ko, N.H. Lee, M.Y. Lee, S. Chae, J.W. Hyun, Anti-wrinkle effects of *Sargassum muticum* ethyl acetate fraction on ultraviolet B-irradiated hairless mouse skin and mechanistic evaluation in the human HaCaT keratinocyte cell line, *Mol Med Rep* 14 (2016) 2937–2944. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5655>.
- [30] S. Mouret, J. Wartelle, M. Batal, S. Emorine, M. Bertoni, T. Poyot, C. Cléry-Barraud, N. El Bakdouri, A. Peinnequin, T. Douki, I. Boudry, Time course of skin features and inflammatory biomarkers after liquid sulfur mustard exposure in SKH-1 hairless mice, *Toxicol Lett* 232 (2015) 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.09.022>.
- [31] Y. Deng, A. Ediriwickrema, F. Yang, J. Lewis, M. Girardi, W.M. Saltzman, A sunblock based on bioadhesive nanoparticles, *Nat Mater* 14 (2015) 1278–1285. <https://doi.org/10.1038/nmat4422>.
- [32] A. Schwarz, R. Bhardwaj, Y. Aragane, K. Mahnke, H. Riemann, D. Metze, T.A. Luger, T. Schwarz, Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: Evidence for partial involvement of tumor necrosis factor- α in the formation of sunburn cells, *Journal of Investigative Dermatology* 104 (1995) 922–927. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12606202>.
- [33] T.L.C. Cezar, R.M. Martinez, C. da Rocha, C.P.B. Melo, D.L. Vale, S.M. Borghi, V. Fattori, J.A. Vignoli, D. Camilios-Neto, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Treatment with maresin 1, a docosahexaenoic acid-derived pro-resolution lipid, protects skin from inflammation and oxidative stress caused by UVB irradiation, *Sci Rep* 9 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39584-6>.
- [34] J. Dalli, C. Serhan, Macrophage Proresolving Mediators—the When and Where, *Microbiol Spectr* 4 (2016). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mchd-0001-2014>.
- [35] C.N. Serhan, K. Gotlinger, S. Hong, M. Arita, Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: An overview of their protective roles in catabasis, *Prostaglandins*

Other Lipid Mediat 73 (2004) 155–172.
<https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2004.03.005>.

- [36] P.C. Norris, S. Libreros, C.N. Serhan, Resolution metabolomes activated by hypoxic environment, *Sci. Adv* 5 (2019) 4895–4918.
- [37] C.N. Serhan, B.D. Levy, Resolvins in inflammation: Emergence of the pro-resolving superfamily of mediators, *Journal of Clinical Investigation* 128 (2018) 2657–2669.
<https://doi.org/10.1172/JCI97943>.
- [38] N.H. Schebb, H. Kühn, A.S. Kahnt, K.M. Rund, V.B. O'Donnell, N. Flamand, M. Peters-Golden, P.J. Jakobsson, K.H. Weylandt, N. Rohwer, R.C. Murphy, G. Geisslinger, G.A. FitzGerald, J. Hanson, C. Dahlgren, M.W. Alnouri, S. Offermanns, D. Steinhilber, Formation, Signaling and Occurrence of Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators—What is the Evidence so far?, *Front Pharmacol* 13 (2022).
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.838782>.
- [39] C.N. Serhan, S. Hong, K. Gronert, S.P. Colgan, P.R. Devchand, G. Mirick, R.L. Moussignac, Resolvins: A family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals, *Journal of Experimental Medicine* 196 (2002) 1025–1037.
<https://doi.org/10.1084/jem.20020760>.
- [40] H. Wang, D. Anthony, S. Yatmaz, O. Wijburg, C. Satzke, B. Levy, R. Vlahos, S. Bozinovski, Aspirin-triggered resolvin D1 reduces pneumococcal lung infection and inflammation in a viral and bacterial coinfection pneumonia model, *Clin Sci* 131 (2017) 2347–2362. <https://doi.org/10.1042/CS20171006>.
- [41] V.S. Nunes, A.P. Rogério, O. Abrahão, Insights into the Activation Mechanism of the ALX/FPR2 Receptor, *Journal of Physical Chemistry Letters* 11 (2020) 8952–8957.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.0c02052>.
- [42] S.K. Orr, R.A. Colas, J. Dalli, N. Chiang, C.N. Serhan, Proresolving actions of a new resolvin D1 analog mimetic qualifies as an immunoresolvent, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 308 (2015) 904–911. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00370.2014.-Resolution>.

- [43] Y.P. Sun, S.F. Oh, J. Uddin, R. Yang, K. Gotlinger, E. Campbell, S.P. Colgan, N.A. Petasis, C.N. Serhan, Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer: Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation, *Journal of Biological Chemistry* 282 (2007) 9323–9334. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609212200>.
- [44] S.S. Ali, H. Ahsan, M.K. Zia, T. Siddiqui, F.H. Khan, Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players, *J Food Biochem* 44 (2020). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13145>.
- [45] E. Dupont, J. Gomez, D. Bilodeau, Beyond UV radiation: A skin under challenge, *Int J Cosmet Sci* 35 (2013) 224–232. <https://doi.org/10.1111/ics.12036>.
- [46] J.B. Owen, D. Allan Butterfiel, Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio, *Methods in Molecular Biology* 648 (2010) 269–277. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-756-3_18.
- [47] M.M. Goyal, A. Basak, Human catalase: Looking for complete identity, *Protein Cell* 1 (2010) 888–897. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0113-z>.
- [48] M.M. Oliveira, B.A. Ratti, R.G. Daré, S.O. Silva, M.D.C.T. Truiti, T. Ueda-Nakamura, R. Auzély-Velty, C. V. Nakamura, Dihydrocaffeic acid prevents UVB-induced oxidative stress leading to the inhibition of apoptosis and MMP-1 expression via p38 signaling pathway, *Oxid Med Cell Longev* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/2419096>.
- [49] M. Ben Yehuda Greenwald, M. Frušić-Zlotkin, Y. Soroka, S. Ben Sasson, H. Bianco-Peled, R. Bitton, R. Kohen, Nitroxide delivery system for Nrf2 activation and skin protection, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 94 (2015) 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.008>.
- [50] M. Galiè, V. Covi, G. Tabaracci, M. Malatesta, The role of Nrf2 in the antioxidant cellular response to medical ozone exposure, *Int J Mol Sci* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20164009>.
- [51] X. Hu, Y. Liang, H. Zhao, M. Zhao, Effects of AT-RvD1 on paraquat-induced acute renal injury in mice, *Int Immunopharmacol* 67 (2019) 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.12.029>.

- [52] H. Sharma, A.C. Hirko, M.A. King, B. Liu, Role of NADPH oxidase in cooperative reactive oxygen species generation in dopaminergic neurons induced by combined treatment with dieldrin and lindane, *Toxicol Lett* 299 (2018) 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.09.006>.
- [53] C. Veith, A.W. Boots, M. Idris, F.J. Van Schooten, A. Van Der Vliet, Redox Imbalance in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Role for Oxidant Cross-Talk between NADPH Oxidase Enzymes and Mitochondria, *Antioxid Redox Signal* 31 (2019) 1092–1115. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7742>.
- [54] R. Vlahos, J. Stambas, S. Bozinovski, B.R.S. Broughton, G.R. Drummond, S. Selemidis, Inhibition of Nox2 oxidase activity ameliorates influenza a virus-induced lung inflammation, *PLoS Pathog* 7 (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001271>.
- [55] K. Hiramoto, Y. Yamate, E.F. Sato, Gp91phox NADPH oxidase modulates litter size by regulating mucin1 in the uterus of mice, *Syst Biol Reprod Med* 63 (2017) 130–139. <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1282063>.
- [56] J.M.C. Gutteridge, B. Halliwell, The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems, *Trends Biochem Sci* . 15 (1990) 129–35.
- [57] I. Dobrzyńska, B. Szachowicz-Petelska, E. Skrzydlewska, Z.A. Figaszewski, Effects of UVB Radiation on the Physicochemical Properties of Fibroblasts and Keratinocytes, *Journal of Membrane Biology* 249 (2016) 319–325. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9870-9>.
- [58] L. Deng, S. He, N. Guo, W. Tian, W. Zhang, L. Luo, Molecular mechanisms of ferroptosis and relevance to inflammation, *Inflammation Research* 72 (2023) 281–299. <https://doi.org/10.1007/s00011-022-01672-1>.
- [59] K. Roe, An inflammation classification system using cytokine parameters, *Scand J Immunol* 93 (2021). <https://doi.org/10.1111/sji.12970>.
- [60] W.A. Verri, F.O. Souto, S.M. Vieira, S.C.L. Almeida, S.Y. Fukada, D. Xu, J.C. Alves-Filho, T.M. Cunha, A.T.G. Guerrero, R.B. Mattos-Guimaraes, F.R. Oliveira, M.M. Teixeira, J.S. Silva, I.B. McInnes, S.H. Ferreira, P. Louzada, F.Y. Liew, F.Q. Cunha, IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF

- therapy, *Ann Rheum Dis* 69 (2010) 1697–1703. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.122655>.
- [61] A. Weber, P. Wasiliew, M. Kracht, Interleukin-1 β (IL-1 β) processing pathway, *Sci Signal* 3 (2010). <https://doi.org/10.1126/scisignal.3105cm2>.
- [62] C.A. Dinarello, Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family, *Annu Rev Immunol* 27 (2009) 519–550. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>.
- [63] E. Contassot, H.D. Beer, L.E. French, Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin, *Swiss Med Wkly* 142 (2012). <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13590>.
- [64] N. Zhang, X. Aiyasiding, W. jing Li, H. han Liao, Q. zhu Tang, Neutrophil degranulation and myocardial infarction, *Cell Communication and Signaling* 20 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00824-4>.
- [65] S. Chen, H. Chen, Q. Du, J. Shen, Targeting Myeloperoxidase (MPO) Mediated Oxidative Stress and Inflammation for Reducing Brain Ischemia Injury: Potential Application of Natural Compounds, *Front Physiol* 11 (2020). <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00433>.
- [66] A.F. Bento, R.F. Claudino, R.C. Dutra, R. Marcon, J.B. Calixto, Omega-3 Fatty Acid-Derived Mediators 17(R)-Hydroxy Docosahexaenoic Acid, Aspirin-Triggered Resolvin D1 and Resolvin D2 Prevent Experimental Colitis in Mice, *The Journal of Immunology* 187 (2011) 1957–1969. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101305>.
- [67] V.O. Melnikova, A. Pacifico, S. Chimenti, K. Peris, H.N. Ananthaswamy, Fate of UVB-induced p53 mutations in SKH-hr1 mouse skin after discontinuation of irradiation: Relationship to skin cancer development, *Oncogene* 24 (2005) 7055–7063. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208863>.
- [68] C.L. Benjamin, S.E. Ullrich, M.L. Kripke, H.N. Ananthaswamy, p53 tumor suppressor gene: A critical molecular target for UV induction and prevention of skin cancer, *Photochem Photobiol* 84 (2008) 55–62. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00213.x>.
- [69] C.P.B. Melo, P. Saito, D.L. Vale, C.C.A. Rodrigues, I.C. Pinto, R.M. Martinez, J.R. Bezerra, M.M. Baracat, W.A. Verri, Y.M. Fonseca-Bazzo, S.R. Georgetti, R.

Casagrande, Protective effect of oral treatment with *Cordia verbenacea* extract against UVB irradiation deleterious effects in the skin of hairless mouse, *J Photochem Photobiol B* 216 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112151>.

- [70] R.M. Martinez, V. Fattori, P. Saito, I.C. Pinto, C.C.A. Rodrigues, C.P.B. Melo, A.J.C. Bussmann, L. Staurengo-Ferrari, J.R. Bezerra, J.A. Vignoli, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, The lipoxin receptor/FPR2 agonist BML-111 protects mouse skin against ultraviolet B radiation, *Molecules* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25122953>.
- [71] R. M. Martinez, A. L. M. Ivan, D. L. Vale, M. Z. Campanini, V. S. Ferreira, V. S. Steffen, F. T. M. C. Vicentini, F. M. P. Vilela, M. J. V. Fonseca, M. M. Baracat, S. R. Georgetti, W. A. Verri Jr, R. Casagrande, Topical emulsion containing pyrrolidine dithiocarbamate: effectiveness against ultraviolet B irradiation-induced injury of hairless mouse skin, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 70 (2018) 1461–1473. <https://doi:10.1111/jphp.12997>.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A radiação UVB pertence ao espectro solar e é determinante na promoção de danos ao tecido cutâneo. Os efeitos deletérios da sua exposição incluem prejuízos a nível molecular como a geração de produtos mutagênicos a partir do DNA, podendo resultar em câncer de pele e envelhecimento. Seus mecanismos fisiopatológicos estão associados com a produção acentuada de radicais livres e deficiência do sistema antioxidante endógeno. Atrelada a esse fator, a resposta inflamatória é desencadeada através da ativação de vias como o NF- κ B, promovendo a ação de diversos componentes inflamatórios e fontes complementares de EROs, amplificando os danos teciduais. A utilização de moléculas com atividade terapêutica com objetivo de controlar a injúria causada por UVB é um caminho bastante promissor. Relatos da literatura abordam o efeito protetor dos lipídios pró-resolução RvD2 e 17(R)-RvD1 em outras condições. No entanto, até onde sabemos, não existem evidências que investigam o efeito desses componentes incorporados em formulação tópica no modelo de lesão cutânea induzida pela radiação UVB.

Os resultados *in vivo* obtidos nesse estudo demonstraram que os dois lipídios foram eficazes contra os danos oxidativos e inflamatórios induzidos pela radiação UVB. A formulação tópica contendo RvD2 inibiu o dano inflamatório ao reduzir o edema cutâneo, atividade da MPO e MMP-9, produção de citocinas (IL-1 β , TGF- β e IL-10), expressão da COX-2 e IL-1 β , dano ao colágeno, diminuição da espessura epidérmica, apoptose de queratinócitos e contagem de mastócitos. O efeito antioxidante da RvD2 está associado com a manutenção dos antioxidantes GSH, catalase e captura do radical ABTS, somados com a redução da produção de ânion superóxido e hidroperóxidos lipídicos. O tratamento com RvD2 também aumentou a expressão de RNAm para o fator envolvido na resposta antioxidante (Nrf2) e reduziu a expressão da subunidade associada com EROs (gp91^{phox}).

A formulação tópica contendo 17(R)-RvD1 também reduziu os parâmetros inflamatórios e oxidativos que foram avaliados. 17(R)-RvD1 diminuiu o edema de pele, recrutamento de neutrófilos, atividade da MMP-9, componentes da análise histopatológica e produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β . O estresse oxidativo foi atenuado com a expressão de RNAm limitada para gp91^{phox}, inibição da produção de hidroperóxidos e ânion superóxido, além de obter melhora nos níveis antioxidantes

como GSH, catalase, poder redutor do ferro (FRAP), atividade doadora de elétrons ao radical ABTS e expressão do fator nuclear Nrf2.

Cabe ainda destacar que, os dois mediadores lipídicos pró-resolução RvD2 e 17(R)-RvD1 foram efetivos nas concentrações em nanogramas. Portanto, nossos achados fornecem duas moléculas que possuem atividade terapêutica relevante para o desenvolvimento de novos medicamentos com a finalidade de controlar e/ou prevenir alterações cutâneas decorrentes da exposição à UVB.

6. REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in Vitro. **METHODS IN ENZYMOLOGY**, v. 105, 1984.

ALI, S. S.; AHSAN, H.; ZIA, M. K.; SIDDIQUI, T.; KHAN, F. H. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 3, 1 mar. 2020.

ANSARY, T. M.; HOSSAIN, M. R.; KAMIYA, K.; KOMINE, M.; OHTSUKI, M. **Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI, 2 abr. 2021.

ARATANI, Y. **Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function** *Archives of Biochemistry and Biophysics* Academic Press Inc., 15 fev. 2018.

BAIRD, L.; YAMAMOTO, M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v. 40, n. 13, 15 jun. 2020.

BÄSLER, K.; BRANDNER, J. M. Tight junctions in skin inflammation. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 469, n. 1, p. 3–14, 1 jan. 2017.

BATTIE, C.; VERSCHOORE, M. Cutaneous solar ultraviolet exposure and clinical aspects of photodamage. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 78, n. SUPPL.1, p. 9–14, 1 jan. 2012.

BENTO, A. F.; CLAUDINO, R. F.; DUTRA, R. C.; MARCON, R.; CALIXTO, J. B. Omega-3 Fatty Acid-Derived Mediators 17(R)-Hydroxy Docosahexaenoic Acid, Aspirin-Triggered Resolvin D1 and Resolvin D2 Prevent Experimental Colitis in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 187, p. 1957–1969, 2011.

BRASH, D. E. Roles of the transcription factor p53 in keratinocyte carcinomas. **British Journal of Dermatology**, v. 154, p. 8–10, 2006.

BRENNAN, E.; KANTHARIDIS, P.; COOPER, M. E.; GODSON, C. **Pro-resolving lipid mediators: regulators of inflammation, metabolism and kidney function***Nature Reviews Nephrology*Nature Research, 1 nov. 2021.

CADET, J.; RICHARD WAGNER, J. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 2, fev. 2013.

CAMPANINI, M. Z.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; IVAN, A. L. M.; FERREIRA, V. S.; VILELA, F. M. P.; VICENTINI, F. T. M. C.; MARTINEZA, R. M.; ZARPELON, A. C.; FONSECA, M. J. V.; FARIA, T. J.; BARACAT, M. M.; VERRI, W. A.; 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: Biology**, 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. **IL Farmaco**, v. 55, p. 526–534, 2000. Disponível em: <www.elsevier.nl/locate/farmac>.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A.; DORTA, D. J.; DOS SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, n. 1, p. 21–27, 3 jul. 2006.

CAYMAN CHEMICAL. Cayman Chemical, 2024. Disponível em: <<https://www.caymanchem.com/product/10007279/resolvin-d2>>. Acesso em: 03 Mar 2024.

CHENG, Y.; RONG, J. **Pro-resolving lipid mediators as therapeutic leads for cardiovascular diseases***Expert Opinion on Therapeutic Targets*Taylor and Francis Ltd, 4 maio 2019.

CHIANG, N.; DALLI, J.; COLAS, R. A.; SERHAN, C. N. Identification of resolvin D2 receptor mediating resolution of infections and organ protection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 8, p. 1203–1217, 27 jul. 2015.

CHIANG, N.; SERHA, C. N. Specialized pro-resolving mediator network: An update on production and actions. **Essays in Biochemistry**, v. 64, n. 3, p. 443–462, 2020.

CHIANG, S. K.; CHEN, S. E.; CHANG, L. C. **The role of HO-1 and its crosstalk with oxidative stress in cancer cell survival** *Cells* MDPI, 1 set. 2021.

CHOLEWSKI, M.; TOMCZYKOWA, M.; TOMCZYK, M. A comprehensive review of chemistry, sources and bioavailability of omega-3 fatty acids. **Nutrients**, v. 10, n. 11, 4 nov. 2018.

CUELHO, C. H. F.; ALVES, G. de A. D.; LOVATTO, M. O.; BONILHA, I. F.; BARBISAN, F.; DA CRUZ, I. B. M.; OLIVEIRA, S. M.; FACHINETTO, R.; DO CANTO, G. S.; MANFRON, M. P. Topical formulation containing Ilex Paraguariensis extract increases metalloproteinases and myeloperoxidase activities in mice exposed to UVB radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 189, p. 95–103, 1 dez. 2018.

CUI, B.; WANG, Y.; JIN, J.; YANG, Z.; GUO, R.; LI, X.; YANG, L.; LI, Z. Resveratrol Treats UVB-Induced Photoaging by Anti-MMP Expression, through Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antiapoptotic Properties, and Treats Photoaging by Upregulating VEGF-B Expression. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, 2022.

DAMIANI, E.; ULLRICH, S. E. Understanding the connection between platelet-activating factor, a UV-induced lipid mediator of inflammation, immune suppression and skin cancer. **Progress in Lipid Research**, v. 63, p. 14–27, 1 jul. 2016.

DEHKORDI, A. N.; BABAHEYDARI, F. M.; CHEHELGERDI, M.; DEHKORDI, S. R. Skin tissue engineering: Wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 10, n. 1, 29 mar. 2019.

DEL CAMPO, L. S. D.; RODRIGUES-DÍEZ, R.; SALAICES, M.; BRIONES, A. M.; GARCÍA-REDONDO, A. B. **Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators: New Therapeutic Approaches for Vascular Remodeling** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI, 1 abr. 2022.

DENG, Y.; EDIRIWICKREMA, A.; YANG, F.; LEWIS, J.; GIRARDI, M.; SALTZMAN, W. M. A sunblock based on bioadhesive nanoparticles. **Nature Materials**, v. 14, n. 12, p. 1278–1285, 1 dez. 2015.

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. **Free Radical Research**, v. 46, n. 4, p. 382–419, abr. 2012.

DOBZYŃSKA, I.; SZACHOWICZ-PETELSKA, B.; SKRZYDLEWSKA, E.; FIGASZEWSKI, Z. A. Effects of UVB Radiation on the Physicochemical Properties of Fibroblasts and Keratinocytes. **Journal of Membrane Biology**, v. 249, n. 3, p. 319–325, 1 jun. 2016.

D'ORAZIO, J.; JARRETT, S.; AMARO-ORTIZ, A.; SCOTT, T. UV radiation and the skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12222–12248, 2013.

DOYLE, R.; SADLIER, D. M.; GODSON, C. **Pro-resolving lipid mediators: Agents of anti-ageing?** *Seminars in Immunology* Academic Press, 1 dez. 2018.

EMRI, G.; PARAGH, G.; TÓSAKI, Á.; JANKA, E.; KOLLÁR, S.; HEGEDŰS, C.; GELLÉN, E.; HORKAY, I.; KONCZ, G.; REMENYIK, É. Ultraviolet radiation-mediated development of cutaneous melanoma: an update. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 185, p. 169–175, 1 ago. 2018.

FATTORI, V.; ZANINELLI, T. H.; RASQUEL-OLIVEIRA, F. S.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. **Specialized pro-resolving lipid mediators: A new class of non-immunosuppressive and non-opioid analgesic drugs** *Pharmacological Research* Academic Press, 1 jan. 2020.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61–8, 1997.

FONSECA, Y. M.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; VICENTINI, F. T. M. C.; FURTADO, N. A. J. C.; SOUSA, J. P. B.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; FONSECA, M. J. V. Evaluation of the potential of Brazilian propolis against UV-induced oxidative stress. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 1–2, p. 1–12, fev. 2009.

GILLIGAN, M. M.; GARTUNG, A.; SULCINER, M. L.; NORRIS, P. C.; SUKHATME, V. P.; BIELENBERG, D. R.; HUANG, S.; KIERAN, M. W.; SERHAN, C. N.; PANIGRAHY, D. Aspirin-triggered proresolving mediators stimulate resolution in cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 13, p. 6292–6297, 2019.

GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. HYDROPEROXIDE-INITIATED CHEMILUMINESCENCE: AN ASSAY FOR OXIDATIVE STRESS IN BIOPSIES OF HEART, LIVER, AND MUSCLE. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 10, p. 93–100, 1991.

GROMKOWSKA-KĘPKA, K. J.; PUŚCION-JAKUBIK, A.; MARKIEWICZ-ŻUKOWSKA, R.; SOCHA, K. The impact of ultraviolet radiation on skin photoaging — review of in vitro studies. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 20, n. 11, p. 3427–3431, 1 nov. 2021.

HAMMOUDA, M. B.; FORD, A. E.; LIU, Y.; ZHANG, J. Y. The JNK Signaling Pathway in Inflammatory Skin Disorders and Cancer. **Cells**, v. 9, n. 4, 2 abr. 2020.

HIRAMOTO, K.; KOBAYASHI, H.; YAMATE, Y.; ISHII, M.; SATO, E. F. Intercellular pathway through hyaluronic acid in UVB-induced inflammation. **Experimental Dermatology**, v. 21, n. 12, p. 911–914, dez. 2012.

HOHJOH, H.; INAZUMI, T.; TSUCHIYA, S.; SUGIMOTO, Y. **Prostanoid receptors and acute inflammation in skin** *Biochimie* Elsevier B.V., 2014.

HUANG, H. **Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: Recent advances** *Sensors (Switzerland)* MDPI AG, 1 out. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estimativa 2023 - Incidência de câncer no Brasil**.

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.; 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: Biology**, v. 138, p. 124–133, 5 set. 2014.

JI, L.; WEI, Y.; JIANG, T.; WANG, S. **Correlation of Nrf2, NQO1, MRP1, cmc and p53 in colorectal cancer and their relationships to clinicopathologic features and survival** *Int J Clin Exp Pathol*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.ijcep.com/>.

KAJIYA, K.; HIRAKAWA, S.; DETMAR, M. Vascular endothelial growth factor-A mediates ultraviolet B-induced impairment of lymphatic vessel function. **American Journal of Pathology**, v. 169, n. 4, p. 1496–1503, 2006.

KANG, I. S.; KIM, C. NADPH oxidase gp91phox contributes to RANKL-induced osteoclast differentiation by upregulating NFATc1. **Scientific Reports**, v. 6, 29 nov. 2016.

KATALINIC, V.; MODUN, D.; MUSIC, I.; BOBAN, M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 140, n. 1, p. 47–52, 2005.

KEADLE, T. L.; USUI, N.; LAYCOCK, K. A.; MILLER, J. K.; PEPOSE, J. S.; STUART, P. M. IL-1 and TNF- α Are Important Factors in the Pathogenesis of Murine Recurrent Herpetic Stromal Keratitis. **Invest Ophthalmol Vis Sci** , v. 41, n. 1, p. 96–102, 2000.

KEHRER, J. P.; KLOTZ, L. O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 765–798, 21 out. 2015.

KHOSHKHAHESH, F.; SIAHKUHAIN, M.; FISHER, G.; NAKHOSTIN-ROOH, B. Influence of a low-dose cox-2 inhibitor drug on exercise-induced inflammation, muscle damage and lipid peroxidation. **Biology of Sport**, v. 30, n. 1, p. 61–65, 2013.

KOSTYUK, V. A.; POTAPOVICH, A. I. Mechanisms of the suppression of free radical overproduction by antioxidants. **Front Biosci (Elite Ed)** . , v. 1, n. 1, p. 179–188, 2009.

KRISHNAMOORTHY, S.; RECCHIUTI, A.; CHIANG, N.; FREDMAN, G.; SERHAN, C. N. Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving MicroRNAs. **American Journal of Pathology**, v. 180, n. 5, p. 2018–2027, maio 2012.

KUMAGAI, C. M.; MARTINEZ, R. M.; COLOMBO, B. B.; SAITO, P.; PINTO, I. C.; RODRIGUES, C. C. A.; VALE, D. L.; MATOS, R. L. N.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; NAPIMOGA,

M. H.; FATTORI, V.; VERRI, W. A.; CASAGRANDE, R. Topical Administration of 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 Using a Nonionic Cream: Effect on UVB-Induced Skin Oxidative, Inflammatory, and Histopathological Modifications in Mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2021, 2021.

KUMARI, S.; PASPARAKIS, M. Epithelial cell death and inflammation in skin. *Em: Current Topics in Microbiology and Immunology*. [s.l.] Springer Verlag, 2017. p. 77–93.

LEE, H.; HONG, Y.; KIM, M. **Structural and functional changes and possible molecular mechanisms in aged skin** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI, 1 nov. 2021.

LEE, Y. I.; CHOI, S.; ROH, W. S.; LEE, J. H.; KIM, T. G. **Cellular senescence and inflammaging in the skin microenvironment** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, 2 abr. 2021.

LERCHE, C. M.; PHILIPSEN, P. A.; WULF, H. C. UVR: sun, lamps, pigmentation and Vitamin D. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 16, n. 3, p. 291–301, 2017.

LIU-SMITH, F.; JIA, J.; ZHENG, Y. UV-induced molecular signaling differences in melanoma and non-melanoma skin cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 996, p. 27–40, 2017.

MARTINEZ, R. M.; FATTORI, V.; SAITO, P.; MELO, C. B. P.; BORGHI, S. M.; PINTO, I. C.; BUSSMANN, A. J. C.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; JR, W. A. V.; CASAGRANDE, R. Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. **Journal of Dermatological Science**, v. 91, p. 164–174, 2018.

MARTINEZ, R. M., IVAN, A. L. M., VALE, D. L., CAMPANINI, M. Z., FERREIRA, V. S., STEFFEN, V. S., VICENTINI, F. T. M. C., VILELA, F. M. P., FONSECA, M. J. V., BARACAT, M. M., GEORGETTI, S. R., VERRI JR, W. A., CASAGRANDE, R. Topical

emulsion containing pyrrolidine dithiocarbamate: effectiveness against ultraviolet B irradiation-induced injury of hairless mouse skin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, p. 1461-1473, 2018.

MARTINEZ, R. M.; FATTORI, V.; SAITO, P.; PINTO, I. C.; RODRIGUES, C. C. A.; MELO, C. P. B.; BUSSMANN, A. J. C.; STAURENGO-FERRARI, L.; BEZERRA, J. R.; VIGNOLI, J. A.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A.; CASAGRANDE, R. The lipoxin receptor/FPR2 agonist BML-111 protects mouse skin against ultraviolet B radiation. **Molecules**, v. 25, n. 12, 1 jun. 2020.

MARTINEZ, R. M.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; STE, V. S.; CAVIGLIONE, C. V.; BARBOSA, S.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, 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, p. 1647–55, 2015.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, n. 3, p. 298–308, 2004.

MELO, C. P. B.; SAITO, P.; MARTINEZ, R. M.; STAURENGO-FERRARI, L.; PINTO, I. C.; RODRIGUES, C. C. A.; BADARO-GARCIA, S.; VIGNOLI, J. A.; BARACAT, M. M.; BUSSMANN, A. J. C.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A.; CASAGRANDE, R. Aspirin-Triggered Resolvin D1 (AT-RvD1) Protects Mouse Skin against UVB-Induced Inflammation and Oxidative Stress. **Molecules**, v. 28, p. 1–21, 2023.

MELO, C. P. B.; SAITO, P.; VALE, D. L.; RODRIGUES, C. C. A.; PINTO, I. C.; MARTINEZ, R. M.; BEZERRA, J. R.; BARACAT, M. M.; VERRI, W. A.; FONSECABAZZO, Y. M.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R. Protection against UVB deleterious skin effects in a mouse model: effect of a topical emulsion containing *Cordia verbenacea* extract. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1033–1051, 1 ago. 2021.

MOHANIA, D.; CHANDEL, S.; KUMAR, P.; VERMA, V.; DIGVIJAY, K.; TRIPATHI, D.; CHOUDHURY, K.; MITTEN, S. K.; SHAH, D. Ultraviolet radiations: Skin defense-

damage mechanism. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 996, p. 71–87, 2017.

MONTES DE OCA, M. K.; PEARLMAN, R. L.; MCCLEES, S. F.; STRICKLAND, R.; AFAQ, F. **Phytochemicals for the Prevention of Photocarcinogenesis** *Photochemistry and Photobiology* Blackwell Publishing Inc., 1 jul. 2017.

MOURET, S.; WARTELLE, J.; BATAL, M.; EMORINE, S.; BERTONI, M.; POYOT, T.; CLÉRY-BARRAUD, C.; BAKDOURI, N. EI; PEINNEQUIN, A.; DOUKI, T.; BOUDRY, I. Time course of skin features and inflammatory biomarkers after liquid sulfur mustard exposure in SKH-1 hairless mice. **Toxicology Letters**, v. 232, n. 1, p. 68–78, 5 jan. 2015.

NEHA, K.; HAIDER, M. R.; PATHAK, A.; YAR, M. S. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 178, p. 687–704, 15 set. 2019.

NGUYEN, A. V.; SOULIKA, A. M. The dynamics of the skin's immune system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, 2 abr. 2019.

ORR, S. K.; COLAS, R. A.; DALLI, J.; CHIANG, N.; SERHAN, C. N. Proresolving actions of a new resolvin D1 analog mimetic qualifies as an immunoresolvent. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 308, p. 904–911, 2015. Disponível em: <www.ajplung.org>.

PARK, C. K.; XU, Z. Z.; LIU, T.; LÜ, N.; SERHAN, C. N.; JI, R. R. Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype V1/A1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice: Distinct roles of resolvin D1, D2, and E1. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 50, p. 18433–18438, 14 dez. 2011.

PAWLINA, W.; ROSS, M. H. **Ross Histologia - Texto e atlas**. 8ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

POPE, N. H.; SALMON, M.; DAVIS, J. P.; CHATTERJEE, A.; SU, G.; CONTE, M. S.; AILAWADI, G.; UPCHURCH, G. R. D-series resolvins inhibit murine abdominal aortic aneurysm formation and increase M2 macrophage polarization. **FASEB Journal**, v. 30, n. 12, p. 4192–4201, 1 dez. 2016.

SAITO, M.; TANAKA, M.; MISAWA, E.; YAO, R.; NABESHIMA, K.; YAMAUCHI, K.; ABE, F.; YAMAMOTO, Y.; FURUKAWA, F. Oral administration of aloe vera gel powder prevents uvb-induced decrease in skin elasticity via suppression of overexpression of mmps in hairless mice. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 80, n. 7, p. 1416–1424, 2016.

SAITO, P.; MELO, C. P. B.; MARTINEZ, R. M.; FATTORI, V.; CEZAR, T. L. C.; PINTO, I. C.; BUSSMANN, A. J. C.; VIGNOLI, J. A.; GEORGETTI, S. R.; BARACAT, M. M.; VERRI, W. A.; CASAGRANDE, R. The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 31 out. 2018.

SCHWARZ, A.; BHARDWAJ, R.; ARAGANE, Y.; MAHNKE, K.; RIEMANN, H.; METZE, D.; LUGER, T. A.; SCHWARZ, T. Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: Evidence for partial involvement of tumor necrosis factor- α in the formation of sunburn cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, n. 6, p. 922–927, 1995.

SEKI, H.; SASAKI, T.; UEDA, T.; ARITA, M. **Resolvins as regulators of the immune system** *TheScientificWorldJournal* 4 maio 2010.

SERHAN, C. N. Controlling the Resolution of Acute Inflammation: A New Genus of Dual Anti-Inflammatory and Proresolving Mediators. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8S, p. 1520–1526, ago. 2008.

SERHAN, C. N. **Novel pro-resolving lipid mediators in inflammation are leads for resolution physiology** *Nature* Nature Publishing Group, 2014.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; DALLI, J. **New pro-resolving n-3 mediators bridge resolution of infectious inflammation to tissue regeneration** *Molecular Aspects of Medicine* Elsevier Ltd, 1 dez. 2018.

SERHAN, C. N.; GOTLINGER, K.; HONG, S.; ARITA, M. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: An overview of their protective roles in catabasis. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 73, n. 3–4, p. 155–172, abr. 2004.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, p. 345–81, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317->>.

SHEEHAN, J. M.; YOUNG, A. R. The sunburn cell revisited: an update on mechanistic aspects. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 1, n. 6, p. 365–377, 7 jun. 2002.

SKOTARCZAK, K.; OSMOLA-MANKOWSKA, A.; LODYGA, M.; POLANSKA, A.; MAZUR, M.; ADAMSKI, Z. Photoprotection: facts and controversies. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, p. 98–112, 2015.

SONG, J. H.; PIAO, M. J.; HAN, X.; AH KANG, K.; KANG, H. K.; YOON, W. J.; KO, M. H.; LEE, N. H.; LEE, M. Y.; CHAE, S.; HYUN, J. W. Anti-wrinkle effects of Sargassum muticum ethyl acetate fraction on ultraviolet B-irradiated hairless mouse skin and mechanistic evaluation in the human HaCaT keratinocyte cell line. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 4, p. 2937–2944, 1 out. 2016.

SPITE, M.; SUMMERS, L.; PORTER, T. F.; SRIVASTAVA, S.; BHATNAGAR, A.; SERHAN, C. N. Resolvin D1 controls inflammation initiated by glutathione-lipid

conjugates formed during oxidative stress. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 4, p. 1062–1073, 2009.

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, 27 fev. 2007.

SULCINER, M. L.; SERHAN, C. N.; GILLIGAN, M. M.; MUDGE, D. K.; CHANG, J.; GARTUNG, A.; LEHNER, K. A.; BIELENBERG, D. R.; SCHMIDT, B.; DALLI, J.; GREENE, E. R.; GUS-BRAUTBAR, Y.; PIWOWARSKI, J.; MAMMOTO, T.; ZURAKOWSKI, D.; PERRETTI, M.; SUKHATME, V. P.; KAIPAINEN, A.; KIERAN, M. W.; HUANG, S.; PANIGRAHY, D. Resolvins suppress tumor growth and enhance cancer therapy. **Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 1, p. 115–140, 1 jan. 2018.

SUN, Y. P.; OH, S. F.; UDDIN, J.; YANG, R.; GOTLINGER, K.; CAMPBELL, E.; COLGAN, S. P.; PETASIS, N. A.; SERHAN, C. N. Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer: Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 13, p. 9323–9334, 30 mar. 2007.

SVOBODOVÁ, A. R.; GALANDÁKOVÁ, A.; ŠIANSKÁ, J.; DOLEŽAL, D.; LICHNOVSKÁ, R.; ULRICHOVÁ, J.; VOSTÁLOVÁ, J. DNA damage after acute exposure of mice skin to physiological doses of UVB and UVA light. **Archives of Dermatological Research**, v. 304, n. 5, p. 407–412, jul. 2012.

UMAR, S. A.; TASDUQ, S. A. Ozone Layer Depletion and Emerging Public Health Concerns - An Update on Epidemiological Perspective of the Ambivalent Effects of Ultraviolet Radiation Exposure. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. 12, 10 mar. 2022.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 10 mar. 2006.

VERRI, W. A.; GUERRERO, A. T. G.; FUKADA, S. Y.; VALERIO, D. A.; CUNHA, T. M.; XU, D.; FERREIRA, S. H.; LIEW, F. Y.; CUNHA, F. Q. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 7, p. 2723–2728, 2008. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0712116105>>.

WANG, M.; CHARAREH, P.; LEI, X.; ZHONG, J. L. Autophagy: Multiple Mechanisms to Protect Skin from Ultraviolet Radiation-Driven Photoaging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

WANG, Q.; YE, Y.; LIU, W.; JIANG, S.; TASHIRO, S. I.; ONODERA, S.; GU, F.; WANG, Y.; IKEJIMA, T. Dual effects of silibinin treatment on autophagy-regulated dermal apoptosis retardation and epidermal apoptosis up-regulation in UVB-induced skin inflammation. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 14, n. 7, p. 688–699, 1 jul. 2012.

WEI, R.; ZHAO, Y.; WANG, J.; YANG, X.; LI, S.; WANG, Y.; YANG, X.; FEI, J.; HAO, X.; ZHAO, Y.; GUI, L.; DING, X. Tagitinin c induces ferroptosis through perk-nrf2-ho-1 signaling pathway in colorectal cancer cells. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 11, p. 2703–2717, 2021.

YAZDI, A. S.; GHORESCHI, K. The interleukin-1 family. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 941, p. 21–29, 1 out. 2016.

YE, Y.; SCHEFF, N. N.; BERNABÉ, D.; SALVO, E.; ONO, K.; LIU, C.; VEERAMACHANENI, R.; VIET, C. T.; VIET, D. T.; DOLAN, J. C.; SCHMIDT, B. L. Anti-cancer and analgesic effects of resolvin D2 in oral squamous cell carcinoma. **Neuropharmacology**, v. 139, p. 182–193, 1 set. 2018.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 5944–5972, 12 out. 2011.

YUNNA, C.; MENGROU, H.; LEI, W.; WEIDONG, C. Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, v. 877, 15 jun. 2020.

ZANINELLI, T. H.; FATTORI, V.; SARAIVA-SANTOS, T.; BADARO-GARCIA, S.; STAURENGO-FERRARI, L.; ANDRADE, K. C.; ARTERO, N. A.; FERRAZ, C. R.; BERTOZZI, M. M.; RASQUEL-OLIVEIRA, F.; MANCHOPE, M. F.; AMARAL, F. A.; TEIXEIRA, M. M.; BORGHI, S. M.; ROGERS, M. S.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. RvD1 disrupts nociceptor neuron and macrophage activation and neuroimmune communication, reducing pain and inflammation in gouty arthritis in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 179, n. 18, p. 4500–4515, 1 set. 2022.