



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

TALITA LAIANE CARDOZO CEZAR

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS
CONTENDO MARESINA 1 E LIPOXINA A4 NA
INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO CUTÂNEO
INDUZIDOS PELA RADIAÇÃO UVB**

Londrina
2021

TALITA LAIANE CARDOZO CEZAR

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS
CONTENDO MARESINA 1 E LIPOXINA A4 NA
INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO CUTÂNEO
INDUZIDOS PELA RADIAÇÃO UVB**

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

Orientador: Prof. Dra. Rúbia Casagrande

Londrina
2021

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

C419 CEZAR, TALITA.
POTENCIAL TERAPÊUTICO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS CONTENDO MARESINA 1 E LIPOXINA A4 NA INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO CUTÂNEO INDUZIDOS PELA RADIAÇÃO UVB / TALITA CEZAR. - Londrina, 2021.
117 f. : il.

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, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Mediadores Lipídicos - Tese. 2. Radiação UVB - Tese. 3. Inflamação - Tese. 4. Estresse oxidativo - 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

TALITA LAIANE CARDOZO CEZAR

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS
CONTENDO MARESINA 1 E LIPOXINA A4 NA
INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO CUTÂNEO
INDUZIDOS PELA RADIAÇÃO UVB**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Renata Martinez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Fabiana Testa Moura de Carvalho
Vicentini
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto - USP

Prof. Dr. Victor Fattori
Boston Children's Hospital-Harvard Medical
School

Profa. Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Londrina, 18 de agosto de 2021.

Dedico este trabalho:

A Deus, por estar presente em minha vida e proporcionar a realização de mais uma conquista.

A minha família meu eterno agradecimento, pois juntos eles me ensinaram todos os valores pessoais e profissionais, além de todo o apoio e incentivo para a concretização deste sonho.

Aos meus amigos e familiares por estarem ao meu lado nesta trajetória. Obrigada por toda a paciência e incentivo, vocês fazem parte desta conquista.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta tese marca o fim de mais uma etapa muito importante da minha vida e, como é próprio desse momento, devo lembrar as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que tudo chegasse a um bom termo.

Agradeço à minha orientadora Prof. Dr, Rúbia Casagrande, por toda a orientação, paciência e incentivo ao longo deste trabalho. Muito obrigado pela oportunidade em me orientar, me ensinar a ser mais crítica e por contribuir para a minha carreira profissional.

Ao Prof. Dr. Waldiceu Verri que sempre me ajudou e suportou nas dúvidas ao longo desse trabalho.

Aos alunos do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina que me auxiliaram na conclusão desse trabalho.

Aos professores do doutorado, obrigada por todo o conhecimento passado.

Aos colaboradores da Secretaria da Pós-Graduação em Ciências da Saúde por todo auxílio prestado.

Agradeço igualmente a meus pais Zaqueu e Vanderleia por todo ensinamento e incentivo, e a minha irmã Tatiane pelo apoio.

Ao meu noivo Bruno pela compreensão e paciência em todos os momentos difíceis ao longo desta etapa.

CEZAR, Talita Laiane Cardozo. **Potencial terapêutico de formulações tópicas contendo Maresina 1 e Lipoxina A4 na inflamação e estresse oxidativo induzidos pela radiação UVB.** 2021. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A pele é o maior órgão do corpo humano em extensão e a primeira barreira do organismo a fatores do meio externo. Entre estes, destaca-se à exposição à radiação UVB que pode causar aumento dos radicais livres, inflamação cutânea, a qual pode levar ao desenvolvimento de câncer e envelhecimento precoce. O entendimento contemporâneo da resolução da inflamação envolve a sinalização de vias pró-resolutivas com a biossíntese de mediadores lipídicos pró-resolutivos especializados (SPMs), que tem a função de limitar o processo inflamatório e promover sua resolução. Dentre eles, podemos destacar a MaR1, um SPM derivado do ácido graxo decosaheptaenóico (DHA), e a LXA4, um SPM derivado do ácido araquidônico (AA). Ambas moléculas possuem efeitos analgésico, anti-inflamatórios e antioxidante. Assim, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a eficácia terapêutica de formulações tópicas contendo MaR1 ou LXA4 (incorporadas em creme e gel creme, respectivamente) nos danos cutâneos induzidos pela radiação UVB em camundongos. Para induzir danos à pele, camundongos sem pelo da linhagem HRS/J (CEUA nº017/2015, processo CEUA nº 1447.2015.10) foram expostos a uma dose de irradiação UVB aguda de 4,14 J/cm², e as amostras de pele dorsal foram coletadas para avaliar a resposta inflamatória e o estresse oxidativo por meio dos testes de edema de pele, atividade da mieloperoxidase (MPO), atividade/secreção de metaloproteinase-9, capacidade antioxidante global (FRAP), níveis dos antioxidantes endógenos glutatona reduzida (GSH) e catalase (CAT), produção de ânion superóxido e hidroperóxidos lipídicos e avaliação histopatológica pelas colorações de hematoxilina eosina (H & E), azul toluidina e tricrômico de masson. Os resultados *in vivo* evidenciaram que as formulações tópicas contendo MaR1 ou LXA4 reduziram a inflamação cutânea, diminuindo o edema de pele, o recrutamento de neutrófilos, a atividade de metaloproteinase-9, a apoptose dos queratinócitos, o espessamento da epiderme, o número de mastócitos e a degradação de fibras de colágeno comparada com os grupos controles. A mesma comparação foi realizada para se determinar o efeito das formulações tópicas contendo MaR1 ou LXA4 contra o estresse oxidativo induzido pela radiação UVB e foi demonstrado que estas formulações mantiveram os níveis de redução ferrica (FRAP), de GSH e a atividade da CAT semelhantes ao grupo não irradiado, e ainda diminuíram a produção de hidroperóxidos lipídicos e de ânions superóxidos. Dessa forma, os resultados sugerem que as formulações contendo MaR1 ou LXA4 são um potente aliado na prevenção/resolução da inflamação da pele e inibição do estresse oxidativo induzido pela radiação UVB.

Palavras-chave: maresina 1; lipoxina A4; antioxidante; inflamação; radiação UVB.

CEZAR, Talita Laiane Cardozo. **Therapeutic potential of topical formulations containing Maresin 1 and Lipoxin A4 in inflammation and oxidative stress induced by UVB radiation.** 2021. 112 p. Teses (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

The skin is the largest organ in the human body in extension and the body's first barrier to external factors. Among these, exposure to UVB radiation stands out, which can cause an increase in free radicals, skin inflammation, which can lead to the development of cancer and premature aging. The contemporary understanding of inflammation resolution involves the signaling of pro-resolving pathways with the biosynthesis of specialized pro-resolving lipid mediators (SPMs), which have the function of limiting the inflammatory process and promoting its resolution. Among them, we can highlight MaR1, a SPM, derived from docosahexaenoic fatty acid (DHA), and LXA4, a SPM derived from arachidonic acid (AA). Thus, this research aimed to evaluate the therapeutic efficacy of topical formulations containing MaR1 or LXA4 (incorporated in cream and gel cream, respectively) on skin damage induced by UVB radiation in mice. To induce skin damage, hairless mice of the HRS/J lineage (CEUA nº017/2015, CEUA process nº1447.2015.10) were exposed to an acute UVB irradiation dose of 4.14 J/cm², and as skin dorsal samples were collected to assess inflammatory response and oxidative stress through the tests of skin edema, myeloperoxidase (MPO) activity, metalloproteinase-9 activity / secretion, global antioxidant capacity (FRAP), levels of endogenous antioxidants reduced glutathione (GSH) and catalase (CAT), production of superoxide anion and lipid hydroperoxides and histopathological evaluation by evaluation by hematoxylin eosin (H&E), toluidine blue and masson trichrome. The in vivo results showed that topical formulations containing MaR1 or LXA4 reduced skin inflammation, decreasing skin edema, neutrophil recruitment, metalloproteinase-9 activity, keratinocyte apoptosis, epidermal thickening, mast cell number and collagen fiber degradation compared to control groups. The same comparison was performed to determine the effect of topical formulations containing MaR1 or LXA4 against oxidative stress induced by UVB radiation and it was found that these formulations maintained ferric reduction levels (FRAP), GSH and CAT activity at levels basic, and also decreased the production of lipid hydroperoxides and superoxide anions. Thus, the results suggest that formulations containing MaR1 or LXA4 were a potent ally in the prevention/resolution of skin inflammation and inhibition of oxidative stress induced by UVB radiation.

Key words: 7(R) maresin 1; lipoxin A4; antioxidant; inflammation; UVB radiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	As 3 camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme	13
Figura 2 -	Espectro eletromagnético.....	14
Figura 3 -	Absorção da RUV pelas camadas da pele.....	15
Figure 4 -	Efeitos a nível celular da exposição à RUV.....	17
Figura 6 -	Exemplificação dos efeitos da exposição à radiação UVB na pele.	20
Figure 7 -	Representação da resolução da inflamação.	22
Figure 8 -	Biossíntese de mediadores de pró-resolução especializados (SPM) a partir de ácidos graxos poliinsaturados. S	23
Figure 9 -	Estrutura molecular Maresina 1: 7,14-dihidroxicosa-4Z,8,10,12,16Z,19Z-hexaenóico.	24
Figure 10 -	Estrutura molecular Lipoxina A4: Ácido 5S, 6R, 15S-trihidroxi-7,9,13-trans-11-cis-eicosatetraenóico	25
Figure 11 -	A ativação do receptor ALX pela LXA4 resulta em atividades anti-inflamatórias e pró-resolução..	26
Figure 12 -	Fluxograma dos tempos de tratamento com os protocolos experimentais para avaliação da eficácia da MaR1 e da LXA4 administradas topicamente.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Formulação creme contendo ou não MaR1	30
Tabela 2 -	Formulação gel-creme contendo ou não LXA4	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
AP-1	Ativador de proteína-1
APS	Persulfato de amônio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
COX-2	Ciclooxigenase-2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe ²⁺	Ferro
FeCl ₃ .6H ₂ O	Cloreto férrico hexahidratado
FRAP	Poder antioxidante de redução férrica
Gapdh	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
HCl	Ácido clorídrico
HO•	Radical hidroxil
HO-1	Hemeoxigenase-1
H&E	Hematoxilina e eosina
HTAB	Brometo de hexadecil trietil amônio
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL	Interleucina
KCl	Cloreto de potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
KOH	Hidróxido de potássio
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
LPO	Peroxidação lipídica
LXA ₄	Lipoxina A ₄

MaR1	7(R) Maresina 1
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	Azul de nitrotetrazólico
NF-κB	Fator nuclear-Kb
Nrf2	Fator nuclear eritróide 3 relacionado ao fator 2
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
.OH	Radical hidroxil
PBS	Tampão fosfato salino
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloro acético
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TPTZ	2,4,6 tripiridil-S-triazina
Tris	Hidroximetil aminometano
RUV	Ultravioleta
UVB	Ultraviolet B

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	PELE E A RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA (RUV)	13
1.2	ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELA RADIAÇÃO UVB E ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS.....	16
1.3	RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA UVB.....	19
1.4	MEDIADORES LIPÍDICOS ANTI-INFLAMÓRIO/PRÓ-RESOLUÇÃO	21
1.5	FOTOQUIMIOPROTETORES	27
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3	MÉTODOS	29
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	29
3.2	SISTEMA E FONTE DE RADIAÇÃO UVB	29
3.3	PREPARO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES TÓPICAS	29
3.3.1	Formulação Creme (1) Contendo ou Não MaR1	30
3.3.2	Formulação Gel-Creme (2) Contendo ou Não LXA4	31
3.4	PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA APLICAÇÃO TÓPICA DAS FORMULAÇÕES CONTENDO MAR1 OU LXA4	31
3.4.1	Avaliação do Edema de Pele.....	33
3.4.2	Avaliação da Atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO).....	33
3.4.3	Determinação da Atividade/Secreção de Proteinases por Zimografia em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	34
3.4.4	Avaliação do Poder Antioxidante Redutor do Ferro (FRAP) na Pele.....	35
3.4.5	Avaliação dos Níveis do Antioxidante Endógeno (GSH)	36
3.4.6	Avaliação da Atividade da Catalase (CAT).....	36
3.4.7	Avaliação da Produção de Ânion Superóxido (O ₂ ^{•-})	37
3.4.8	Avaliação da Produção de Hidroperóxido (LOOH)	38
3.4.9	Avaliação Histopatológica por Microscopia Óptica	38
3.4.10	Análise Estatística dos Resultados.....	39

4	RESULTADO E DISCUSSÃO - ARTIGO	40
4.1	THERAPEUTIC POTENTIAL OF TOPICAL FORMULATION CONTAINING MARESIN 1 IN INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS INDUCED BY UVB RADIATION.....	40
4.2	THERAPEUTIC POTENTIAL OF TOPICAL FORMULATION CONTAINING LIPOXIN A4 IN INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS INDUCED BY UVB RADIATION ..	68
5	CONSIDERAÇÕES GERAIS	96
	REFERENCIAS	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 PELE E A RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA (RUV)

A pele do ser humano, que corresponde a 15% de seu peso corporal, é um órgão que reveste e delimita o organismo, sendo uma interface biológica com o meio ambiente continuamente exposta a fatores que ameaçam a integridade de estruturas celulares. Essencialmente dinâmica, a pele apresenta alterações constantes, sendo dotada de grande capacidade renovadora e de reparação (AFAQ et al., 2003; HIRAMOTO et al., 2012).

Com organização estratificada é composta por três camadas - a hipoderme, a derme e epiderme (Figura 1). A hipoderme, camada mais profunda, é composta por tecido adiposo e conjuntivo, funcionando como depósito de calorías, protegendo o organismo de traumas e variações de temperatura, modela o corpo e permite a mobilidade da pele em relação as estruturas subjacentes. A derme é constituída de tecido conjuntivo e fica acima da hipoderme; nela se situam os vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. Já a epiderme está disposta em camadas: basal ou germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e estrato córneo, sendo esta última a camada mais externa da epiderme e a principal responsável pela função barreira que a pele desempenha.

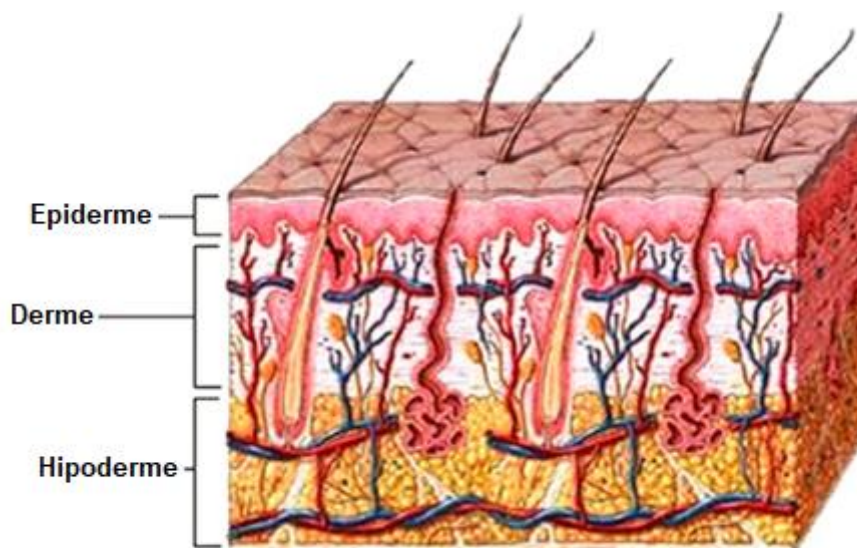


Figura 1: Figura adaptada de (KHAVKIN; ELLIS, 2011). As 3 camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme

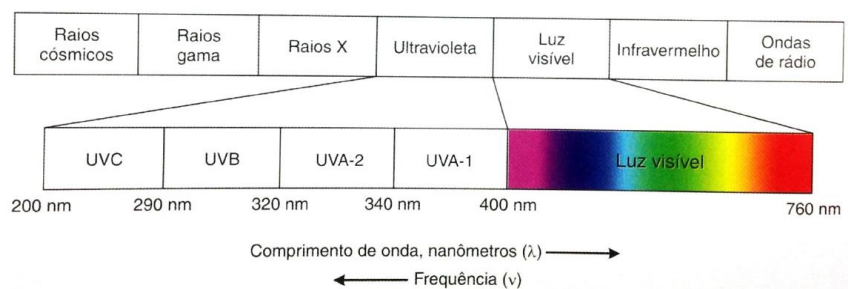
24 As principais células presentes na epiderme são os queratinócitos que representam
 25 aproximadamente 95% da sua composição (FONSECA et al., 2011; KHAVKIN; ELLIS,
 26 2011).

27 Os queratinócitos criam uma barreira física de proteção da pele, além de
 28 acumularem pigmentos de melanina. A melanina está relacionada com funções importantes
 29 na pele como a homeostase epidérmica, eliminação de radicais livres e, possivelmente, até
 30 mesmo com atividade antimicrobiana, além de bloquear a penetração da radiação
 31 ultravioleta (RUV) na pele (D'ORAZIO; HAIMAN; MACFADYEN, 2013; HALLER et al., 2002).

32 A RUV é o fator físico mais importante que atinge a pele e uma das principais causas
 33 de danos, que resulta em lesões pré-cancerosas, cancerosas e aceleração do
 34 envelhecimento cutâneo. A RUV atinge diferentes camadas da pele dependendo do
 35 comprimento de onda, e assim interage com diferentes células localizadas em
 36 profundidades distintas do tecido cutâneo (CASAGRANDE et al., 2007; QUAN et al., 2009b;
 37 SAIJA, 2000; TOUITOU; GODIN, 2008).

38 A RUV pode ser dividida didaticamente em UVA (320 a 400nm), UVB (290 a 320nm)
 39 e RUV (200 a 290nm) (Figura 2). Aproximadamente 95% da RUV que chega à superfície
 40 da Terra é formada por UVA e somente 5% por UVB (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005a).

41



42

43 Figura 2: Espectro eletromagnético (ADRIANO et al., 2013)

44

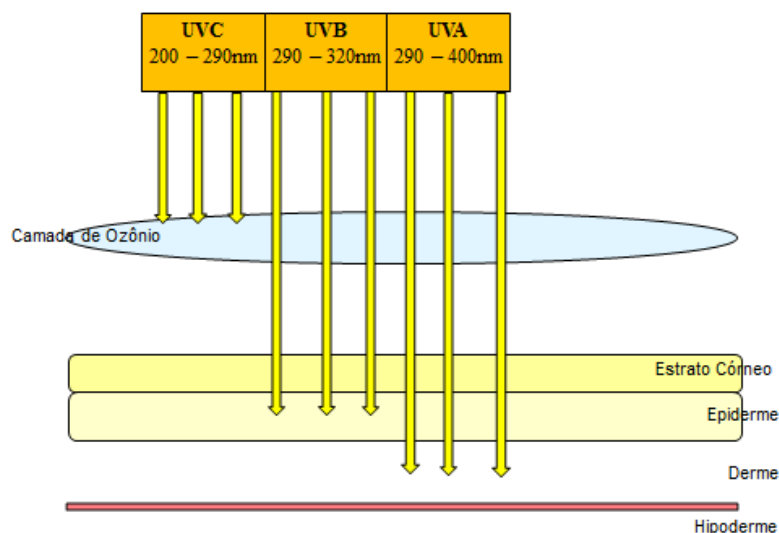
45 Quanto menor o comprimento de onda, mais energética é a radiação, e, portanto,
 46 maior o grau de severidade das lesões. Assim, os raios UVC são os mais danosos ao ser
 47 humano, porém, são absorvidos pela camada de ozônio e normalmente não atingem a
 48 Terra. Já as radiações UVB e UVA são capazes de penetrar a camada de ozônio e atingir a
 49 superfície do planeta, atuando de maneira específica conforme suas características
 50 energéticas, causando lesões com diferentes níveis de gravidade no organismo (LEBER et
 51 al., 2016).

52 A radiação UVA é de comprimento de onda longo, sendo menos energética quando
 53 comparada a UVB, portanto é capaz de penetrar profundamente a pele, interagindo assim
 54 tanto com os queratinócitos da epiderme, quanto com os fibroblastos dérmicos (PAZ et al.,
 55 2008). Os efeitos da UVA são queimadura solar, envelhecimento precoce da pele e
 56 supressão da função imune.

57 Já a radiação UVB apesar de representar apenas 5% da radiação RUV que atingem
 58 a superfície terrestre, é mais energética que a UVA, alcançando a epiderme, afetando
 59 diretamente os queratinócitos e a porção superior da derme (Figura 3). Desta forma, além
 60 da formação de radicais livres e outras espécies reativas e todos os danos por elas gerados,
 61 a UVB causa também alterações diretas no DNA, podendo levar a mutações, responsáveis
 62 pela formação de fotoprodutos diméricos, como pirimidinas, que podem causar lesões
 63 cutâneas pré-malignas.

64 A radiação UVB pode também causar manchas, descamação e queimaduras com
 65 vermelhidão e bolhas (BRITTO et al., 2017; LUIS; PÉREZ; GONZÁLEZ, 2007; NICHOLS;
 66 KATIYAR, 2010; SANTANA BALOGH et al., 2011; SHETTY et al., 2015a; TEWARI et al.,
 67 2013a).

68



69

70 Figura 3: Absorção da RUV pelas camadas da pele. UVC radiação de menor comprimento
 71 de onda sendo bloqueado pela camada de ozônio. UVB absorvida principalmente pela
 72 epiderme. UVA absorvida tanto pela epiderme como pela derme (Própria autora).

73

74 As radiações ao atingirem a pele, são parcialmente refletidas, refratadas e, em parte
75 absorvidas. As moléculas que estão presentes na pele (lipídios, proteínas, ácidos nucléicos)
76 e apresentam dupla ou tripla ligações de carbono com carbono em sua estrutura podem
77 absorver a RUV, sendo então denominadas de cromóforo. Quando o cromóforo absorve o
78 fóton, a molécula deixa o estado de repouso e torna-se excitada e, portanto, é capaz de
79 reagir com moléculas do meio biológico, levando à formação de fotoprodutos, ou, ainda a
80 modificações bioquímicas, ou mesmo a alterações celulares e, finalmente a alterações
81 teciduais (TEWARI et al., 2013b; XU; FISHER, 2005).

82

83

84 1.2 ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELA RADIAÇÃO UVB E ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS

85

86 Os radicais livres são definidos como toda espécie que possui um ou mais elétrons
87 desemparelhados (Sun et. al.1990). Na natureza o principal componente gerador de radicais
88 livres é o oxigênio no estado fundamental (O_2). As espécies geradas a partir do oxigênio são
89 denominadas espécies reativas do oxigênio (EROs) que inclui também espécies que não
90 possuem elétrons desemparelhados, mas que são muito reativas em decorrência de sua
91 instabilidade, como o peróxido de hidrogênio (RIBEIRO et al., 2005).

92 A concentração de EROs dentro das células é extremamente baixa em condições
93 de homeostasia, pois o organismo apresenta mecanismos endógenos para manter os níveis
94 de EROs dentro dos limites fisiológicos (RIBEIRO et al., 2005). A pele apresenta uma
95 grande quantidade de antioxidantes enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD), a
96 catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) assim como, antioxidantes hidrofílicos e
97 lipofílicos de baixo peso molecular, GSH (glutathione reduzida), vitamina C e E, carotenóides
98 e o ácido úrico para protegê-la dos danos oxidativos (POLETTA; SIMONIELLO; MUDRY,
99 2016). A maior parte destes antioxidantes concentra-se na epiderme, visto ser a camada
100 mais exposta às agressões (FUCHS, 1998).

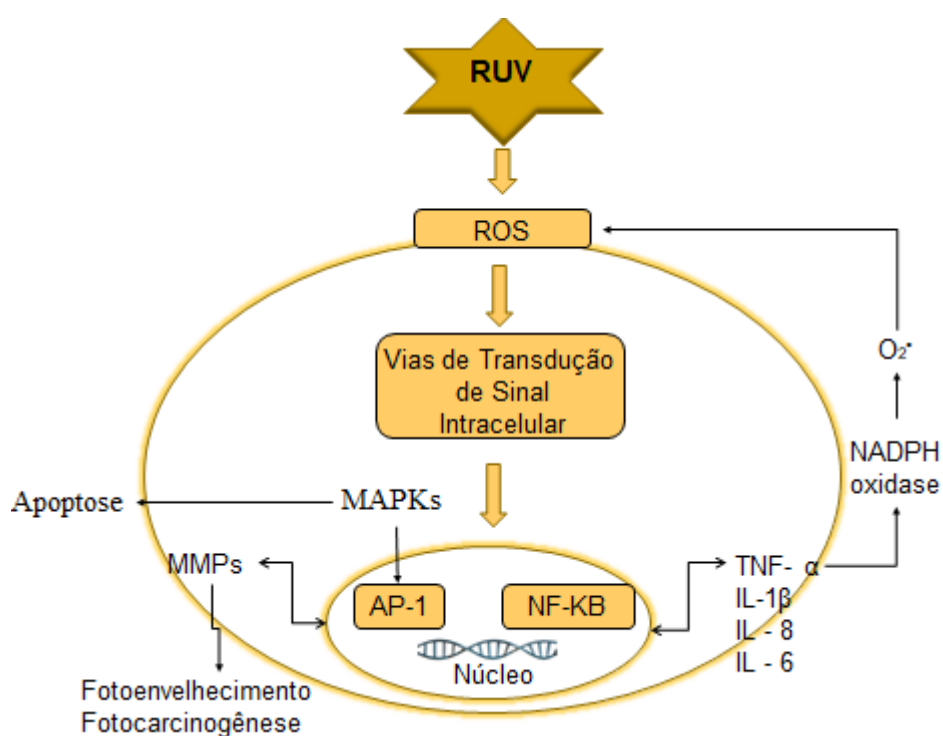
101 A exposição da pele a RUV leva a uma produção excessiva de EROs, como o
102 ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil (OH^{\cdot}) e o radical peroxil (IVAN et al., 2014a), além
103 de reduzir os antioxidantes endógenos, como a SOD e GSH (HUANG; BERNERD;
104 HALLIDAY, 2009; IVAN et al., 2014a; WEI et al., 2002).

105 As EROs produzidas na pele após a exposição à radiação UVB, induzem a ativação
106 do fator de transcrição NF- κ B, que é um fator transcricional sensível a EROs, e desempenha
107 um papel crucial na ativação de múltiplos genes que codificam diferentes citocinas pró-

108 inflamatórias como IL1- β , IL-6, IL-8 (IL = interleucina) e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa)
 109 e moléculas de adesão celular, que promovem a liberação de proteases e o recrutamento de
 110 células inflamatórias (Figure 4) (CAMPANINI et al., 2014; CARINI et al., 2000; HIRAMOTO
 111 et al., 2012).

112 A exposição à radiação UVB, ainda incrementa a produção de EROs por meio da
 113 ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (Figure 4).
 114 A NADPH oxidase está diretamente relacionada a formação do $O_2^{\cdot-}$ (AFAQ; ADHAMI;
 115 MUKHTAR, 2005b; CAMPANINI et al., 2014; CIRCU; AW, 2010) (Figure 4).

116



117

118

119 Figure 4: Efeitos a nível celular da exposição à RUV. A RUV aumenta as ROS e a ativa NF-
 120 κB aumentando a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a RUV ativa a via de
 121 sinalização MAPKs que são responsáveis pela vigilância dos queratinocitos e ativação NF-
 122 κB, NADPH oxidase e AP-1. A ativação da NADPH oxidase aumenta formação do $O_2^{\cdot-}$
 123 gerando mais ROS. Já a ativação AP1-1 está relacionada a secreção e ativação das MMPs,
 124 que são enzimas correlacionadas com o fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese (Própria
 125 autora).

126

127 A pele responde espontaneamente ao aumento dos níveis de EROs, no entanto esta
128 resposta pode não ser suficiente para evitar danos às células (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR,
129 2005a). Com o aumento da geração de EROs, a regeneração dos sistemas antioxidantes
130 endógenos torna-se insuficiente ocasionando a sua depleção (VICENTINI et al., 2008). A
131 consequência do desequilíbrio entre EROs e antioxidantes é o estresse oxidativo.

132 O estresse oxidativo pode causar danos celulares e alterações bioquímicas com
133 consequente danos nos lipídios de membrana, proteínas e ácidos nucléicos das células
134 epidérmicas e dérmicas, que interrompem suas funções celulares e em última instância pode
135 causar a morte das células (CASAGRANDE et al., 2006; CIRCU; AW, 2010; VICENTINI et
136 al., 2008).

137 O estresse oxidativo ainda é responsável por uma variedade de doenças
138 relacionadas a inflamação e ao estímulo oxidativo, como envelhecimento precoce e câncer
139 de pele (MCADAM; BREM; KARRAN, 2016; SOLIMAN; VAN DROSS, 2016; VENZA et al.,
140 2015).

141 Um sistema endógeno que auxilia a limitar os danos teciduais causados pela
142 radiação RUV é do fator de transcrição Nrf2 (fator nuclear [derivado eritróide-2] tipo 2). Este
143 fator regula a transcrição de genes para moléculas antioxidantes e anti-inflamatórias como a
144 hemeoxigenase-1 (HO-1), a qual converte o heme em biliverdina que apresenta efeito
145 antioxidante e em monóxido de carbono que apresenta efeito anti-inflamatório (CHOI et al.,
146 2013).

147 Ambas as radiações UVA e UVB induzem a formação de EROs e causam danos
148 cutâneos, porém a UVB causa também danos diretos ao DNA, RNA, proteínas e outros
149 componentes da célula, sendo absorvida principalmente pelo DNA dos queratinócitos, e
150 desta forma é mais relevante para a fotocarcinogênese (EMRI; HORKAY; REMENYIK,
151 2006).

152

153

154

155

156

1.3 RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA UVB

157
158

159 Após a exposição à radiação UVB, os queratinócitos iniciam a resposta inflamatória
160 por meio da expressão de uma ampla variedade de citocinas e quimiocinas, como a IL-1 β ,
161 IL-6, IL-8 e TNF- α , sendo por isso consideradas como as principais células que iniciam a
162 resposta inflamatória (BANGERT; BRUNNER; STINGL, 2011; BARKER et al., 1991). Além
163 dos queratinócitos outras células quando estimuladas pela RUV produzem citocinas, como
164 por exemplo as células de langerhans e os mastócitos (DURÁN-ANIOTZ et al., 2013).

165 Os macrófagos após exposição a UVB liberam citocinas, como a IL-10 que tem
166 como função regular negativamente a resposta imune. Além da IL-10, podemos citar
167 também a produção da citocina anti-inflamatória TGF- β que apresenta propriedade
168 regulatória e está envolvida em vários tipos de cânceres, inclusive no melanoma (DURÁN-
169 ANIOTZ et al., 2013).

170 A UVB também ativa a via de sinalização MAPK (proteínas quinases ativadas por
171 mitógenos) responsável pelo sistema de vigilância nos queratinócitos. Assim, quando o dano
172 causado pela RUV nessas células for irreparável os queratinócitos entram em apoptose para
173 eliminar o DNA danificado e este processo é proporcional ao tempo de exposição à RUV.
174 Fazem parte da família das MAPK as proteínas ERK (quinase regulada por sinal
175 extracelular), JNK (quinase c-Jun n-terminal) e p38, a quais ativam NF- κ B, NADPH oxidase
176 e AP-1 (proteína 1) (FONSECA et al., 2011; VAYALIL; ELMENTS; KATIYAR, 2003).

177 A ativação de AP-1 tem sido implicada na inflamação, metástase, angiogênese e
178 também na promoção e progressão de vários tipos de cânceres (MEERAN; PUNATHIL;
179 KATIYAR, 2008). Além disso, o aumento da atividade de AP-1 está associado a degradação
180 da matriz extracelular através do aumento da expressão e secreção de metaloproteinasas.

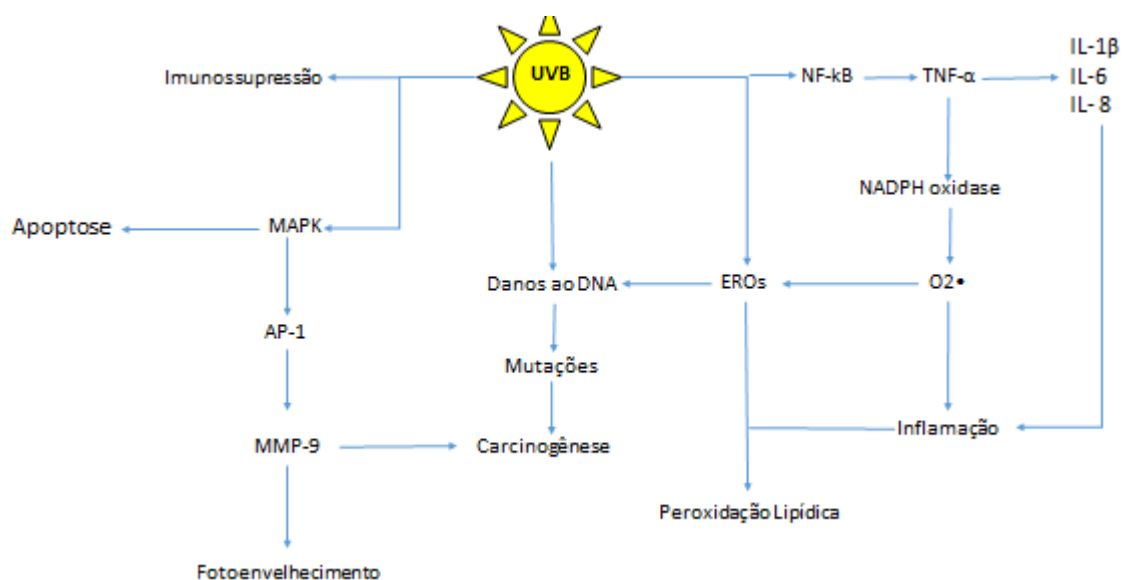
181 As metaloproteinasas são enzimas proteolíticas produzidas principalmente por
182 células polimorfonucleares, macrófagos, queratinócitos fibroblastos e células tumorais
183 (FISHER et al., 2009). O aumento da produção de metaloproteinasas pelos queratinócitos
184 epidermais e fibroblastos da derme resulta na degradação do colágeno e outras proteínas
185 da matriz extracelular. Este processo é seguido pelo fotoenvelhecimento e danos severos à
186 pele (QUAN et al., 2009b; RIEGER, 1999).

187 Em termos práticos, os efeitos da radiação UVB na pele podem ser divididos em
188 resposta imediata, com aparecimento de eritema, edema e infiltrado leucocitário, além da
189 diminuição dos níveis dos antioxidantes endógenos como a glutatona reduzida (GSH) e
190 tardios com danos às fibras elásticas, no colágeno e nas glicosaminoglicanas da matriz

191 extracelular da derme, perdendo a elasticidade, e contribuindo para o fotoenvelhecimento da
 192 pele e pôr fim à fotocarcinogênese (CARINI et al., 2000; GEORGETTI et al., 2006; MELONI;
 193 NICOLAY, 2003; MONTENEGRO et al., 1995; SAWANE et al., 2011).

194 A inflamação causada na pele pela RUV resulta em um aumento de células como
 195 neutrófilos e macrófagos, estes também produzem grandes quantidades de EROs, como o
 196 ânion superóxido (Halliday, 2005), gerado como produto NADPH oxidase. As células
 197 inflamatórias também produzem mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, as
 198 quais atuam ativando células e recrutando mais células inflamatórias para o foco primário da
 199 inflamação e induzindo produção de EROs. Portanto, o estresse oxidativo e a inflamação,
 200 induzidos pela RUV estão intimamente relacionados e levam a um círculo vicioso, que
 201 resultará em danos teciduais e em longo prazo, pode conduzir a carcinogênese (REUTER et
 202 al., 2010) (Figura 5).

203



204

205 Figura 5: Exemplificação dos efeitos da exposição à radiação UVB na pele. Após a
 206 exposição da pele um processo inflamatório é desencadeado e o estresse oxidativo
 207 instalado. Além disso a radiação UVB causa danos no DNA, degradação do tecido conectivo
 208 e alteração da função imune, fotoenvelhecimento, queda imunológica, podendo finalmente
 209 levar ao câncer de pele (Própria autora).

210

211 Dentre os efeitos tardios da exposição à radiação UVB, a fotocarcinogênese é a
 212 mais preocupante. É bem conhecido o efeito deletério da radiação UVB sobre as proteínas e
 213 membranas celulares, levando consequentemente a geração de EROs. Entretanto, sabe-se

214 que o efeito deletério principal associado à radiação UVB está relacionado à dimerização
215 das bases de pirimidina do DNA. Esta dimerização gera distorção da estrutura do DNA, e o
216 reparo incorreto dessas lesões conduz a mutações, como também ao bloqueio da replicação
217 do DNA e da divisão celular, e a interrupção da transcrição do DNA necessário para a
218 síntese de RNA mensageiro (EMRI; HORKAY; REMENYIK, 2006).

219 Considerando o contexto exposto acima, a RUV exerce múltiplos efeitos nas células
220 da pele, sendo a interação entre tais efeitos determinante na resposta gerada pela
221 exposição à radiação (WANG; KOCHVAR, 2005). Normalmente, a exposição à RUV pode
222 causar queimaduras, eritemas dolorosos, danos no DNA, degradação do tecido conectivo e
223 alteração da função imune, fotoenvelhecimento, queda imunológica, podendo finalmente
224 levar ao câncer de pele (FUCHS, 1998; LIU et al., 2006). A incidência dessas doenças de
225 pele cresce continuamente, à medida que a estimativa de vida da população aumenta e
226 maiores quantidades de RUV atingem a superfície da Terra em decorrência da destruição
227 da camada de ozônio (MEERAN; MANTENA; KATIYAR, 2006).

228

229 1.4 MEDIADORES LIPÍDICOS ANTI-INFLAMÓRIO/PRÓ-RESOLUÇÃO

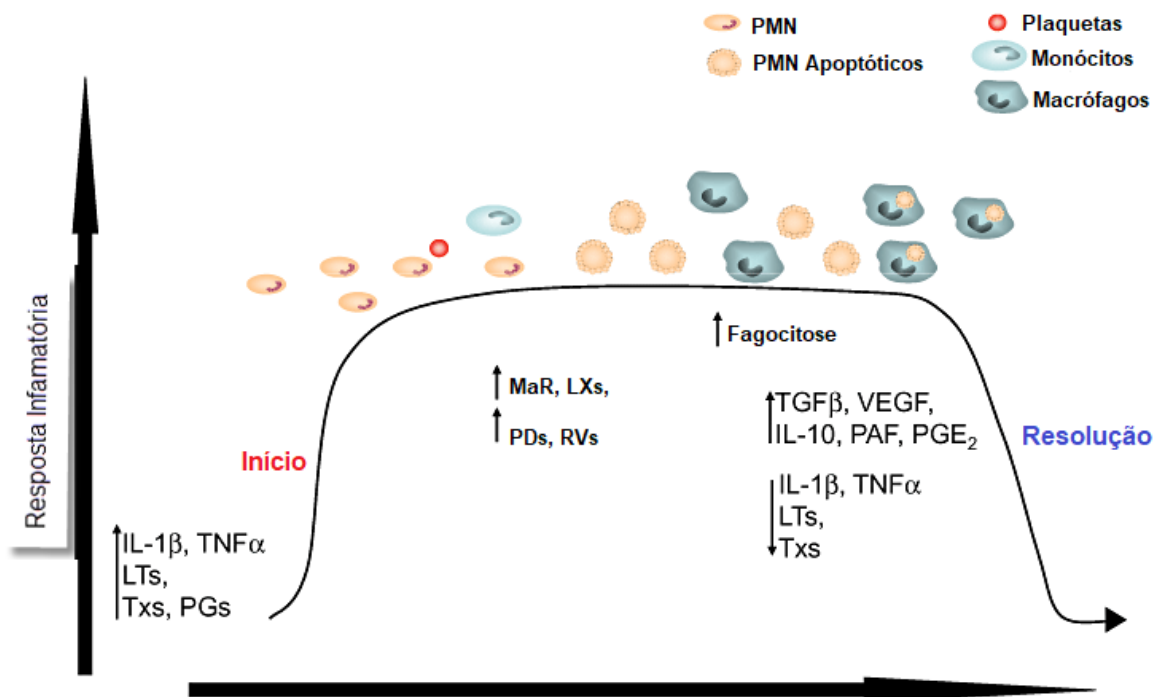
230

231 O processo inflamatório é a primeira resposta do sistema imunológico à infecção ou
232 lesão tecidual e tem como função proteger o hospedeiro. Este processo deve ser
233 "autolimitado", pois respostas inflamatórias excessivas ou inadequadas contribuem para
234 uma série de doenças humanas agudas e crônicas (CHIANG et al., 2012; SERHAN et al.,
235 2012b).

236 A resolução da inflamação é dependente da liberação e ação biológica de diversos
237 mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos. A finalidade da liberação destes mediadores
238 é restabelecer a homeostase, limitando a lesão excessiva do tecido e minimizando o
239 desenvolvimento de inflamação crônica. A falha no processo de resolução da inflamação
240 pode levar a destruição do tecido, fibrose, falência de órgãos ou evoluir para uma
241 inflamação crônica (MARTINEZ et al., 2016; SERHAN et al., 2009; SERHAN; SAVILL, 2005;
242 T; DA; DW, 2002).

243 Atualmente a resolução da inflamação é considerada um processo ativo e envolve a
244 sinalização de vias pró-resolutivas (BANDEIRA-MELO et al., 2000; BANNENBERG, 2010).
245 Na fase inicial da inflamação, os derivados dos ácidos graxos poliinsaturados (eicosanoides,
246 prostaglandinas e leucotrienos) iniciam a resposta quimiotática recrutando células para o
247 local da inflamação, esse processo é seguido pela liberação de citocinas pró-inflamatórias

248 (BORGEAT; NACCACHE, 1990). Na sequência ocorre a biossíntese de mediadores
 249 lipídicos pró-resolutivos especializados (SPMs), que tem a função de limitar o processo
 250 inflamatório e promover sua resolução (LEVY et al., 2001; SERHAN; SAVILL, 2005 (Figure
 251 6).



252

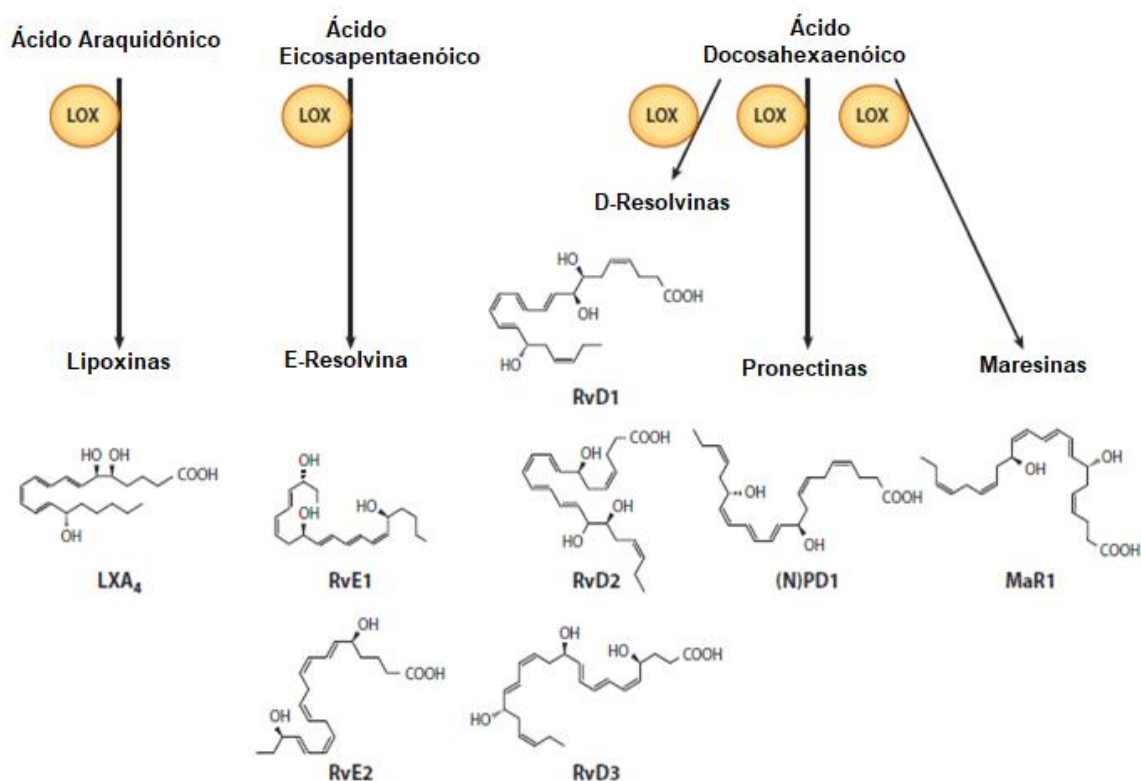
253 Figure 6: Figura adaptada de (SERHAN et al., 2007). Representação da resolução
 254 da inflamação. A fase inicial da inflamação é caracterizada pela liberação de mediadores
 255 pró-inflamatórios e acúmulo de neutrófilos, seguido por infiltração de monócitos que se
 256 diferenciam em macrófagos. Esta fase é caracterizada pela formação de mediadores anti-
 257 inflamatórios e pró-resolução (LXs, Rvs, MaRs e PDs). Esses mediadores reduzem o tráfico
 258 de neutrófilos e facilitam a remoção de células apoptóticas. Esse processo resulta na
 259 produção de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β , IL-10 e PGE $_2$, e diminuição da
 260 liberação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo IL-8, TNF- α e TXA $_2$. (IL = interleucina;

261 TNF- α = fator de necrose tumoral- α ; LTs = leucotrienos; Tx = tromboxano; PGs =
 262 prostaglandinas; LXs = lipoxinas; Rvs = resolvinas; PDs = protectinas; MaRs = maresinas;
 263 TGF- β = fator transformador de crescimento β ; VEGF = fator de crescimento endotelial
 264 vascular; PAF = fator ativador de plaquetas; PGE $_2$ = prostaglandina E $_2$).

265

266 Os SPMs são uma família de mediadores endógenos derivados dos ácidos poli-
 267 insaturados: ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido
 268 docosahexaenóico (DHA). Esses mediadores são sintetizados durante o processo de

269 resolução da inflamação e incluem 4 classes de moléculas principais: lipoxinas (Lxs),
 270 protectinas (PDs), resolvinas (Rvs) e maresinas (MaRs) (Figure 7).



271

272 Figure 7: Biossíntese de mediadores de pró-resolução especializados (SPM) a
 273 partir de ácidos graxos poliinsaturados. SPM são enzimaticamente derivados de ácidos
 274 graxos essenciais, incluindo ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico e ácido
 275 docosahexaenóico a partir da ação de lipoxigenases (LOXs). Figura adaptada de (LEVY;
 276 SERHAN, 2014).

277

278 De maneira geral, essas moléculas inibem a produção de citocinas, recrutamento
 279 de células pró-inflamatórias, aumentam o recrutamento de células anti-inflamatórias, inibem
 280 a ativação do NF-κB, inibem a expressão/atividade da NADPH oxidase e aumentam a
 281 expressão do Nrf2 e OH-1.

282

283

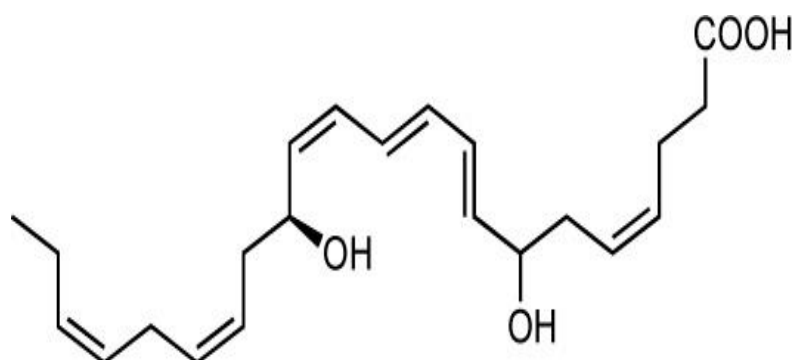
284

285

286 1.4.1 Maresina 1 (MaR1)

287

288 A MaR1 é sintetizada por macrófagos através da transformação do ácido graxo
289 docosahexaenóico (DHA), que pode ser convertido através de reação de 14-lipoxigenação
290 em intermediários do (DHA), culminando com a produção do ácido 7,14-dihidroxicosa-
291 4Z,8,10,12,16Z,19Z-hexaenóico, denominado mediador de macrófago. A estrutura molecular
292 da MaR1 apresenta duas hidroxilas livres e duas duplas ligações conjugadas (Figure 8). Os
293 macrófagos são a principal fonte de maresinas (FREDMAN; SERHAN, 2011).



294 Figure 8: Estrutura molecular Maresina 1: 7,14-dihidroxicosa-
295 4Z,8,10,12,16Z,19Z-hexaenóico.

296

297 Evidências sugerem que a função pró-resolutiva da MaR1 esteja associada a
298 interação deste mediador com receptores LGR6 (receptor 6 acoplado à proteína G)
299 (CHIANG et al., 2019). O LGR6 é conhecido por promover o reparo e a regeneração, e está
300 presente em vários tecidos, inclusive é altamente expresso na epiderme e na derme
301 (SNIPPERT et al., 2010).

302 A ação da MaR1 na resolução da inflamação e estresse oxidativo já foi
303 demonstrada por estudos que mostraram que o tratamento com MaR1 em modelo de
304 inflamação induzida por extrato de poeira resultou em menor produção de citocinas IL-6 e
305 IL-8 em células brônquicas epiteliais (NORDGREN et al., 2013). A MaR1 também reduziu a
306 inflamação em modelo de colite por ácido sulfônico 2,4,6-trinitrobenzeno (TNBS) e por
307 sulfato de dextrana sódico (DSS) por reduzir a produção de citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6 e
308 IFN γ dependendo da fase da doença) e indução de macrófagos com perfil M2 devido a
309 inibição da ativação do NF κ B (MARCON et al., 2013a), além de reduzir a inflamação
310 pulmonar induzida pelo LPS (lipopolissacarídeo), atuando pela inibição da produção de
311 citocinas como TNF α , IL-1 β , IL-6 e das quimiocinas KC, MCP-5, MIP-1 α e MIP-1 γ , este

312 efeito resulta em menor expressão de moléculas de adesão ICAM-1, P-selectina e CD24 e
313 em menor atividade de mieloperoxidase pulmonar e menor recrutamento de neutrófilos
314 (GONG et al., 2014).

315 Além disso, estudos recentes demonstraram que o pré-tratamento intraperitoneal
316 com MaR1 foi eficaz em reduzir o edema cutâneo, recrutamento de neutrófilos (MPO),
317 migração de células LysM-eGFP+, produção de citocinas pró inflamatórias, atividade de
318 metaloproteinase-9 de matriz (MMP-9), apoptose de queratinócitos, espessamento
319 epidérmico, contagem de mastócitos e degradação do colágeno da pele em camundongos
320 sem pelos expostos a radiação UVB (CEZAR et al., 2019).

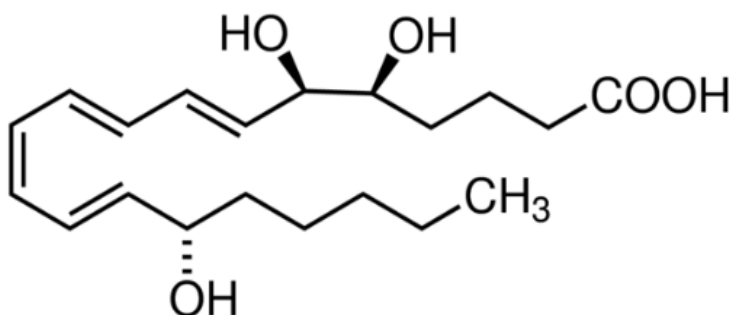
321

322 1.4.2 Lipoxina A4 (LXA4)

323

324 As lipoxinas (LXs) foram descritas pela primeira vez em 1984, após isolamento de
325 leucócitos humanos (SERHAN et al., 1984). As LXs podem ser formadas a partir do
326 metabolismo do ácido araquidônico pela ação das lipoxigenases 5 e 12 (CANNY et al.,
327 2002; GONG et al., 2014; JÓZSEF et al., 2002b). Uma segunda via de formação da LXs
328 envolve a interação de plaquetas com neutrófilos (BORGEAT; SHEPPARD, 1990).

329 Entre as LXs destacamos a LXA4, (Ácido 5S, 6R, 15S-trihidroxil-7,9,13-trans-11-cis-
330 eicosatetraenóico). A característica estrutural desse lipídio inclui: duplas conjugadas e OH
331 livre, o que confere a essa estrutura a capacidade de doar elétrons e estabilizar compostos
332 como radicais livres (Figure 9).

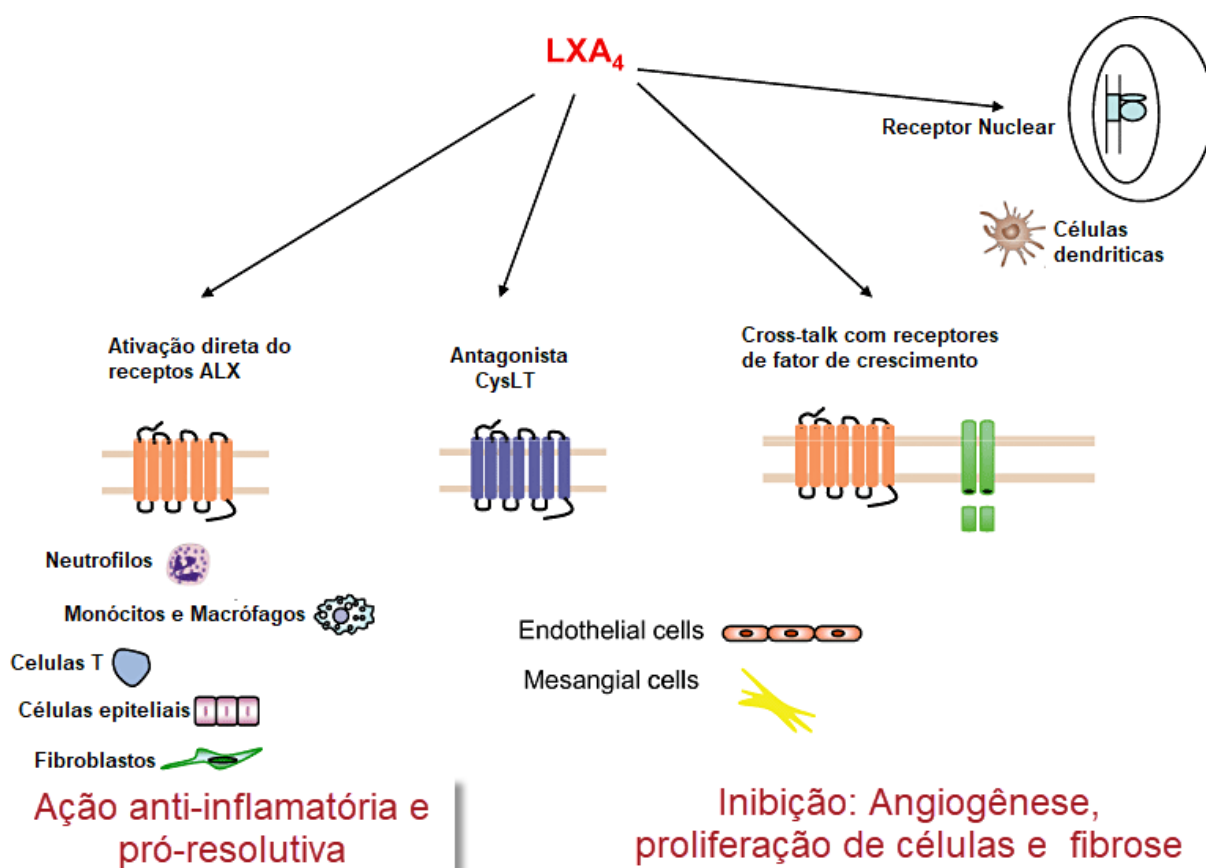


333

334 Figure 9: Estrutura molecular Lipoxina A4: Ácido 5S, 6R, 15S-trihidroxil-
335 7,9,13-trans-11-cis-eicosatetraenóico

336

337 A atividade anti-inflamatória e pró-resolutiva das LXA₄ foi correlacionada com a
 338 ativação do receptor acoplado à proteína G específico (ALX/FPR2), conhecido como um dos
 339 receptores envolvidos na resolução da inflamação. O receptor ALXR/FPR2 é expresso em
 340 uma variedade de tipos de células, em particular, monócitos, basófilos, células dendríticas e
 341 linfócitos T, o que reforça seu o papel na resposta imune-inflamatória (CORMINBOEUF;
 342 LEROY, 2015). Além disso, a LXA₄ reduz a angiogênese e a proliferação da fibrose por
 343 inibição indireta do receptor CysLT e receptores de fator de crescimento (CHIANG et al.,
 344 2006; GRONERT et al., 2001). Outro receptor potencial de LXA₄ é o receptor nuclear de
 345 hidrocarboneto arila que inibe a resposta imune inata de células dendríticas por regulação
 346 da expressão do supressor de sinalização de citocina 2 (MACHADO et al., 2006) (Figure
 347 10).



348

349 Figure 10: Figura adaptada de (MADERNA; GODSON, 2009). A ativação do
 350 receptor ALX pela LXA₄ resulta em atividades anti-inflamatórias e pró-resolução. A inibição
 351 indireta, por meio de outros receptores, como CysLT e receptores de fator de crescimento
 352 (como fator de crescimento endotelial vascular e receptores de fator de crescimento
 353 derivado de plaquetas), reduz a angiogênese e a proliferação de células e a fibrose. Outro
 354 receptor potencial de LXA₄ é o receptor nuclear de hidrocarboneto arila, que dispara a
 355 expressão do supressor de sinalização de citocina 2.

356 Estudos já demonstraram que a LXA4 reduz a inflamação pela inibição do
357 recrutamento de células inflamatórias, produção de citocinas pró-inflamatórias, função da
358 NADPH oxidase e indução da expressão de Nrf2 (CHEN et al., 2013; HAN et al., 2016; JIN
359 et al., 2012, 2014; JÓZSEF et al., 2002a; LUO et al., 2013; MIAO et al., 2015; WU et al.,
360 2015, 2012; YANG et al., 2014). Além disso, estudos recentes demonstraram que o
361 tratamento sistêmico com esse mediador reduz o processo inflamatório e os danos
362 oxidativos induzidos pela radiação UVB (MARTINEZ et al., 2018).

363

364 1.5 FOTOQUIMIOPROTETORES

365

366 A administração tópica de formulações medicamentosas tem se mostrado uma via
367 eficiente para a proteção da pele contra os efeitos nocivos da RUV. O uso de formulações
368 tópicas torna a administração medicamentosa mais segura, pois minimiza efeitos adversos
369 como metabolismos hepático, irritação gastrointestinal e toxicidade sistêmica (CAMPANINI
370 et al., 2013; CASAGRANDE et al., 2007; NICHOLS; KATIYAR, 2010). Diante disso, é
371 promissor desenvolver terapias de administração tópica para o controle da inflamação e
372 estresse oxidativo induzidos pela radiação UVB, tendo como alvo seus mecanismos
373 fisiopatológicos.

374 Estas terapias podem ser consolidadas baseando-se na redução ou resolução da
375 inflamação tratando o processo desencadeado pela radiação UVB com mediadores lipídicos
376 pró-resolução especializados como a MaR1 e a LXA4.

377 Apesar de pesquisas a respeito da possível aplicação terapêutica destes lipídios, a
378 investigação dos efeitos terapêuticos tópicos *in vivo* em danos fotooxidativos cutâneos ainda
379 não foram avaliados. Assim, o estudo da aplicabilidade de formulações topicas contendo
380 MaR1 ou LPXA4 na fotoquimioprevenção é de grande relevância clínica e carece ainda de
381 investigação científica aprofundada. Em adição, emulsões demonstraram eficácia na
382 veiculação de antioxidantes exógenos (CASAGRANDE et al., 2006, CAMPANINI et al.,
383 2013; MARTINEZ et al 2016) e a adição dos lipídios MaR1 ou LXA4 pode gerar produto
384 tópico de alta eficiência, tendo em vista a necessidade de suplementação da pele com
385 antioxidantes exógenos na prevenção e na terapia dos danos fotooxidativos causados pela
386 RUV.

387

388

389 **2 OBJETIVOS**

390 2.1 OBJETIVO GERAL

391

392 Avaliar o potencial terapêutico de formulações tópicas contendo MaR1 ou LXA4 na
393 inflamação e estresse oxidativo induzidas pela radiação UVB em camundongos sem pelo.

394

395 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

396

397 Avaliar o efeito protetor dos lipídios MaR1 e LXA4 quando administrado topicamente
398 (incorporados em creme e gel creme, respectivamente) em camundongos sem pelo, no
399 modelo de lesão cutânea induzida pela radiação UVB com enfoque na (o):

- 400 • Edema de pele;
- 401 • Infiltrado leucocitário (ensaio da mieloperoxidase);
- 402 • Atividade/secreção de metaloproteinase-9;
- 403 • Capacidade antioxidante global cutânea por meio do ensaio de FRAP (poder
404 antioxidante de redução férrica);
- 405 • Níveis dos antioxidantes endógenos GSH e catalase;
- 406 • Produção de ânion superóxido;
- 407 • Produção de hidroperóxidos lipídicos;
- 408 • Avaliação histopatológica pelas colorações de hematoxilina eosina (H & E), azul
409 toluidina e tricrômico de masson.

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422 3 MÉTODOS

423

424 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

425

426 Foram utilizados camundongos sem pelo da linhagem HRS/J, de ambos os sexos,
427 adultos e com peso de 20 a 30 g. Os camundongos foram mantidos no Biotério do Centro de
428 Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina com temperatura controlada de
429 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração. Os experimentos
430 foram realizados conforme as normas da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da
431 Universidade Estadual de Londrina (registrado no Ofício Circular CEUA nº017/2015,
432 processo CEUA nº 1447.2015.10).

433

434 3.2 SISTEMA E FONTE DE RADIAÇÃO UVB

435

436 A fonte de luz utilizada nos experimentos para indução de estresse oxidativo e
437 processo inflamatório agudo nos camundongos foi uma lâmpada UVB fluorescente modelo
438 PHILIPS TL/12 40W RS (MEDICAL-HOLANDA). A lâmpada emite radiação na faixa de 270
439 a 400nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm. A dose de radiação utilizada
440 para indução da inflamação e do estresse oxidativo foi de $4,14 \text{ J/cm}^2$ (CAMPANINI et al.,
441 2013). A lâmpada foi instalada em uma caixa retangular de madeira com capacidade para 6
442 caixas de polipropileno padrão de $30 \times 19,5 \times 13 \text{ cm}$, desenvolvida especificamente para
443 esse fim. Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente e sobre eles foi colocada uma
444 tela que garante a exposição total do dorso dos animais a luz RUV. Durante toda a
445 irradiação foi realizado o rodízio das caixas para assegurar igual dose de irradiação nos
446 animais, pois pode ocorrer variações de emissão de luz ao longo da lâmpada.

447

448 3.3 PREPARO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES TÓPICAS

449

450 As formulações tópicas foram preparadas sem a adição dos lipídios. Posteriormente
451 foram divididas em duas porções, sendo uma reservada para controle (sem a adição do
452 fármaco) e a outra acrescida dos lipídios MaR1 ou LXA4.

453

454

455

456

457

458 3.3.1 Formulação creme (1) contendo ou não MaR1
459

Componentes	p/p (%)	p/p (%)
Polawax^{®1} (agente de consistência com emulsificante)	10	10
Triglicerídeo caprílico/cáprico (emoliente)	5	5
Propilenoglicol (umectante)	6	6
Phenonip^{®2} (conservante)	0,4	0,4
Água deionizada (qsp)*	100	100
MaR1 (fármaco)	1 ng/g formulação	-

460 ¹Polawax[®]: Base auto emulsionante não-iônica (álcool cetosteárilico + monoestearato de
461 sorbitol polioxietileno 20 0E);
462 ²Phenonip: mistura de parabenos e fenoxietanol;
463 *Quantidade suficiente para preparação.

464 Tabela 1: Formulação creme contendo ou não MaR1

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475 3.3.2 Formulação Gel-Creme (2) Contendo ou Não LXA4
476

Componentes	p/p (%)	p/p (%)
Polawax^{®1} (agente de consistência com emulsificante)	2	2
Aristoflex^{®2} (dispersão 5%) (colóide hidrofílico)	20	20
Triglicerídeo caprílico/cáprico (emoliente)	5	5
Propilenoglicol (umectante)	6	6
Phenonip^{®3} (conservante)	0,4	0,4
Água deionizada (qsp)*	100	100
LXA4 (fármaco)	20 ng/g formulação	-

477 ¹Polawax[®]: Base auto emulsionante não-iônica (álcool cetoestearílico + monoestearato de
478 sorbitol polioxietileno 20 0E);

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

481 ³Phenonip: mistura de parabenos e fenoxietanol;

482 *Quantidade suficiente para preparação.

483 Tabela 2: Formulação gel-creme contendo ou não LXA4

484

485

486 3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA APLICAÇÃO TÓPICA DAS FORMULAÇÕES CONTENDO 487 MAR1 OU LXA4

488

489 Os camundongos foram distribuídos em seis grupos com seis animais cada:

- 490 • Grupo 1: controle não irradiado e não tratado;
- 491 • Grupo 2: controle irradiado e não tratado;
- 492 • Grupo 3: controle irradiado e tratado com a formulação 1;
- 493 • Grupo 4: controle irradiado e tratado com a formulação 2;
- 494 • Grupo 5: irradiado e tratado topicamente com formulação 1 contendo MaR1
- 495 • Grupo 6: irradiado e tratado topicamente com formulação 2 contendo de LXA4;

496 Os camundongos foram tratados topicamente com 0,5 g de formulação que
497 continha 0,5 ng de MaR1 ou 10 ng de LXA4 1 hora e 10 minutos antes do início da sessão

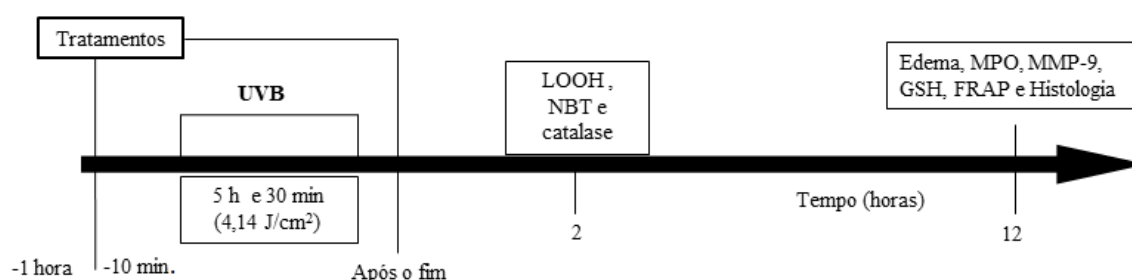
498 de irradiação UVB e logo após o fim para atingir as doses totais de 1,5 ng/animal e 30
499 ng/animal de MaR1 e LXA4, respectivamente (Figure 11).

500 As doses de MaR1 e LXA4 foram escolhidas com base em estudos previamente
501 publicados (CEZAR et al., 2019; MARTINEZ et al., 2018; SAITO et al., 2018a). Doze horas
502 após o final da irradiação os animais foram eutanasiados e as amostras de pele foram
503 coletadas para os seguintes ensaios: edema, atividade de mieloperoxidase, avaliação de
504 FRAP; níveis de GSH, atividade de metaloproteinase (MMP-9), capacidade em reduzir
505 apoptose dos queratinócitos, capacidade em reduzir o espessamento da epiderme, número
506 de mastócitos e degradação das fibras de colágeno. O segundo tempo de irradiação foi
507 realizado com a mesma quantidade de animais e mesmo esquema de tratamentos, com a
508 eutanásia ocorrendo 2 horas após o final da irradiação e a pele coletada foi utilizada para os
509 seguintes ensaios: produção de ânion superóxido, atividade da catalase e produção de
510 hidroperóxido lipídico (LOOH).

511 As amostras foram divididas para os diferentes testes e armazenadas a -80°C para
512 as análises com exceção das amostras para histologia. O teste de edema cutâneo foi
513 realizado no mesmo dia em que a pele foi retirada.

514 Os animais foram terminalmente anestesiados com 5% de isoflurano após 12h do
515 término da irradiação. Para os ensaios de 2 horas os animais foram anestesiados com
516 isoflurano 5% seguidos de decapitação após o término da radiação UVB ($4,14 \text{ J/cm}^2$). As
517 peles foram lavadas com solução de NaCl 145 mM (CASAGRANDE et al., 2006; IVAN et al.,
518 2014a).

519



520

521 Figure 11. Fluxograma dos tempos de tratamento com os protocolos experimentais
522 para avaliação da eficácia da MaR1 e da LXA4 administradas topicamente. Os animais
523 foram irradiados com radiação UVB durante 5 horas e 30 min (tempo necessário para atingir

524 4,14 J/cm²). Os animais foram tratados três vezes: 1 hora e 10 minutos antes de iniciar a
525 sessão de irradiação e logo após o fim, com MaR1 (1,5 ng/animal) e LXA4 (30 ng/animal).
526 Os animais foram eutanasiados e amostras de pele foram coletadas 2 horas (produção do
527 ânion superóxido [NBT], atividade da catalase e produção de hidroperóxido lipídico (LOOH))
528 e 12 horas (avaliação do teste de edema, atividade de metaloproteinase-9 [MMP-9],
529 atividade de mieloperoxidase [MPO], níveis de glutathiona reduzida [GSH], avaliação do
530 poder antioxidante redutor de ferro [FRAP] e análise histopatológica) após o fim da radiação
531 UVB.

532

533 3.4.1 Avaliação do Edema de Pele

534

535 A exposição em demasia da radiação UVB sobre a pele pode causar expressiva
536 reação inflamatória levando, entre outras consequências, ao edema (MARTINEZ et al.,
537 2015c). As amostras de pele do dorso de cada animal foram coletadas com auxílio de um
538 molde com área fixa de 5 mm de diâmetro e posteriormente foram pesadas (BOLLER et al.,
539 2010; IVAN et al., 2014a; MARTINEZ et al., 2015c). O efeito dos tratamentos no edema
540 cutâneo causado pela radiação UVB foi mensurado pelo aumento do peso de pele na região
541 dorsal. A análise foi feita comparando-se o peso de pele entre os diferentes grupos. Os
542 resultados foram expressos em mg de pele.

543

544 3.4.2 Avaliação da Atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO)

545

546 Os grânulos azurófilos dos neutrófilos contêm a enzima mieloperoxidase (MPO),
547 que, na presença de sais como o íon cloreto, convertem o peróxido de hidrogênio a
548 hipoclorito. Para o estudo da quantificação de MPO foi adicionado no meio reacional o
549 substrato o-dianisidina, o que resultou em uma solução colorida que foi analisada pelo
550 espectrofotômetro em 540 nm (BRADLEY et al., 1982; CASAGRANDE et al., 2006;
551 MARTINEZ et al., 2015a).

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

558 Em microplaca de 96 poços, foi adicionado alíquota do sobrenadante das
559 amostras (30 µL). A reação colorimétrica iniciou-se pela adição de 200 µL de uma solução
560 contendo 10% de tampão fosfato 0,05 M (pH 6,0), 0,0167 % de *o*-dianisidina e 0,05% de
561 H₂O₂ em água deionizada. Após 20 minutos de reação a atividade da MPO das amostras foi
562 determinada em 450 nm (Asys Expert Plus, Biochrom) e comparada com uma curva padrão
563 de neutrófilos de concentração conhecida.

564 A curva padrão foi preparada na mesma placa com a adição de 100 µL de tampão
565 fosfato 0,05 M e uma solução contendo 200.000 neutrófilos no primeiro poço (A1) com
566 posterior diluição seriada até o décimo primeiro poço (A11). O décimo segundo poço (A12)
567 foi utilizado como branco ao qual foi adicionado apenas 200 µL de água deionizada. Os
568 resultados foram expressos como atividade da MPO (número de neutrófilos/mg de pele)
569 (CASAGRANDE et al., 2006).

570

571 3.4.3 Determinação da Atividade/Secreção de Proteinases por Zimografia em Gel de 572 Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

573

574 Para determinação da atividade da MMP-9 foi utilizado o ensaio de zimografia em
575 gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (FONSECA et al., 2010). As
576 metaloproteinases são enzimas importantes em degradar as matrizes extracelulares como o
577 colágeno e podem contribuir para o fotoenvelhecimento cutâneo (BAE et al., 2015; LIMA et
578 al., 2016).

579 Preparou-se um pool das amostras de pele de cada grupo e as mesmas foram
580 armazenadas em eppendorfs. As amostras foram homogeneizadas com auxílio do
581 homogeneizador de tecidos Ultra Turrax® (T18 basic, IKA), na proporção 1:4 em tampão
582 fosfato Tris/HCl 50mM (pH 7,4) com cloreto de cálcio (CaCl₂) e 1% de inibidores de
583 proteinases (fenantrolina, fluoreto de fenilmetilsulfonila e N-etilmaleimida).

584 Os homogenatos foram centrifugados duas vezes a 12.000 g por 10 min a 4°C e os
585 sobrenadantes foram submetidos ao ensaio de zimografia. Também foi realizada dosagem
586 de proteínas das amostras pelo método de Lowry 1951. Alíquota de 50 µL do sobrenadante
587 foi diluída em 10 µL de tampão Tris/HCl (pH 6,8) contendo 20% de glicerol, 4% de dodecil
588 sulfato de sódio (SDS) e 0,001% de azul de bromofenol. Em seguida estas amostras foram
589 colocadas em banho-maria a 37 °C durante 8 minutos imediatamente antes de ser aplicada
590 no gel de eletroforese.

591 O interior da cuba de eletroforese foi preenchido com tampão Tris/glicina 190 mM
592 (pH 8,3) contendo 0,1% de SDS. Antes da aplicação das amostras, o gel foi submetido a
593 uma pré-corrída de 10 mA por 15 minutos. Após, foram aplicados 25 µL de cada amostra.
594 Durante a eletroforese a corrente aplicada foi de 10 mA para o gel de concentração e 13 mA
595 para o gel de separação, sendo que a última corrente foi mantida constante por 15 minutos
596 após a saída do corante do gel de separação.

597 Ao término da eletroforese o gel de poliacrilamida foi lavado por 1 hora com solução
598 de Triton X-100 2% sob constante agitação, posteriormente o gel foi incubado por 16 horas
599 a 37 °C em tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7,4) contendo CaCl₂ 10 mM e 0,02% de azida
600 sódica. Ao final da incubação o gel foi corado com uma solução contendo 0,25% de azul
601 brilhante, 10% de ácido acético e 50% de metanol em água deionizada. Para visualização
602 das bandas o gel foi descorado com ácido acético 20% (FONSECA et al., 2011). A atividade
603 proteolítica foi analisada por meio da comparação das diferenças de densidades de cor
604 entre as bandas de cada grupo pelo programa ImageJ® (NIH, Bethesda, MD, EUA).

605

606 3.4.4 Avaliação do Poder Antioxidante Redutor do Ferro (FRAP) na Pele

607

608 O método de FRAP já foi utilizado para medir o poder redutor do ferro nos tecidos
609 do coração, rim, fígado e cérebro de ratos (KATALINIC et al., 2005a). O ensaio foi adaptado
610 e utilizado para avaliar o poder antioxidante de redução férrica da pele (MARTINEZ et al.,
611 2015c).

612 As amostras de pele dos animais (aproximadamente 30 mg) dos diferentes grupos
613 foram coletadas em microtubos contendo 400 µL de KCl 1,15%. Para a realização do
614 ensaio, as amostras foram trituradas com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-
615 Tearor (Biospec®). Em seguida, foram centrifugadas a 1.000 g por 10 minutos a 4°C e o
616 sobrenadante foi retirado para a análise. Para a reação, foram adicionados em microplaca
617 contendo 96 poços, 30 µL do sobrenadante e 150 µL de reagente FRAP. O branco foi
618 preparado com 30 µL de KCl a 1,15% e 150 µL do reagente de FRAP. O reagente de FRAP
619 foi preparado adicionando 2,5 mL de uma solução 10 mM de 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ)
620 em HCl 40 mM com 2,5 mL de cloreto de ferro hexahidratado 20mM e 25 mL de tampão
621 acetato 0,3 mM (pH 3,6), e esta solução foi incubada a 37°C por 30 min antes do uso. A
622 microplaca foi lida em espectrofotômetro a 595 nm (EnSpire, Perkin Elmer). Foi realizada o
623 preparo de uma curva padrão utilizando-se diferentes concentrações de trolox (antioxidante
624 análogo solúvel da vitamina E) de 0,5 a 20 nmol. Os resultados foram expressos como nmol
625 equivalente de Trolox/mg de pele (KATALINIC et al., 2005b).

626 3.4.5 Avaliação dos Níveis do Antioxidante Endógeno (GSH)

627

628 A enzima glutationa é importante na homeostasia da pele por eliminar os radicais
629 livres que foram produzidos durante a exposição à radiação RUV. O ensaio baseia-se na
630 reação da quebra da ligação do ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) pelo grupo
631 sulfidril da glutationa, para tal, é detectado a quantidade do ácido 5-mercapto-2-
632 nitrobenzóico (SRINIVASAN; SABITHA; SHYAMALADEVI, 2007).

633 As amostras de pele dos animais foram coletadas em microtubos e posteriormente
634 diluídas (1:4) em EDTA 0,02 M e trituradas em homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor
635 (Biospec®). Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 50%, com o intuito de
636 precipitar as proteínas do meio reacional, na proporção de 1:0,2 de EDTA e TCA,
637 respectivamente. A mistura foi centrifugada a 2.700 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante
638 foi recentrifugado a 2.700 g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante final foi retirado para
639 análise.

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

647

648 3.4.6 Avaliação da Atividade da Catalase (CAT)

649

650 A CAT é uma heme enzima responsável por reduzir o peróxido de hidrogênio em
651 água e oxigênio. O nível dessa enzima se reduz quando há estresse oxidativo, indicando um
652 possível desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a ação antioxidante endógena
653 (SHETTY et al., 2015b).

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

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

669

670 3.4.7 Avaliação da Produção de Ânion Superóxido (O₂⁻)

671

672 O ânion superóxido é um íon produzido endogenamente durante o processo de
673 respiração celular aeróbia. No entanto, na exposição acentuada a radiação UVB pode
674 apresentar aumento da sua quantidade e conseqüentemente ativa a enzima superóxido
675 dismutase, a qual converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, favorecendo a
676 geração de outro radical que é prejudicial para a manutenção da homeostasia da célula
677 (Cha et al. 2014; Martinez et al. 2015).

678 A produção de ânion superóxido foi realizada usando o ensaio de redução de
679 nitroblue tetrazolium (NBT) (Campanini *et al.*, 2013). As amostras de pele dos animais
680 (aproximadamente 100mg) foram coletadas em microtubos, homogeneizadas em 500 µL de
681 EDTA 0,02 M com homogeneizador de tecidos (Tissue-Tearor (Biospec[®]) centrifugadas a
682 2000 g por 20 segundos e o sobrenadante foi retirado para a análise.

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

691

692 3.4.8 Avaliação da Produção de Hidroperóxido (LOOH)

693
694 O composto tert-butil hidroperóxido é um potente formador de radicais peroxil.
695 Nas membranas biológicas, estes radicais atacam os lipídeos gerando lipoperóxidos que
696 podem reagir com outros lipídeos, oxidando-os. Desta forma, o tert-butil inicia uma
697 reação de lipoperoxidação em cadeia com outros lipídeos que pode ser detectada
698 através da emissão de fótons ocorrida durante a formação dos lipoperóxidos.

699 A avaliação da formação de LOOH por quimiluminescência (QL) foi realizada em
700 uma adaptação da técnica descrita por Flecha et al. 1991 (GONZALEZ FLECHA; LLESUY;
701 BOVERIS, 1991; MARTINEZ et al., 2015a, 2015d). As amostras de pele dos animais
702 (aproximadamente 100 mg) foram coletadas em microtubos e homogeneizadas em 800 µL
703 de tampão fosfato (pH 7,4) com homogeneizador de tecidos (Tissue-Tearor (Biospec®). Em
704 seguida, foram centrifugadas a 1000 rpm por 2 minutos a 4 °C e 70 µL do sobrenadante
705 foram adicionados a 420 µL de meio de reação tampão fosfato pH 7,4 20 mM) e 10 µL de
706 tert-butil hidroperóxido e 10 µL de Luminol. Todo o experimento foi realizado ao abrigo da
707 luz para evitar a fosforescência dos frascos, a 30 °C, durante 120 minutos. Os resultados
708 foram medidos em contagem por minuto (cpm) por mg de pele.

709

710 3.4.9 Avaliação Histopatológica por Microscopia Óptica

711

712 Para análise histopatológica da pele, as amostras foram coletadas fixadas em
713 paraformaldeído a 4% e desidratadas em banhos de soluções de etanol com concentrações
714 crescentes (70%, 95% e 100%) e diafanizadas com xilol para inclusão de parafina.

715 Secções de 5 µm de amostras de pele foram preparadas e coradas com
716 hematoxilina eosina (H & E). As secções coradas com H & E foram examinadas utilizando
717 microscopia óptica a uma ampliação de 400 vezes (objetiva de 40) para determinação da
718 espessura epidérmica (Deng *et al.*, 2015) e uma amplificação de 1000 vezes (objetiva de
719 100) número de células apoptóticas (SCHWARZ et al., 1995).

720 Além disso, secções dos tecidos também foram coradas com o azul de toluidina
721 para determinação de mastócitos e foram observados por microscopia óptica com o
722 aumento de 400 vezes (objetiva de 40) (Mouret et al., 2015). As análises foram feitas com o
723 Infinity Analyze (Lumenera® Software). Por fim, secções dos tecidos foram coradas com
724 tricrômico de masson e examinadas utilizando microscopia óptica a uma ampliação de 100
725 vezes (objetiva de 10) para visualizar alterações nas fibras de colágeno através da análise

726 da intensidade da coloração azul nas áreas dérmicas da pele exposta a radiação UVB com
727 auxílio do software Image J (NIH) (SONG et al., 2016).

728

729 3.4.10 Análise Estatística dos Resultados

730

731 Todos os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância
732 (ANOVA) com um fator seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey e
733 apresentados pela média \pm erro padrão da média (EPM) de mensurações feitas com 6
734 animais em cada grupo por experimento. As análises foram realizadas usando-se o software
735 GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram
736 representativos de dois experimentos distintos e foram considerados significativamente
737 diferentes para $p < 0,05$.

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753 **4 RESULTADO e DISCUSSÃO - ARTIGO**

754

755 4.1 THERAPEUTIC POTENTIAL OF TOPICAL FORMULATION CONTAINING MARESIN 1 IN
756 INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS INDUCED BY UVB RADIATION

757

758 ^a Talita L. C. Cezar, ^a Renata M. Martinez, ^a David L. Vale, ^a Ingrid C. Pinto, ^a Priscila Saito, ^a
759 Camila Arriero, ^a Sandra R. Georgetti, ^a Marcela M. Baracat, ^b Waldiceu A. Verri Jr, ^{*a} Rúbia
760 Casagrande

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

763 ^bDepartamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade
764 Estadual de Londrina-UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 80, PR445, Cx. Postal 10.011,
765 86057-970, Londrina, Brazil

766 ^{*}Corresponding author. Adress: Avenida Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86039-440
767 Londrina, Paraná, Brazil. Tel.: +55 43 33712475. E-mail address: rubiaca@yaho.com.br
768 (R. Casagrande).

769

770

771

772

773

774

775

776

777 **ABSTRACT**

778 Acute UVB exposure promotes skin inflammation, oxidative stress and molecular damage.
779 Long-term exposure to UVB irradiation may lead to carcinogenesis. Our organism has
780 endogenous mechanisms to actively limit inflammation. Maresin 1 (MaR1; 7R,14S-dihydroxy-
781 docosa-4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z- hexaenoic acid) is a pro-resolution lipid mediator derived
782 from the docosahexaenoic acid, which has already demonstrated anti-inflammatory and pro-
783 resolution effects due to the damage caused by UVB radiation. However, it remains to be
784 determined if topical formulation containing MaR1 treatment can inhibit inflammatory and
785 oxidative alterations in the skin triggered by UVB. The treatment with topical formulation
786 containing MaR1 (1.5 ng/mice relative to the UVB irradiation protocol) reduced UVB-induced
787 skin edema, neutrophil recruitment (MPO; myeloperoxidase activity), matrix
788 metalloproteinase-9 activity, keratinocyte apoptosis, epidermal thickening, mast cells counts
789 and degradation of skin collagen in hairless mice. UVB irradiation caused a decrease of GSH
790 (reduced glutathione) levels, activity of the enzyme catalase, ferric reducing ability (FRAP),
791 as well as induced lipid hydroperoxide and superoxide anion production. These parameters
792 that indicate oxidative stress were inhibited by MaR1 containing topical formulation treatment.
793 These findings suggest that topical formulation containing MaR1 can be used in the
794 development of skin care products to prevent UVB-induced skin damage.

795

796

797

798

799

800

801

802 **Introduction**

803 The skin, as the outermost organ, is a physical barrier between the organism and the
804 environmental deleterious factors such as ultraviolet radiation (UVR). Excessive exposure to
805 UVR deplete endogenous antioxidants, making the skin susceptible to the deleterious
806 actions of reactive oxygen species (ROS) causing premature aging and increasing the risk of
807 dermatological diseases, such as skin cancer [1]–[4].

808 UVR can be divided into UVA (320 to 400 nm), UVB (290 to 320 nm) and UVC (200 to 290
809 nm). UVR that reaches the earth's surface is made of UVA (95%) and UVB (5%) [5]. Both
810 UVA and UVB radiation induce the formation of photoproducts and cause damage to the
811 skin, however UVB is considered the most harmful to human skin, as its activates the release
812 of inflammatory mediators, in addition to causing direct damage to DNA, RNA, proteins and
813 other cellular components the skin [5]–[9] .

814 Maresin 1 (MaR1; 7R,14S-dihydroxy-docosa-4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z-hexaenoic acid) is a
815 pro-inflammatory degradation product derived from docosahexaenoic acid (DHA) and is
816 synthesized by macrophages, and MaR1 is the earliest chemical isomer of maresinan anti-
817 inflammatory and pro-resolution lipid mediator generated endogenously by macrophage
818 enzymes [10]–[14].

819 Studies have already demonstrated treatment with MaR1 inhibit the nuclear factor κ B (NF κ B)
820 and stimulat the change from macrophages to phenotype anti-inflammatory M2 [15] besides
821 inhibiting neutrophil adhesion and decreasing the levels of pro-inflammatory cytokines in
822 lipopolysaccharide (LPS)-induced lung injury in mice [16].

823 MaR1 also reduced monocyte adhesion and TNF- α induced production of ROS and
824 inflammatory mediators in vascular smooth muscle and endothelial cells [17]. In addition to
825 these anti-infammatory and pro-resolution efects, MaR1 also acts as an analgesic by
826 inhibiting transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1)-induced
827 neuronal currents and reducing chemotherapy-induced neuropathic pain [18]. Other

828 evidence suggests MaR1 block protein kinase (PKC) and PKC activitie by reducing bronchial
829 epithelial cell production of interleukin (IL)-6 and IL-8 in model of dust extract-induced allergic
830 inflammation [19]. We have recently demonstraded that sistemic treatment with MaR1 been
831 shown to reduce inflammation and oxidative stress caused by UVB by in hairless mice [20].

832 These results reinforce the beneficial potential of this mediator in the treatment of cutaneous
833 inflammations and improvement of the cutaneous antioxidant system.

834 A recommended measure to prevent skin damage caused by UVR is the use of topical
835 formulations that contain antioxidant and anti-inflammatory agents [21]–[23]. In this context,
836 the development of drug formulations for topical use is a promising strategy to reduce the
837 harmful effects generated by sun exposure.

838 Thus, in this study we have investigated the topical therapeutic effect of MaR1 embedded in
839 emulsion on UVB irradiation-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice.

840 **Material and Method**

841 **Drugs and reagents:** Reagents from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) were GSH
842 (reduced glutathione), brilliant blue R, DTNB (5,5'- dithiobis[2-nitrobenzoic acid]), N-
843 ethylmaleimide, HTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide), o-dianisidine
844 dihydrochloride, TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine), NBT (nitroblue tetrazolium), DMSO
845 (dimethylsulfoxide) and bisacrylamide. Reagent from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA,
846 USA) was Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards
847 #1610375. Reagent from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA) was MaR1
848 (maresin 1; 7R,14S-dihydroxy-docosa4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z-hexaenoic acid). Reagent
849 from Acros (Pittsburgh, PA, USA) was tert-butyl hydroperoxide. Reagents from Amresco
850 (Solon, OH, USA) were Tris and xylene cyanol. Reagents from Termo Fisher Scientific
851 (Waltham, MA, USA) were sodium dodecyl sulfate (SDS) (Superscrip III) and acrylamide. All
852 other reagents used were from pharmaceutical grade.

853 **Animals:** The experiments were performed in hairless mice (HRS/J) weighing 20–30 g, sex
854 matched and obtained from the Londrina State University (UEL), Paraná, Brazil. with regular
855 shaving bedding and free access to water and food, with light/dark cycle of 12/12h. The
856 Ethics Committee for Animal Use (CEUA/UEL, process number 1447.2015.10) approved all
857 procedures of this study. All methods were performed in accordance with the relevant
858 guidelines and regulations. All efforts were made in order to minimize the number of animals
859 used and their suffering. Euthanasia at the end of experiments involved the sequential
860 procedures of anesthesia with isofurane 5% (Abbott Park, IL, USA), terminal killing by
861 cervical dislocation and decapitation. Euthanasia was always performed during the light
862 cycle. The mice were continuously monitored regarding welfare-related assessment before,
863 during and after the experiments.

864 **Formulation:** The formulation was prepared using the excipients shown in Table 1. Self-
865 emulsifying agent was Polawax®. Caprylic/capric triglyceride was used as the emollient and
866 propylene glycol as moisturizer. Phenonip was used as the preservative and deionized water
867 was used for the preparation of all formulation. MAR1 added to the formulation at room
868 temperature. Control formulations did not contain MaR1.

869

870

871

872

873

874

875

876

877 *Table 1: Percent composition (weight/weight) of formulation components*

878

Components	weight/weight (%)
Polawax ^{®a}	10
Caprylic/capric triglyceride	5
Propylene glycol	6
Phenonip	0.4
Deionized water (qsp)*	100
MaR1	1 ng/g formulation

879 *Quantity sufficient for preparation

880 ^aSelf-emulsifying wax (Cetostearyl alcohol and polyoxyethylene derived from a fatty acid
881 ester of sorbitan 20 0E);

882 **General experimental procedures:** Hairless mice were randomly designed to groups with 6
883 mice each as follows: non-irradiated control, irradiated control, irradiated and treated with
884 formulation without MaR1, irradiated and treated with the formulation containing MaR1. Mice
885 received topical treatment on the dorsal surface with 0.5 g of the formulation, 1 h, 10 min
886 before, and at the end of the irradiation session.

887 **Irradiation protocol:** UVB lamp (Philips TL/12 RS 40W, Medical-Holand) emits light
888 between 270 and 400 nm, peaking at 313 nm, and placed on the top of the irradiation
889 chamber and positioned 20 cm above the mice. This distance results in an irradiation of
890 0.209 mW/cm². The radiation dose for induction of inflammation and oxidative stress was
891 4.14 J/cm², [22], [24]–[26]. Dorsal skin samples were collected in specific time points after
892 the UVB exposure (12 h for edema, MPO activity, MMP-9 activity, FRAP and GSH assays
893 and histology. Moreover, 2 h for catalase, NBT assays and for evaluation of production
894 hydroperoxides) based on previous standardization protocols and stored at –80°C until
895 analysis [21], [22], [24], [25]. The samples collected by verification of cutaneous edema were
896 weighed immediately after collecting and by histology were fixed in buffered formaldehyde.

897 **Skin edema:** Dorsal skin biopsy was carefully removed from euthanized mice and weighed
898 using a precision scale. All samples presented a constant diameter of 5 mm. Results are
899 expressed in mg of skin tissue obtained from the weight of each sample [24], [27].

900 **MPO activity assay:** MPO colorimetric assay was used to determine neutrophil migration to
901 the skin [27], [28]. Reading was performed at 450 nm. A standard curve of neutrophils was
902 used to compare the results, which are presented as MPO activity (number of neutrophils x
903 10^4 per mg of skin).

904 **Histopathological analysis:** Skin samples were fixed in buffered formaldehyde, embedded
905 in parafn, sectioned (5 mm), and stained with Masson's trichrome stain for collagen fiber
906 analysis. Collagen fiber intensity bundles shown in blue were analyzed by ImageJ Program
907 as described previously [24]. Tissue sections were also stained with hematoxylin and eosin
908 (H&E), and images were analyzed for epidermal thickness and apoptotic cells [29]. Toluidine
909 blue staining was also used to determine mast cells count [30]. Histopathological scores are
910 presented together with the representative images quantifying the alterations detected
911 between the groups (Original magnification: sunburn cells 100x, Epidermal thickening 40 x
912 and mast cells counts 40x).

913 **Matrix metalloproteinase (MMP)-9 activity measurement:** SDS-PAGE (sodium dodecyl
914 sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) substrate-embedded enzymography was
915 performed as described previously [24]. After electrophoresis, the gels were incubated with
916 2.5% Triton X-100 (1h), with 0.05 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.01 M CaCl_2 (overnight, 37 °C), and
917 stained with Brilliant blue R. The zone of enzyme activity was analyzed by comparing the
918 groups in the ImageJ Program, after destaining in 20% acetic acid (NIH, Bethesda, MD,
919 USA).

920 **Total antioxidant capacity - FRAP assay:** Skin samples were dissected, homogenized into
921 ice-cold bufer containing 1.15% KCl, centrifuged (1,000 g in 4 °C for 10 min), and antioxidant
922 capacity was determined as described previously [24], [31]. Reading was performed at 595

923 nm respectively. All results were compared to a standard curve of trolox (concentration
924 ranging between 0.01–20 nmol). Results are presented as nmol trolox equivalent per mg of
925 skin tissue.

926 **GSH assay:** GSH levels were determined as described previously [24], [32]. Reading was
927 performed at 405 nm. Results are presented as μM of GSH per mg of skin, compared to
928 standard curve (GSH concentration ranging 5–150 μM).

929 **Catalase activity assay:** To determine catalase activity, it was measured the decay on H_2O_2
930 concentration and the oxygen generation [24], [32]. Reading was performed at 240 nm (25
931 $^{\circ}\text{C}$) and catalase activity was calculated based on the difference between the reading before
932 and 30 sec after H_2O_2 . The catalase values were expressed as unit of catalase/mg of
933 skin/minute.

934 **Superoxide anion production:** Superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) production in the skin was
935 measured using the nitroblue tetrazolium (NBT) reagent as described previously [22], [24].
936 Reading was performed at 620nm. Results are expressed as NBT reduction (OD/ 10mg of
937 skin).

938 **Lipid peroxidation assay:** Lipid peroxidation was measured by tert-butyl lipid
939 hydroperoxides (LOOH)-initiated chemiluminescence [29], [32]. Reading was conducted in a
940 β -counter Beckman®LS 6000SC in a non-coincident counting for 30 s with a response range
941 between 300 and 620 nm. All runs last 120 min (30 $^{\circ}\text{C}$). The results were measured in
942 counts per min (cpm) per mg of skin tissue.

943 **Data analysis:** Results are presented as mean values \pm standard error of the mean (SEM)
944 and representative of two independent experiments. Each experimental group presented 6
945 hairless mice per experiment. Statistical analysis was performed on the software GraphPad
946 Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) using one-way ANOVA followed by
947 Tukey's post-hoc. When $p < 0.05$, results were taken as statistically significant.

948 **Results**

949 **Formulation containing MaR1 inhibits the development of skin edema and MPO** 950 **activity triggered by UVB irradiation**

951 The possible anti-inflammatory activity of formulation containing MaR1 in UVB-induced skin
952 inflammation in hairless mice was evaluated. The MPO is a function and activation marker of
953 neutrophils. The results showed that the UVB irradiation induced a significant increase of
954 skin edema (Figure 1A) and MPO activity (Figure 1B) in the untreated irradiated group and in
955 the treated with the base formulation. However, skin edema (Figure 1A) and MPO activity
956 (Figure 1B) were significantly reduced by the formulation containing MaR1. The base
957 formulation had no significant effect in reducing edema and MPO.

958 **Formulation containing MaR1 reduces UVB irradiation-induced apoptosis of** 959 **keratinocytes and epidermal thickness**

960 UVR was able to induce keratinocytes undergo apoptosis (sunburn cells), which are defined
961 as shrunken cells within the epidermis that exhibit eosinophilic cytoplasm and condensed
962 nucleus [33]. Thus, we investigated apoptotic keratinocytes after treatment with the
963 formulation containing MaR1. The results showed that treatment with formulation containing
964 MaR1 inhibited sunburn cells compared with in the untreated irradiated group and treated
965 with the base formulation (Figure 2). One of the consequences of acute exposure to UVR
966 radiation is inflammation that causes epidermal thickening due to edema, cell infiltration and
967 cell proliferation [34]. Measurement of hematoxylin and eosin stained tissue sections
968 indicated that dorsal skin epidermal thickness was significantly increased following UVB
969 irradiation in the untreated irradiated group and in the one treated with the base formulation
970 compared to the non-treated control group and non-irradiated. By contrast, epidermal
971 hypertrophy was significantly reduced when mice were treated formulation containing MaR1
972 (Figure 3). The base formulation had no significant effect in reducing sunburn cells and
973 epidermal thickness. These data indicate a protective effect of formulation containing MaR1
974 upon UVB irradiation-induced keratinocytes apoptosis and epidermal thickness.

975 **Formulation containing MaR1 inhibits UVB irradiation-induced increase of mast cell**
976 **counts**

977 After exposure to UVB irradiation, mast cells secrete mediators that trigger inflammation and
978 recruit other leukocytes such as neutrophils in the skin of hairless mice. In this study,
979 treatment with formulation containing MaR1 decreased the number of mast cells compared
980 to the irradiated controls groups (Figure 4). The base formulation had no significant effect in
981 mast cell counts.

982 These data indicate formulation containing MaR1 ameliorates UVB irradiation-induced
983 inflammation by effectively reducing the numbers of mast cells in the skin.

984 **Formulation containing MaR1 inhibits UVB irradiation-induced MMP-9 activity and**
985 **collagen fibers degradation**

986 After the exposure to UVB irradiation, there was a significant increase in the
987 secretion/activity of MMP-9 in the untreated irradiated group and irradiated treated with base
988 formulation. The MMP-9 are enzymes degrade collagen and other extracellular matrix
989 proteins causing skin photoaging process [35].

990 Treatment with formulation containing MaR1 reduced MMP-9 activity (Figure 5) and the
991 degradation of skin collagen, as observed by the preservation on the blue/green color in the
992 Masson's trichrome staining (Figure 6), and the base formulation had no significant effect.
993 Therefore, the enzymatic activity assay (MMP-9 assay) and tissue staining (Masson's
994 trichome) results corroborate each other. These data demonstrate that MaR1 reduces
995 dermal connective tissue damage.

996

997 **Formulation containing MaR1 inhibits UVB irradiation-induced oxidative stress**

998 UVB irradiation decreases antioxidant defenses as well as increases other oxidative stress
999 markers in the skin [24]–[26], [36]. The antioxidant effects of MaR1 contributed to the
1000 attenuation of the skin damages caused by UVB irradiation, because treatment with
1001 formulation containing MaR1 reduce on UVB-induced oxidative stress. UVB irradiation

1002 depleted the antioxidant capacity of the skin as observed by reduced activity/levels in the
1003 FRAP assay (Figure 7A), catalase activity assay (Figure 7B), GSH quantitation (Figure 7C).
1004 In addition UVB irradiation increased lipid peroxidation (Figure 8A) superoxide anion
1005 production (Figure 8B), which are marker's of oxidative stress. Formulation containing MaR1
1006 restored the skin antioxidant capacity as observed in the FRAP (Figure 7A), GSH (Figure 7C)
1007 and catalase assays (Figure 7B). Furthermore, formulation containing MaR1 inhibited
1008 superoxide anion production (Figure 8B) and lipid peroxidation (Figure 8A), and the base
1009 formulation had no significant effect in oxidative stress. Thus, the antioxidant effects of MaR1
1010 contributed to the attenuation of the skin damages caused by UVB irradiation.

1011

1012 **Discussion**

1013 Maresin 1 (MaR1) is an antiinflammatory and pro-resolution lipid mediator produced by
1014 macrophages from docosahexaenoic acid (DHA) [10], [12], [37], [38]. We have previously
1015 shown that MaR1 can improve the harmful effects caused by UVB when administered
1016 intraperitoneally [20]. However, the effects of topical treatment with MaR1 embedded in
1017 emulsion in models of UVB-induced inflammation and oxidative stress have not been
1018 reported. To our knowledge, this is the first study demonstrating *in vivo* efficacy of topical
1019 formulation containing MaR1 for the treatment of UVB-induced oxidative stress and
1020 inflammation.

1021 Treatment with topical formulation containing MaR1 (1.5 ng per mouse) reduced clinical
1022 signs of inflammation and essential pathophysiological inflammatory parameters in the UVB-
1023 induced skin injury model. Formulation containing MaR1 inhibited skin edema, neutrophils
1024 recruitment (MPO). These results corroborate the inhibitory effect of MaR1 in neutrophil
1025 chemotaxis and macrophage efferocytosis [39], [40]. Furthermore, our results agree with the
1026 inhibitory effects of MaR1 observed in systemic treatment with this lipid in model UVB-
1027 induced oxidative stress and inflammation [20].

1028 Epidermal thickness is used as a quantitative parameter to assess inflammation. The
1029 histopathological analysis found that the treatment with MaR1 attenuated the thickening of
1030 the epidermis. Additionally, treatment with MaR1 reduced the number of sunburn cells and
1031 mast cell counts. Sunburn cells and mast cells are used as markers of skin damage caused
1032 by UVB, because after exposition UVB irradiation keratinocytes undergo apoptosis (sunburn
1033 cells) [41] and mast cells secrete mediators that trigger inflammation and recruit other
1034 leukocytes such as neutrophils [42]. Previous studies have shown that MaR1 promoted
1035 resolution of inflammation by accelerating caspase-dependent neutrophil apoptosis [40] and
1036 also reduced apoptosis of pancreatic acinar cells [43]. In another study, RvD1 inhibited
1037 48/80-induced mast cell degranulation and PGE₂ production [44]. Consistent with our
1038 findings, similar studies also showed that systemic treatment with resolvin D1 (RvD1) and
1039 MaR1 attenuated UVB-induced acute skin damage by reducing epidermal thickening,
1040 sunburn cell number and mast cell count in an injury model skin UVB-induced in hairless
1041 mice [20], [32].

1042 Another inflammatory parameter evaluated was the activity/secretion of metalloproteinase-9
1043 (MMP-9). MMP-9 are enzymes that degrades skin collagen and potentiating negative effects
1044 of the inflammatory response [45]. These enzymes are also associated with the invasive and
1045 metastatic potential of tumors [46]. MaR1 topical treatment inhibited RUV radiation-induced
1046 MMP-9 activity. Corroborating the MMP-9 data, MaR1 also inhibited RUV radiation-induced
1047 collagen degradation as observed in the Masson's trichrome staining. The reduction in MMP-
1048 9 activity is in line with previous studies that showed that systemic treatment with this lipid
1049 reduces the expression of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β that stimulate
1050 metalloproteinase expression (especially MMP-9) in keratinocytes and cutaneous fibroblasts
1051 [20].

1052 ROS act as second messengers in pro-inflammatory signaling cascades that induce cytokine
1053 production. The release of these inflammatory cytokine is one of the main components of
1054 UVB-induced skin injury [47], In addition, ROS directly damage DNA in addition to causing

1055 harmful effects on biological systems, such as loss of fluidity inactivation of membrane
1056 enzymes and receptors, and increasing of the permeability of ions, what can lead to cell
1057 membrane rupture [48], [49].

1058 Excessive production of ROS leads to an imbalance between oxidation and antioxidants in
1059 the body, which were reflected in this study by measurement of the levels of catalase (CAT)
1060 and reduced glutathione (GSH). In present study the topical treatment with MaR1 improved
1061 the antioxidant capacity of the skin after UVB exposition by increasing ferric reducing (FRAP
1062 assay). In addition, MaR1 topical treatment increased the levels of CAT and GSH, which
1063 were findings supported by previous studies [20], [43]. Another finding observed in our study
1064 that corroborates the assertion that topical treatment with MaR1 is a potent agent in the
1065 prevention and resolution of oxidative stress was the reduction in superoxide anion
1066 production and lipid peroxidation induced by UVB. Pro-resolution lipid mediators reduced
1067 oxidative stress *in vivo* as evidenced by two recent studies showing LXA4 [29] and RvD1 [32]
1068 reduce ROS production induced by UVB. As ROS is known to play a potentially detrimental
1069 role in inflammation, the observed beneficial effects of topical formulation containing MaR1
1070 may be partially linked to attenuation of the ROS response.

1071 Evidence suggests that the pro-resolution function of MaR1 is associated with the interaction
1072 of this mediator with LGR6 receptors (G protein-coupled receptor 6) [52]. LGR6 is known to
1073 promote repair and regeneration, and is present in large amounts in the epidermis and
1074 dermis [53]. This finding corroborates with beneficial effects observed in the present study, in
1075 which we demonstrated that topical treatment with a formulation containing MaR1 reduced
1076 UVB-induced skin damage.

1077 The use of topical formulations makes drug administration safer by avoiding adverse effects
1078 such as liver metabolism, gastrointestinal irritation and systemic toxicity, in addition to
1079 improve patient adherence to therapy [21], [27], [28]. The topical formulation containing
1080 MaR1 proved to be a promising agent for the treatment of damage caused by UVB.

1081 **References**

- 1082 [1] M. Podda, M. G. Traber, C. Weber, L.-J. Yan, e L. Packer, “UV-Irradiation Depletes
1083 Antioxidants and Causes Oxidative Damage in a Model of Human Skin”, *Free Radic.*
1084 *Biol. Med.*, vol. 24, n° 1, p. 55–65, jan. 1998, doi: 10.1016/S0891-5849(97)00142-1.
- 1085 [2] K. Hiramoto, H. Kobayashi, Y. Yamate, M. Ishii, e E. F. Sato, “Intercellular pathway
1086 through hyaluronic acid in UVB-induced inflammation.”, *Exp. Dermatol.*, vol. 21, n° 12,
1087 p. 911–4, dez. 2012, doi: 10.1111/exd.12032.
- 1088 [3] N. Vitale *et al.*, “Resveratrol couples apoptosis with autophagy in UVB-irradiated
1089 HaCaT cells.”, *PLoS One*, vol. 8, n° 11, p. e80728, jan. 2013, doi:
1090 10.1371/journal.pone.0080728.
- 1091 [4] A. Saija, “In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical
1092 photoprotective agents”, *Int. J. Pharm.*, vol. 199, n° 1, p. 39–47, abr. 2000, doi:
1093 10.1016/S0378-5173(00)00358-6.
- 1094 [5] F. Afaq, V. M. Adhami, e H. Mukhtar, “Photochemoprevention of ultraviolet B signaling
1095 and photocarcinogenesis.”, *Mutat. Res.*, vol. 571, n° 1–2, p. 153–73, abr. 2005, doi:
1096 10.1016/j.mrfmmm.2004.07.019.
- 1097 [6] S. A. Figueiredo, F. M. P. Vilela, C. A. Da Silva, T. M. Cunha, M. H. Dos Santos, e M.
1098 J. V. Fonseca, “In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of
1099 *Garcinia brasiliensis* epicarp extract”, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 131, p.
1100 65–73, fev. 2014, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.01.004.
- 1101 [7] G. Emri, I. Horkay, e E. Remenyik, “[The role of free radicals in the UV-induced skin
1102 damage. Photo-aging]”, *Orv. Hetil.*, vol. 147, n° 16, p. 731—735, 2006, [Online].
1103 Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/16711258>.
- 1104 [8] G. M. Halliday, “Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in
1105 response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis.”,

- 1106 *Mutat. Res.*, vol. 571, n° 1–2, p. 107–20, abr. 2005, doi:
1107 10.1016/j.mrfmmm.2004.09.013.
- 1108 [9] Y. M. Fonseca, C. D. Catini, F. T. M. C. Vicentini, A. Nomizo, R. F. Gerlach, e M. J. V.
1109 Fonseca, “Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced
1110 oxidative stress in skin: evaluation of reduced glutathione levels and matrix
1111 metalloproteinase secretion.”, *J. Ethnopharmacol.*, vol. 127, n° 3, p. 596–601, fev.
1112 2010, doi: 10.1016/j.jep.2009.12.019.
- 1113 [10] R. E. E. Abdulnour *et al.*, “Maresin 1 biosynthesis during platelet-neutrophil
1114 interactions is organ-protective”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, n° 46, p.
1115 16526–16531, nov. 2014, doi: 10.1073/pnas.1407123111.
- 1116 [11] C. N. Serhan *et al.*, “Maresins: novel macrophage mediators with potent
1117 antiinflammatory and proresolving actions.”, *J. Exp. Med.*, vol. 206, n° 1, p. 15–23, jan.
1118 2009, doi: 10.1084/jem.20081880.
- 1119 [12] J. Dalli *et al.*, “The novel 13S,14S-epoxy-maresinis converted by human macrophages
1120 to maresin 1 (MaR1), inhibits leukotriene A4 hydrolase (LTA4H), and shifts
1121 macrophage phenotype”, *FASEB J.*, vol. 27, n° 7, p. 2573–2583, 2013, doi:
1122 10.1096/fj.13-227728.
- 1123 [13] Z. Gao, “Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor [κ]B
1124 kinase complex”, *J. Biol. Chem.*, vol. 277, p. 48115–48121, 2002, [Online]. Available
1125 at: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M209459200>.
- 1126 [14] Y. Gao *et al.*, “Resolvin D1 Improves the Resolution of Inflammation via Activating NF-
1127 κ B p50/p50–Mediated Cyclooxygenase-2 Expression in Acute Respiratory Distress
1128 Syndrome”, *J. Immunol.*, vol. 199, n° 6, p. 2043–2054, set. 2017, doi:
1129 10.4049/jimmunol.1700315.
- 1130 [15] R. Marcon, A. F. Bento, R. C. Dutra, M. a Bicca, D. F. P. Leite, e J. B. Calixto,

- 1131 "Maresin 1, a proresolving lipid mediator derived from omega-3 polyunsaturated Fatty
1132 acids, exerts protective actions in murine models of colitis.", *J. Immunol.*, vol. 191, n°
1133 8, p. 4288–98, 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1202743.
- 1134 [16] J. Gong *et al.*, "Maresin 1 mitigates LPS-induced acute lung injury in mice", *Br. J.*
1135 *Pharmacol.*, vol. 171, n° 14, p. 3539–3550, 2014, doi: 10.1111/bph.12714.
- 1136 [17] A. Chatterjee, A. Sharma, M. Chen, R. Toy, G. Mottola, e M. S. Conte, "The pro-
1137 resolving lipid mediator maresin 1 (MaR1) attenuates inflammatory signaling pathways
1138 in vascular smooth muscle and endothelial cells", *PLoS One*, vol. 9, n° 11, 2014, doi:
1139 10.1371/journal.pone.0113480.
- 1140 [18] M. Giera *et al.*, "Lipid and lipid mediator profiling of human synovial fluid in rheumatoid
1141 arthritis patients by means of LC-MS/MS", *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol.*
1142 *Lipids*, vol. 1821, n° 11, p. 1415–1424, 2012, doi: 10.1016/j.bbailip.2012.07.011.
- 1143 [19] T. M. Nordgren *et al.*, "Maresin-1 reduces the pro-inflammatory response of bronchial
1144 epithelial cells to organic dust.", *Respir. Res.*, vol. 14, n° 1, p. 51, 2013, doi:
1145 10.1186/1465-9921-14-51.
- 1146 [20] T. L. C. Cezar *et al.*, "Treatment with maresin 1, a docosahexaenoic acid-derived pro-
1147 resolution lipid, protects skin from inflammation and oxidative stress caused by UVB
1148 irradiation", *Sci. Rep.*, vol. 9, n° 1, p. 1–14, dez. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-
1149 39584-6.
- 1150 [21] M. Z. Campanini *et al.*, "Efficacy of topical formulations containing Pimenta
1151 pseudocaryophyllus extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in
1152 hairless mice", *J Photochem Photobiol B*, vol. 127, p. 153–160, 2013, doi:
1153 10.1016/j.jphotobiol.2013.08.007.
- 1154 [22] R. M. Martinez *et al.*, "Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and
1155 Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice.", *J. Nat. Prod.*, vol. 78, n° 7, p. 1647–55,

- 1156 jul. 2015, doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00198.
- 1157 [23] D. L. Giokas, A. Salvador, e A. Chisvert, “UV filters: From sunscreens to human body
1158 and the environment”, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 26, nº 5, p. 360–374, maio
1159 2007, doi: 10.1016/J.TRAC.2007.02.012.
- 1160 [24] R. M. Martinez *et al.*, “Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and
1161 oxidative stress in mice”, *J. Dermatol. Sci.*, vol. 0, nº 0, doi:
1162 10.1016/J.JDERMSCI.2018.04.014.
- 1163 [25] R. M. Martinez *et al.*, “Hesperidin methyl chalcone inhibits oxidative stress and
1164 inflammation in a mouse model of ultraviolet B irradiation-induced skin damage.”, *J.*
1165 *Photochem. Photobiol. B.*, vol. 148, p. 145–53, jul. 2015, doi:
1166 10.1016/j.jphotobiol.2015.03.030.
- 1167 [26] A. L. Ivan *et al.*, “Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation
1168 and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro”, *J*
1169 *Photochem Photobiol B*, vol. 138, p. 124–133, 2014, doi:
1170 10.1016/j.jphotobiol.2014.05.010.
- 1171 [27] R. M. Martinez *et al.*, “Topical Formulation Containing Naringenin: Efficacy against
1172 Ultraviolet B Irradiation-Induced Skin Inflammation and Oxidative Stress in Mice.”,
1173 *PLoS One*, vol. 11, nº 1, p. e0146296, jan. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0146296.
- 1174 [28] R. Casagrande, S. R. Georgetti, W. A. Verri, D. J. Dorta, A. C. dos Santos, e M. J. V
1175 Fonseca, “Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-
1176 induced oxidative stress in hairless mice.”, *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 84, nº 1,
1177 p. 21–7, jul. 2006, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2006.01.006.
- 1178 [29] R. M. Martinez *et al.*, “Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and
1179 oxidative stress in mice”, *J. Dermatol. Sci.*, vol. 91, nº 2, p. 164–174, ago. 2018, doi:
1180 10.1016/j.jdermsci.2018.04.014.

- 1181 [30] A. V. Sorokin *et al.*, “Bioactive Lipid Mediator Profiles in Human Psoriasis Skin and
1182 Blood”, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 138, n° 7, p. 1518–1528, jul. 2018, doi:
1183 10.1016/j.jid.2018.02.003.
- 1184 [31] V. Katalinic, D. Modun, I. Music, e M. Boban, “Gender differences in antioxidant
1185 capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate;
1186 ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays.”, *Comp. Biochem.*
1187 *Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 140, n° 1, p. 47–52, jan. 2005, doi:
1188 10.1016/j.cca.2005.01.005.
- 1189 [32] P. Saito *et al.*, “The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and
1190 Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice”, *Front. Pharmacol.*, vol. 9,
1191 p. 1242, out. 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.01242.
- 1192 [33] C. Bayerl, S. Taake, I. Moll, e E. G. Jung, “Characterization of sunburn cells after
1193 exposure to ultraviolet light”, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, vol. 11, n° 4,
1194 p. 149–154, ago. 1995, doi: 10.1111/j.1600-0781.1995.tb00157.x.
- 1195 [34] A. Tewari, M. M. L. Grage, G. I. Harrison, R. Sarkany, e A. R. Young, “UVA1 is skin
1196 deep: molecular and clinical implications.”, *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 12, n°
1197 November 2016, p. 95–103, 2013, doi: 10.1039/c2pp25323b.
- 1198 [35] T. Quan, Z. Qin, W. Xia, Y. Shao, J. J. Voorhees, e G. J. Fisher, “Matrix-degrading
1199 metalloproteinases in photoaging.”, *J. Investig. dermatology. Symp. Proc.*, vol. 14, n°
1200 1, p. 20–4, ago. 2009, doi: 10.1038/jidsymp.2009.8.
- 1201 [36] V. T. Natarajan, P. Ganju, A. Ramkumar, R. Grover, e R. S. Gokhale, “Multifaceted
1202 pathways protect human skin from UV radiation”, *Nature Chemical Biology*, vol. 10, n°
1203 7. Nature Publishing Group, p. 542–551, 2014, doi: 10.1038/nchembio.1548.
- 1204 [37] Y. Li, J. Dalli, N. Chiang, R. M. Baron, C. Quintana, e C. N. Serhan, “NIH Public
1205 Access”, vol. 39, n° 5, p. 885–898, 2014, doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.011.Plasticity.

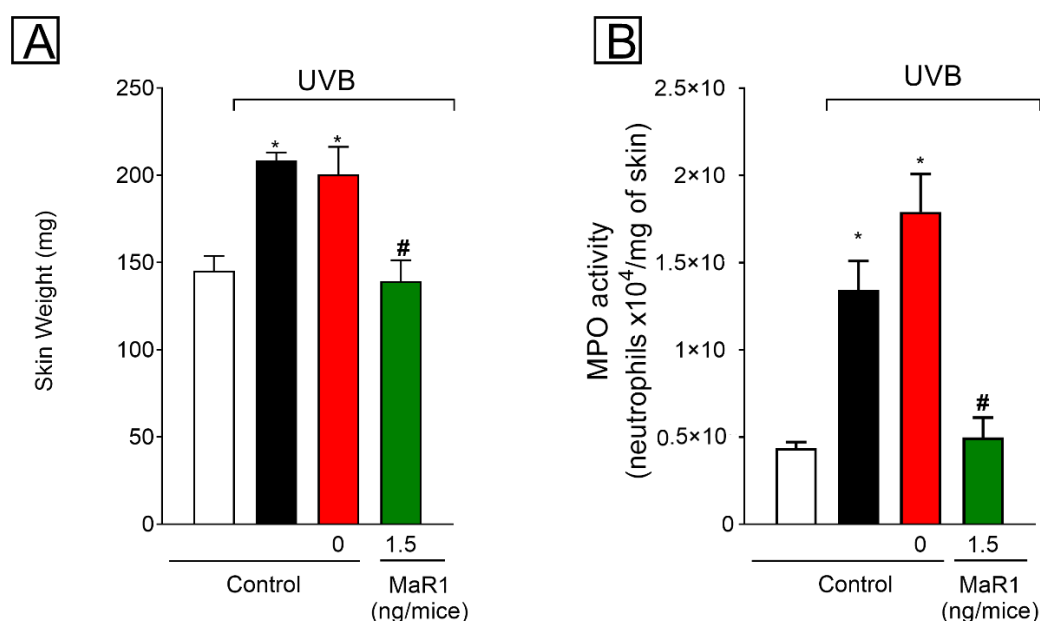
- 1206 [38] N. Chiang *et al.*, “Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic
1207 requirements”, *Nature*, vol. 484, n° 7395, p. 524–528, abr. 2012, doi:
1208 10.1038/nature11042.
- 1209 [39] C. Serhan, J. Dalli, S. Karamnov, A. Choi, e C. Park, “Macrophage proresolving
1210 mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain”, *Faseb J*, vol. 26,
1211 2012.
- 1212 [40] J. Gong *et al.*, “Maresin 1 prevents lipopolysaccharide-induced neutrophil survival and
1213 accelerates resolution of acute lung injury”, *Shock*, vol. 44, n° 4, p. 371–380, out.
1214 2015, doi: 10.1097/SHK.0000000000000434.
- 1215 [41] A. Schwarz *et al.*, “Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for
1216 partial involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells.”, *J.*
1217 *Invest. Dermatol.*, vol. 104, n° 6, p. 922–7, 1995, doi: 10.1111/1523-
1218 1747.ep12606202.
- 1219 [42] T. Quan, Z. Qin, W. Xia, Y. Shao, J. J. Voorhees, e G. J. Fisher, “Matrix-degrading
1220 metalloproteinases in photoaging”, in *Journal of Investigative Dermatology Symposium*
1221 *Proceedings*, 2009, vol. 14, n° 1, p. 20–24, doi: 10.1038/jidsymp.2009.8.
- 1222 [43] C. Lv CEF, Q. Jin Corresponding Author, e Q. Jin, “Maresin-1 Inhibits Oxidative Stress
1223 and Inflammation and Promotes Apoptosis in a Mouse Model of Caerulein-Induced
1224 Acute Pancreatitis”, 2019, doi: 10.12659/MSM.917380.
- 1225 [44] G. Grabauskas, X. Wu, e C. Owyang, “1091 - Resolvin D1 Acting on G1 Coupled Fpr2
1226 Receptor Inhibits Mast Cell Degranulation and Prevents Development of Visceral
1227 Hypersensitivity in Ibs”, *Gastroenterology*, vol. 154, n° 6, p. S-214, maio 2018, doi:
1228 10.1016/s0016-5085(18)31106-5.
- 1229 [45] J. I. Harper *et al.*, “A study of matrix metalloproteinase expression and activity in atopic
1230 dermatitis using a novel skin wash sampling assay for functional biomarker analysis.”,

- 1231 *Br. J. Dermatol.*, vol. 162, n° 2, p. 397–403, fev. 2010, doi: 10.1111/j.1365-
1232 2133.2009.09467.x.
- 1233 [46] F. P. Noonan *et al.*, “Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation
1234 requires melanin pigment”, *Nat. Commun.*, vol. 3, 2012, doi: 10.1038/ncomms1893.
- 1235 [47] A. L. M. Ivan *et al.*, “Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin
1236 inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in
1237 vitro”, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 138, p. 124–133, set. 2014, doi:
1238 10.1016/j.jphotobiol.2014.05.010.
- 1239 [48] F. Afaq, V. M. Adhami, N. Ahmad, e H. Mukhtar, “Inhibition of ultraviolet B-mediated
1240 activation of nuclear factor kappaB in normal human epidermal keratinocytes by green
1241 tea Constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate.”, *Oncogene*, vol. 22, n° 7, p. 1035–44,
1242 2003, doi: 10.1038/sj.onc.1206206.
- 1243 [49] M. L. Circu e T. Y. Aw, “Reactive oxygen species, cellular redox systems, and
1244 apoptosis.”, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 48, n° 6, p. 749–62, mar. 2010, doi:
1245 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022.
- 1246 [50] R. M. Martinez *et al.*, “Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and
1247 oxidative stress in mice”, *J. Dermatol. Sci.*, vol. 91, n° 2, p. 164–174, ago. 2018, doi:
1248 10.1016/j.jdermsci.2018.04.014.
- 1249 [51] G. Bannenberg *et al.*, “Maresin 1 Mitigates Sepsis-Associated Acute Kidney Injury in
1250 Mice via Inhibition of the NF-κB/ STAT3/MAPK Pathways”, 2019, doi:
1251 10.3389/fphar.2019.01323.
- 1252 [52] H. J. Snippert *et al.*, “Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all cell
1253 lineages of the skin”, *Science (80-.)*, vol. 327, n° 5971, p. 1385–1389, 2010, doi:
1254 10.1126/science.1184733.
- 1255

1256 **Figures**

1257 **Figure 1** . Topical formulation containing MaR1 reduces UVB irradiation-induced skin edema
1258 and MPO activity. The skin edema (A) and MPO activity (B) were determined in samples
1259 collected 12 h after the end of radiation. Results are presented as tissue weight in milligrams
1260 for skin edema and as neutrophils $\times 10^4$ per milligram of tissue for MPO activity. Bars
1261 represent means \pm SEM of 6 mice per group and are representative of two separate
1262 experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's
1263 test. * $p < 0.05$ compared to non-irradiated group; # $p < 0.05$ compared to the untreated
1264 irradiated control group (black bar) and irradiated control group treated with base formulation
1265 (red bar).

1266



1267

1268

1269

1270

1271

1272

1273

1274

1275

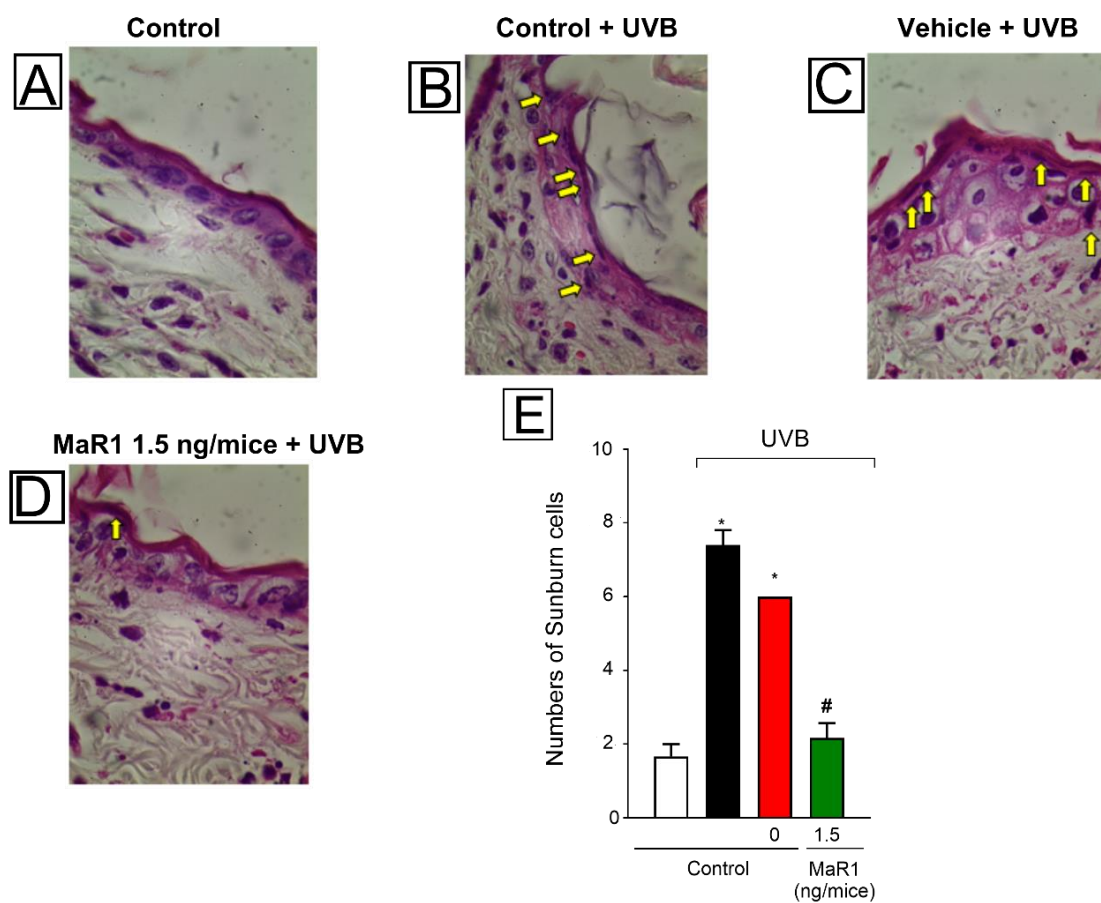
1276

1277

1278

1279 **Figure 2.** Topical formulation containing MaR1 reduced UVB irradiation-induced sunburn
 1280 cells formation. The number of sunburn cells was determined in samples dissected 12 h after
 1281 the radiation and stained with H&E. Representative images of non-irradiated control (A),
 1282 irradiation control (B), irradiated treated with formulation 1 without MaR1 (C), irradiated
 1283 treated with 1.5 ng of MaR1/mice (D). Quantitative analysis of sunburn cells in experimental
 1284 groups is presented per field in panel E. Original magnification 100x; 100 μ m. Bars represent
 1285 means \pm SEM of 6 mice per group and are representative of two separate experiments.
 1286 Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$
 1287 compared to non-irradiated group; # $p < 0.05$ compared to the untreated irradiated control
 1288 group (black bar) and irradiated control group treated with base formulation (red bar).

1289



1290

1291

1292

1293

1294

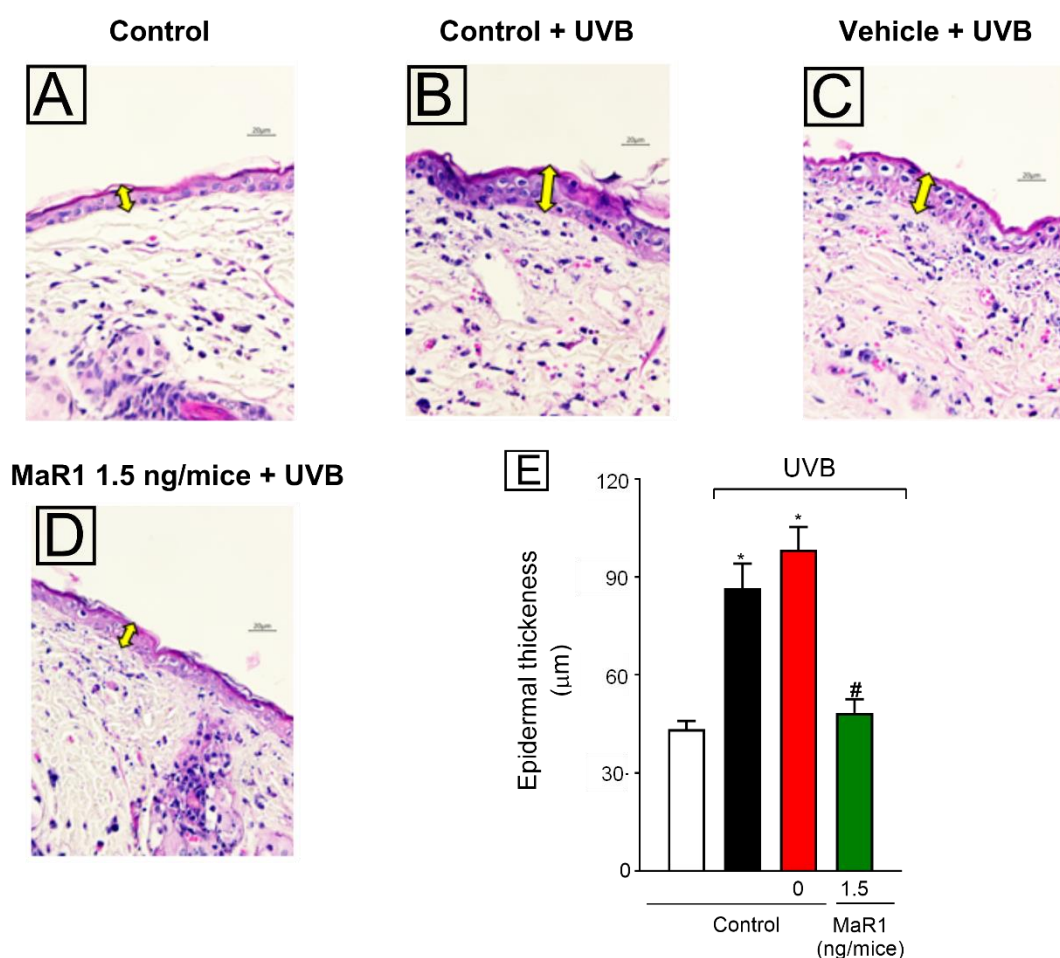
1295

1296

1297

1298 **Figure 3.** Topical formulation containing MaR1 reduced UVB irradiation-induced epidermal
 1299 thickening. The epidermal thickness was determined in samples dissected 12 h after the
 1300 radiation and stained with H&E. Representative images of non-irradiated control (A),
 1301 irradiation control (B), irradiated treated with formulation 1 without MaR1 (C), irradiated
 1302 treated with 1.5 ng/mice of MaR1 (D). Epidermal thickness of experimental groups is
 1303 presented in μm in panel E. Original magnification 40x; 100 μm . Bars represent means \pm
 1304 SEM of 6 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical
 1305 analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to
 1306 non-irradiated group and # $p < 0.05$ compared to the untreated irradiated control group (black
 1307 bar) and irradiated control group treated with base formulation (red bar).

1308



1309

1310

1311

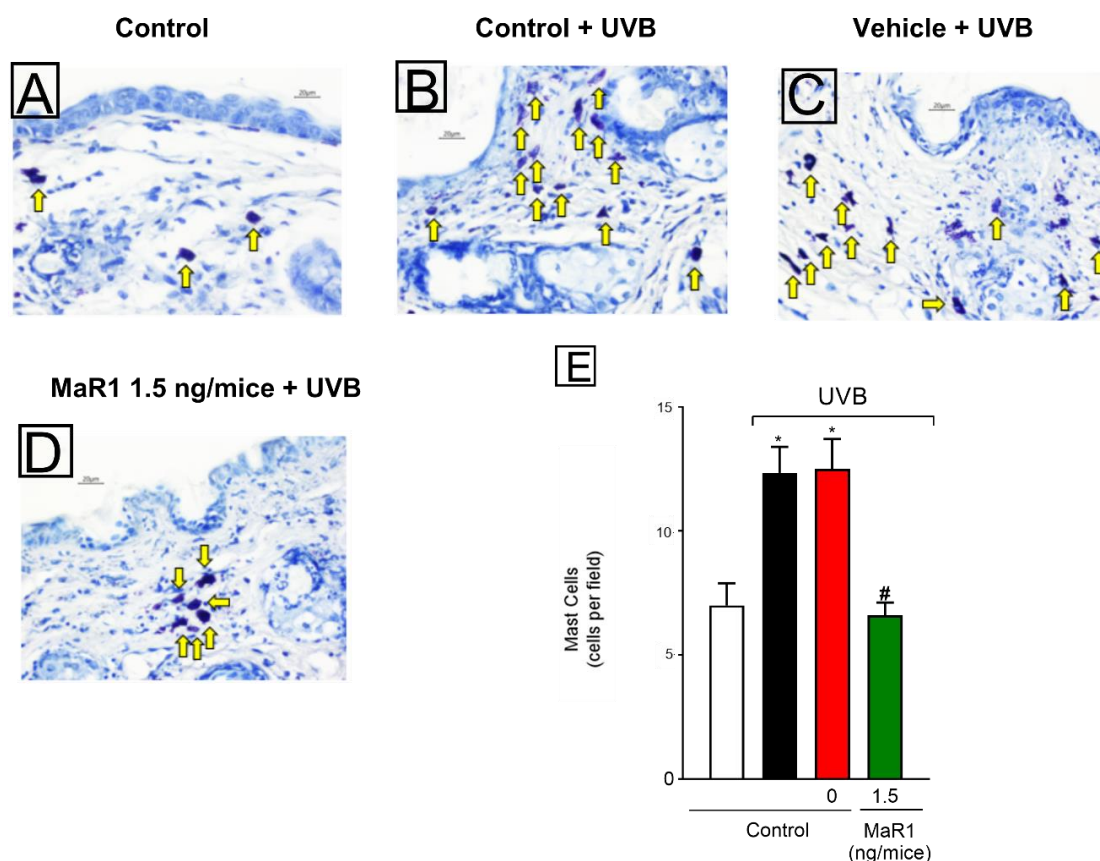
1312

1313

1314

1315 **Figure 4.** Topical formulation containing MaR1 reduced UVB irradiation-induced mast cells
 1316 counts. The proliferation of mast cells was determined in samples dissected 12 h after the
 1317 radiation and stained with toluidine blue. Representative images of non-irradiated control (A),
 1318 irradiation control (B), irradiated treated with formulation without MaR1 (C), irradiated treated
 1319 with 1.5 ng/mice of MaR1 (D). Mast cells count of experimental groups is presented per field
 1320 in panel E. Original magnification 40x; 100 μ m. Bars represent means \pm SEM of 6 mice per
 1321 group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was
 1322 performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to non-
 1323 irradiated group and # $p < 0.05$ compared to the untreated irradiated control group (black bar)
 1324 and irradiated control group treated with base formulation (red bar).

1325



1326

1327

1328

1329

1330

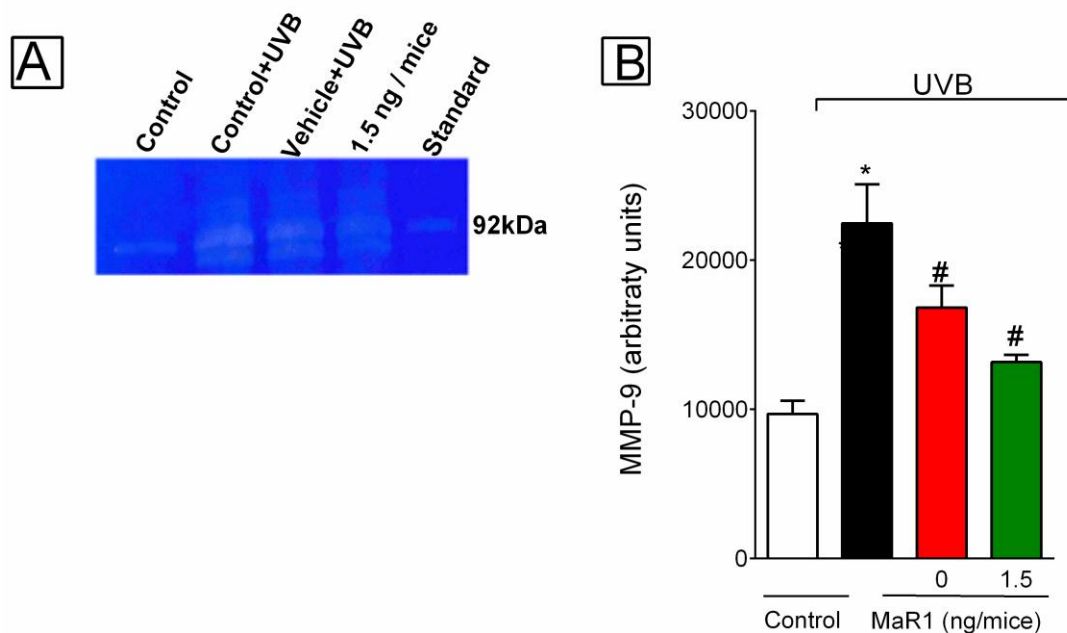
1331

1332

1333

1334 **Figure 5.** Topical formulation containing MaR1 inhibited UVB irradiation-induced MMP-9
1335 activity in the skin. MMP-9 activity was determined in samples dissected 12 h after the
1336 radiation. Image of gelatin zymography is presented in panel A and skin MMP-9 activity in
1337 panel B. MMP-9 MW 92 kDa. Results are presented as arbitrary units per sample for MMP-9
1338 activity. Bars represent means \pm SEM of 6 mice per group and are representative of two
1339 separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by
1340 Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to non-irradiated group; # $p < 0.05$ compared to the
1341 untreated irradiated control group (black bar) and irradiated control group treated with base
1342 formulation (red bar).

1343



1344

1345

1346

1347

1348

1349

1350

1351

1352

1353

1354

1355

1356

1357

1358

1359

1360

1361

1362

1363

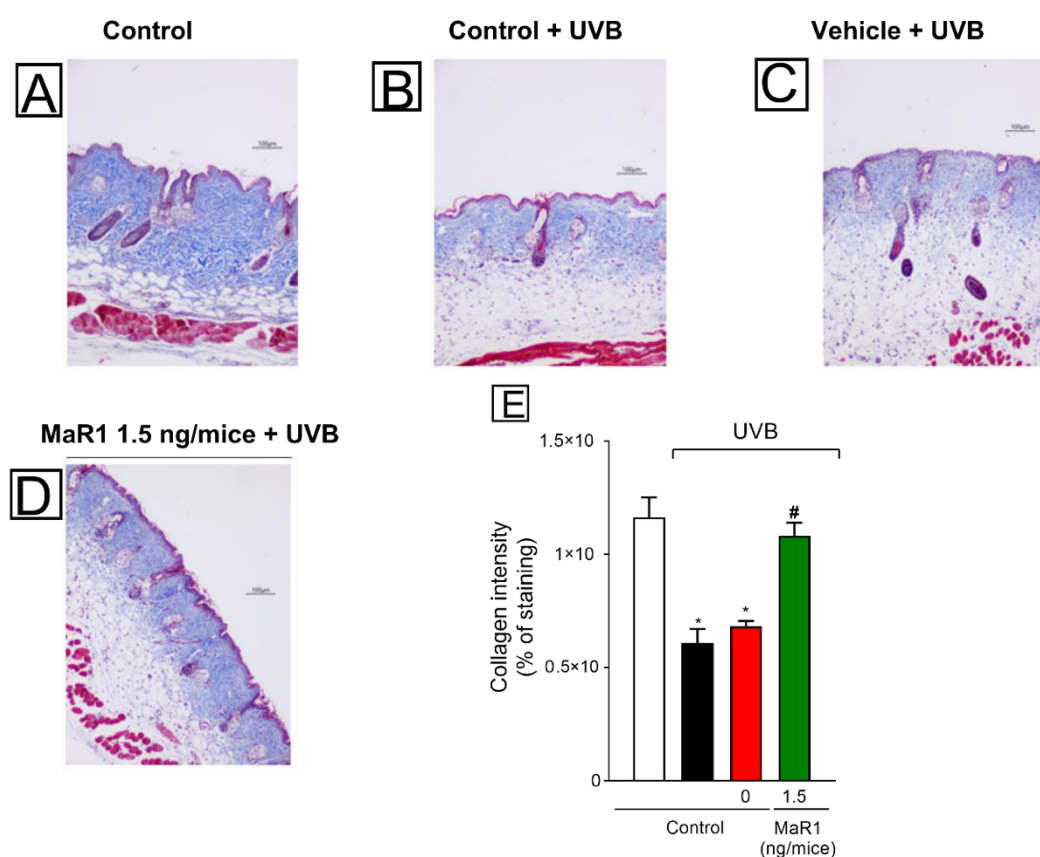
1364

1365

1366

1367
 1368
 1369
 1370
 1371
 1372
 1373
 1374
 1375
 1376
 1377
 1378
 1379
 1380

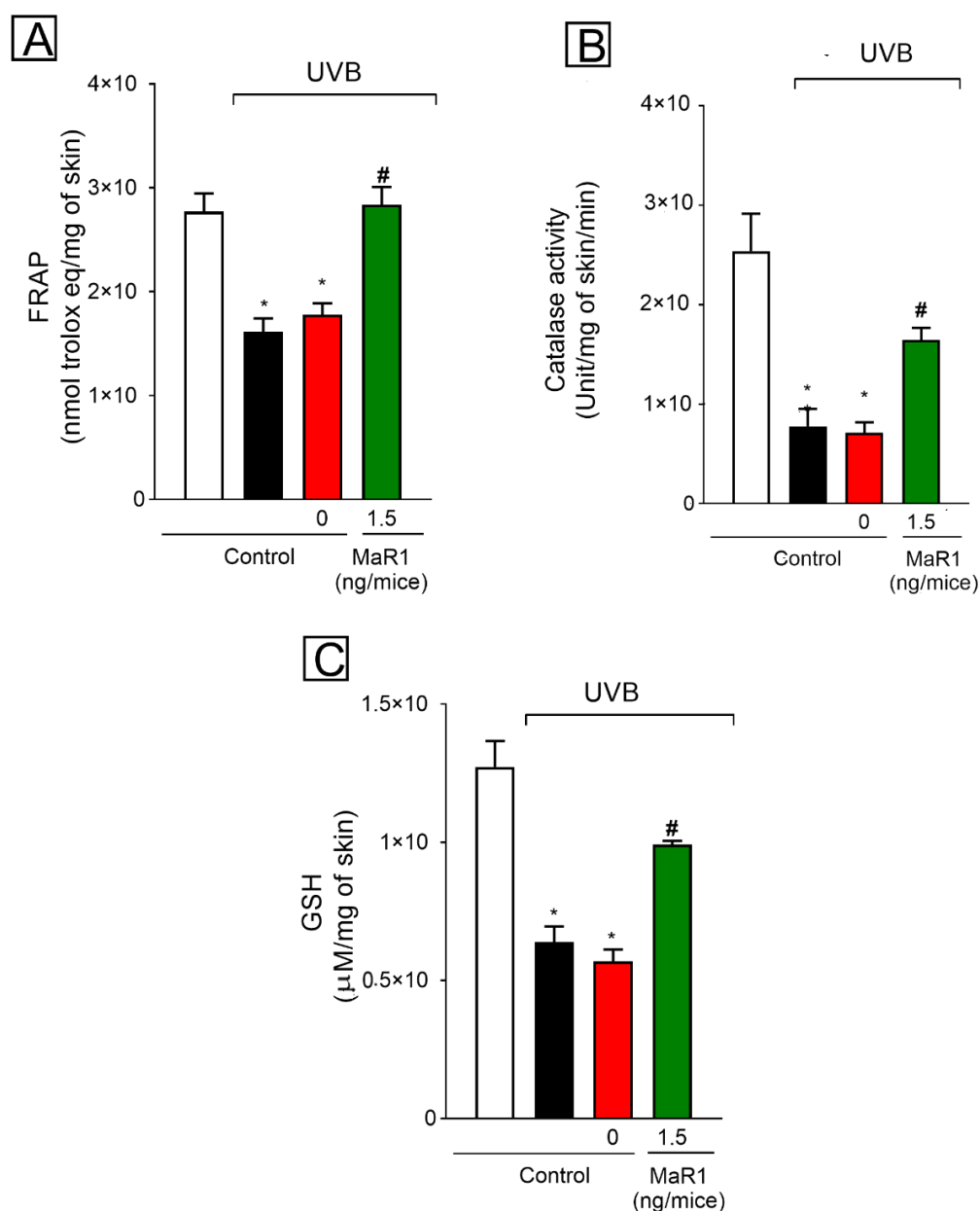
Figure 6. Topical formulation containing MaR1 inhibited UVB irradiation-induced collagen degradation in the skin. Degradation of collagen was determined in samples dissected 12 h after the radiation and stained with Masson's trichrome. Representative images of non-irradiated control (A), irradiation control (B), irradiated treated with formulation without MaR1 (C), irradiated treated with 1.5 ng/mice of MaR1 (D). Quantitative analysis of collagen degradation of experimental groups is presented as percentage of staining in panel E. Original magnification 20x; 100 μ m. Bars represent means \pm SEM of 6 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to non-irradiated group; # $p < 0.05$ compared to the untreated irradiated control group (black bar) and irradiated control group treated with base formulation (red bar).



1381
 1382
 1383
 1384
 1385
 1386
 1387
 1388

1389 **Figure 7.** Topical formulation containing MaR1 inhibited UVB irradiation-induced decrease of
 1390 skin antioxidant capacity. Total antioxidant capacity FRAP (A), catalase (B) and GSH levels
 1391 (C) were determined in samples dissected 12 h after the radiation. For the catalase assay
 1392 (D), samples were dissected 2 h after the radiation. Bars represent means \pm SEM of 6 mice
 1393 per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was
 1394 performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to non-
 1395 irradiated group and # $p < 0.05$ compared to the untreated irradiated control group (black bar)
 1396 and irradiated control group treated with t base formulation (red bar).

1397



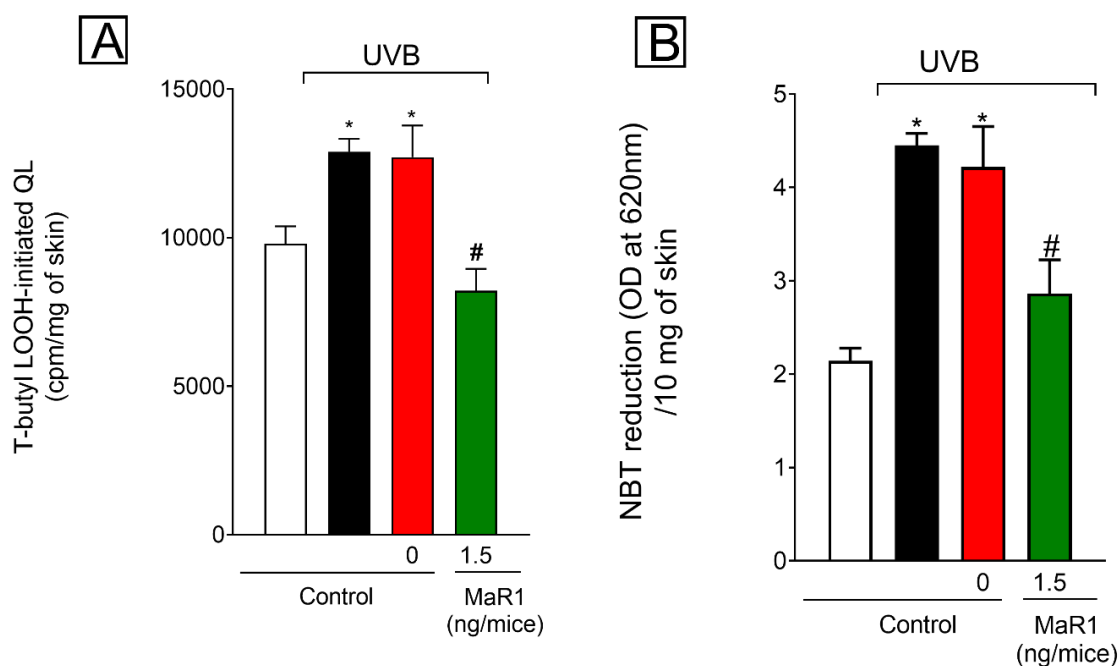
1398

1399

1400

1401 **Figure 8.** Topical formulation containing MaR1 inhibited UVB irradiation-induced lipid
1402 peroxidation and superoxide anion production. Lipid peroxidation (LOOH) (A) and
1403 Superoxide anion production (NBT reduction) (B) were determined in samples dissected 2 h
1404 after the radiation. Bars represent means \pm SEM of 6 mice per group and are representative
1405 of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA
1406 followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to non-irradiated group; ** $p < 0.05$ compared to
1407 the untreated irradiated control group (black bar) and irradiated control group treated with t
1408 base formulation (red bar).

1409



1410

1411

1412

1413

1414

1415

1416

1417

1418

1419

1420

1421

1422 4.2 THERAPEUTIC POTENTIAL OF TOPICAL FORMULATION CONTAINING LIPOXIN A4 IN
1423 INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS INDUCED BY UVB RADIATION
1424

1425 ^a Talita L. C. Cezar, ^a Renata M. Martinez, ^a David L. Vale, ^a Ingrid C. Pinto, ^a Priscila Saito, ^a
1426 Camilla Arriero, ^a Sandra R. Georgetti, ^a Marcela M. Baracat, ^b Waldiceu A. Verri Jr, ^{*a} Rúbia
1427 Casagrande

1428 ^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina-UEL,
1429 Avenida Robert Koch, 60, Hospital Universitário, 86039-440 Londrina, Paraná, Brazil

1430 ^bDepartamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade
1431 Estadual de Londrina-UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 80, PR445, Cx. Postal 10.011,
1432 86057-970, Londrina, Brazil

1433 ^{*}Corresponding author. Adress: Avenida Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86039-440
1434 Londrina, Paraná, Brazil. Tel.: +55 43 33712475. E-mail address: rubiaca@yaho.com.br
1435 (R. Casagrande).

1436

1437

1438

1439

1440

1441

1442

1443

1444

1445

1446 **ABSTRACT**

1447 Ultraviolet B (UVB) radiation induces oxidative stress, photoaging, and inflammation in skin
1448 cells. Photochemoprotection of the skin can be achieved by inhibiting inflammation and
1449 oxidative stress induced by UVB radiation. Here, we investigated the impact topical
1450 formulation containing lipoxin A4 (LXA4), an lipid mediator with effects antiinflammatory and
1451 pro-resolution, to resolution inflammation and oxidative stress induced by UVB in hairless
1452 mice. Topical formulations containing LXA4 increased levels of the antioxidant catalase
1453 (CAT) and reduced glutathione (GSH). Furthermore, topical formulations containing LXA4
1454 significantly increased ferric reducing ability (FRAP), well as decreased lipid hydroperoxide
1455 and superoxide anion production, resulting in a reduction in UVB-induced reactive oxygen
1456 species (ROS) levels. Additionally, the treatment with formulation containing LXA4 reduced
1457 skin edema, neutrophil recruitment (MPO; myeloperoxidase activity), matrix
1458 metalloproteinase-9 activity (MMP-9), keratinocyte apoptosis, epidermal thickening, mast
1459 cells counts and degradation of skin collagen UVB-induced in hairless mice. In conclusion,
1460 formulation containing LXA4 protects the skin from photoaging, inflammation and UVB-
1461 induced oxidative stress in hairless mice.

1462

1463

1464

1465

1466

1467

1468

1469

1470 **Introduction**

1471 Ultraviolet radiation (UVR) is a major cause of aging skin [1]. Excessive exposure to
1472 ultraviolet B (UVB) radiation increases the production of ROS, such as hydrogen peroxide
1473 and superoxide anions, and causes damage to proteins and lipids and reduces antioxidant
1474 levels in the skin, besides promotes skin cancer through multiple mechanisms, including
1475 induction of inflammation, oxidative stress, and DNA damage [2]–[5]. The overproduction of
1476 ROS increases the activity of activator protein 1 (AP-1), responsible for the production of
1477 matrix metalloproteinases (MMPs) [6], [7]. MMPs are enzymes that have collagenolytic
1478 activity and degrade extracellular matrix proteins, such as collagen, contributing to
1479 photoaging [8], [9]. Additionally skin exposed to UVB has high levels of inflammatory
1480 cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6), beyond
1481 cyclooxygenase-2 (COX-2) [5].

1482 Lipoxin A4 (LXA4) is an pro-resolution lipid mediator derived from arachidonic acid
1483 metabolism by lipoxygenases 5 and 12 with potent anti-inflammatory actions [10]–[12].
1484 Recent results suggest that systemic treatment with LXA4 inhibits the production of pro-
1485 inflammatory cytokines and oxidative stress, as well as increases the production of anti-
1486 inflammatory cytokines and antioxidant defenses in a UVB-induced skin lesion model in
1487 hairless mice [13]. In another study, LXA4 treatment reduced neutrophil infiltration and
1488 activity in a mouse model with *Aspergillus fumigatus* keratitis. Furthermore, LXA4 treatment
1489 inhibited the expression of pro-inflammatory mediators, including IL-1 β , TNF- α , IL-6 and
1490 cyclooxygenase-2 (COX-2), and promoted the expression of the anti-inflammatory factors IL-
1491 10 and Arg-1 in *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) keratitis mice models [14]. In addition,
1492 LXA4 treatment attenuated paraquat-induced lung injury in mice, and this was accompanied
1493 by reduced levels of secretion of TNF- α and IL-1 β and reduced oxidative stress damage [15].
1494 LXA4 has also been shown to play a protective role in restoring the oxidant/antioxidant
1495 balance by increasing the activity of antioxidant enzymes, besides reduces damage tissues
1496 by inhibiting ROS generation [16]–[18].

1497 Previous studies have already reported the positive effect of topical treatment with
1498 formulations containing antioxidation and anti-inflammatory agents in reducing the harmful
1499 effects caused by UVB [19]–[22].

1500 Although LXA4 is known to have anti-inflammatory action and reduce oxidative stress its
1501 protective effect on RUV-induced damage when administered topically is not yet known.
1502 Thus, the effects of treatment with topical formulation containing LXA4 on RUV-induced skin
1503 inflammation and oxidative stress in hairless mice was investigated in this study.

1504 **Material and Method**

1505 **Drugs and reagents:** Reagents from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) were GSH
1506 (reduced glutathione), brilliant blue R, DTNB (5,5'- dithiobis[2-nitrobenzoic acid]), N-
1507 ethylmaleimide, HTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide), o-dianisidine
1508 dihydrochloride, TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine), NBT (nitroblue tetrazolium), DMSO
1509 (dimethylsulfoxide) and bisacrylamide. Lipoxin A4 (LXA4), $\geq 95\%$ purity, was purchased from
1510 Cayman Chemical (Denver, CO, USA). Reagent from Acros (Pittsburgh, PA, USA) was tert-
1511 butyl hydroperoxide. Reagents from Amresco (Solon, OH, USA) were Tris and xylene cyanol.
1512 Reagents from Termo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) were sodium dodecyl sulfate
1513 (SDS) (Superscrip III) and acrylamide. All other reagents used were from pharmaceutical
1514 grade.

1515
1516 **Animals:** Sex matched hairless mice (HRS/J) weighing 20 – 30 g were obtained from the
1517 University Hospital of Londrina State University under the following conditions: 12 h dark/12
1518 h light cycle and $23 \pm 2^\circ\text{C}$ temperature. The mice were maintained with free access to water
1519 and food throughout the experiment. The animal protocol used in this study was approved by
1520 Animal Ethics Committee (CEUA process number 1447.2015.10) of the Londrina State
1521 University

1522 **Formulation:** Self- emulsifying agent was Polawax[®]. Aristoflex[®] was used as thickening
1523 agent. Caprylic/capric triglyceride was used as the emollient and propylene glycol as

1524 moisturizer. Phenonip was used as the preservative and deionized water was used for the
 1525 preparation of all formulation. LXA4 was added to the formulations at room temperature.
 1526 Control formulations did not contain LXA4 (Table 1).

1527 *Table 2: Percent composition (weight/weight) of formulation*

1528

Components	weight/weight (%)
Polawax ^{®a}	2
Aristoflex ^{®b} (dispersion 5%)	20
Caprylic/capric triglyceride	5
Propylene glycol	6
Phenonip [®]	0.4
Deionized water (qsp)*	100
Lipoxin A4	20 ng/g formulation

1529 *Quantity sufficient for preparation

1530 ^aSelf-emulsifying wax (Cetostearyl alcohol and polyoxyethylene derived from a fatty
 1531 acid ester of sorbitan 20 0E);

1532 ^bAmmonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer.

1533 **General experimental procedures:** Hairless mice were randomly designed to groups with 6
 1534 mice each as follows: non-irradiated control, irradiated control, irradiated and treated with
 1535 formulation without LXA4, irradiated and treated with the formulation containing 30 ng/mouse
 1536 LXA4 (10 ng/0.5 g of formulation). Mice received topical treatment on the dorsal surface with
 1537 0.5 g of the formulation 1 h, 10 min before, and at the end of the radiation session.

1538 **Radiation protocol:** UVB lamp (Philips TL/12 RS 40W, Medical-Holand) emits light between
 1539 270 and 400 nm, peaking at 313 nm, and placed on the top of the radiation chamber and
 1540 positioned 20 cm above the mice. This distance results in an radiation of 0.209mW/cm². The
 1541 radiation dose for induction of inflammation and oxidative stress was 4.14 J/cm², [23]–[26].

1542 The hairless mice were terminally anesthetized with 5% isoflurane 12 h after the end of UVB
1543 radiation and the full thickness of the dorsal skins were removed for edema, MPO activity,
1544 MMP-9 activity, FRAP and GSH assays and histology. Moreover, the hairless mice were
1545 anesthetized 5% isoflurane, following by decapitation at 2 h for catalase and NBT, and
1546 evaluation of production hydroperoxides [23]–[25], [27].

1547 **Skin edema:** Dorsal skin biopsy was carefully removed from euthanized mice and weighed
1548 using a precision scale. All samples presented a constant diameter of 5 mm. Results are
1549 expressed in mg of skin tissue obtained from the weight of each sample [22], [24].

1550 **MPO activity assay:** MPO colorimetric assay was used to determine neutrophil migration to
1551 the skin [21], [22]. Reading was performed at 450 nm. A standard curve of neutrophils was
1552 used to compare the results, which are presented as MPO activity (number of neutrophils x
1553 10^4 per mg of skin).

1554 **Histopathological analysis:** Skin samples were fixed in buffered formaldehyde, embedded
1555 in paraffin, sectioned (5 mm), and stained with Masson's trichrome stain for collagen fiber
1556 analysis. Collagen fiber intensity bundles shown in blue were analyzed by ImageJ Program
1557 as described previously [24]. Tissue sections were also stained with hematoxylin and eosin
1558 (H&E), and images were analyzed for epidermal thickness and apoptotic cells [13]. Toluidine
1559 blue staining was also used to determine mast cells count [28]. Histopathological scores are
1560 presented together with the representative images quantifying the alterations detected
1561 between the groups.

1562 **Matrix metalloproteinase (MMP)-9 activity measurement:** SDS-PAGE (sodium dodecyl
1563 sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) substrate-embedded enzymography was
1564 performed as described previously [24]. After electrophoresis, the gels were incubated with
1565 2.5% Triton X-100 (1h), with 0.05 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.01 M CaCl_2 (overnight, 37 °C), and
1566 stained with Brilliant blue R. The zone of enzyme activity was analyzed by comparing the
1567 groups in the ImageJ Program, after detaining in 20% acetic acid (NIH, Bethesda, MD, USA).

1568 **GSH assay:** GSH levels were determined as described previously [24], [29]. Reading was
1569 performed at 405 nm. Results are presented as μM of GSH per mg of skin, compared to
1570 standard curve (GSH concentration ranging 5–150 μM).

1571 **Catalase activity assay:** To determine catalase activity, it was measured the decay on H_2O_2
1572 concentration and the oxygen generation [24], [29]. Reading was performed at 240 nm (25
1573 $^\circ\text{C}$) and catalase activity was calculated based on the difference between the reading before
1574 and 30 sec after H_2O_2 . The catalase values were expressed as unit of catalase/mg of
1575 skin/minute.

1576 **Total antioxidant capacity FRAP assay:** Skin samples were dissected, homogenized into
1577 ice-cold bufer containing 1.15% KCl, centrifuged (1,000 g in 4 $^\circ\text{C}$ for 10min), and antioxidant
1578 capacity was determined as described previously [24], [30]. Reading was performed at 595
1579 nm. All results were compared to a standard curve of trolox (concentration ranging between
1580 0.01–20 nmol). Results are presented as nmol trolox equivalent per mg of skin tissue.

1581 **Superoxide anion production:** Superoxide anion (O_2^-) production in the skin was
1582 measured using the nitroblue tetrazolium (NBT) reagent as described previously [23], [24].
1583 Reading was performed at 620nm. Results are expressed as NBT reduction (OD/ 10mg of
1584 skin).

1585 **Lipid peroxidation assay:** Lipid peroxidation was measured by tert-butyl lipid
1586 hydroperoxides (LOOH)-initiated chemiluminescence [13], [31]. Reading was conducted in a
1587 β -counter Beckman[®]LS 6000SC in a non-coincident counting for 30 s with a response range
1588 between 300 and 620nm. All runs last 120min (30 $^\circ\text{C}$). The results were measured in counts
1589 per min (cpm) per mg of skin tissue.

1590 **Data analysis:** Results are presented as mean values \pm standard error of the mean (SEM)
1591 and representative of two independent experiments. Each experimental group presented 6
1592 hairless mice per experiment. Statistical analysis was performed on the software GraphPad

1593 Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) using one-way ANOVA followed by
1594 Tukey's post-hoc. When $p < 0.05$, results were taken as statistically significant.

1595 **Results**

1596 **Formulation containing LXA4 reduces UVB radiation-induced edema formation and** 1597 **MPO activity**

1598 Acute exposure to UVB radiation caused skin epidermal hyperplasia, erythema, and edema
1599 formation. Additionally, there is greater migration of neutrophils to the inflamed region. A
1600 marker of neutrophil function and activation is MPO enzyme. The results showed that the
1601 MPO activity and edema in mouse skin significantly increased after UVB radiation in groups
1602 irradiated and untreated and in the irradiated and treated with the control formulation.
1603 However, we observed a significant improvement in the evaluated parameters of edema
1604 (Figure 1A) and MPO (Figure 1B) in the group treated with 30 ng of LXA4 and with the
1605 control formulation no significant effect was observed.

1606 **Formulation containing LXA4 reduces UVB radiation-induced skin MMP-9 activity**

1607 MMPs are enzymes that enhance the destruction of skin structures and accelerate skin
1608 aging, in addition to amplifying the inflammatory response induced by UVB [32].

1609 In present study, MMP-9 activity in the skin was induced by UVB exposition, and this
1610 induction was inhibited by topical treatment with formulation containing LXA4. No effect on
1611 MMP-9 activity was observed in mice treated by control formulation without LXA4 (Figure 2A
1612 and B).

1613 **Formulation containing LXA4 inhibits the histopathological damage induced by UVB** 1614 **radiation, reducing apoptosis of keratinocytes, epidermal thickness, collagen** 1615 **degradation and mast cells**

1616 Oxidative stress induced by UVB radiation can directly cause damage to epidermal
1617 keratinocytes by DNA damage, damage of cellular enzymes, or damage to cell membrane
1618 structures through lipid oxidation [33]. The treatment with the formulation containing LXA4

1619 inhibited the formation of sunburn cells compared with the irradiated control groups (Figure
1620 3). Inflammation caused by UVB increases epidermal thickening and degradation collagen,
1621 resulting from increased cell migration and proliferation [34]. Additionally, the UVB radiation
1622 cause increase of mast cells that secrete mediators that trigger infammation and recruit other
1623 leukocytes such as neutrophils. In present study, the topical treatment with formulation
1624 containing LXA4 reduced epidermal thickness dorsal (Figure 4), collagen degradation (Figure
1625 5) and decreased the
1626 number of mast cells compared to the irradiated controls groups (Figure 6). No significant
1627 effects were observed in mice treated by control formulation without LXA4.

1628 **Formulation containing LXA4 prevents UVB radiation-induced decrease of antioxidant**
1629 **capacity**

1630 UVB radiation decreased the skin ferric reducing ability (FRAP) (Figure 7A) compared to
1631 non-irradiated mice group. In turn, the treatment with LXA4 containing formulation inhibited
1632 UVB radiation-induced depletion of FRAP, which were maintained at similar level of the non-
1633 irradiated control group (Figure 7A). UVB radiation also reduced the catalase activity and
1634 GSH levels, which was unaffected by control formulation without LXA4. In line with the FRAP
1635 result, LXA4 containing formulation was able to inhibit the depletion of catalase (Figure 7B)
1636 and reduced glutathione (Figure 7C). No significant effects were observed in mice treated by
1637 control formulation without LXA4 (Figure 7).

1638 **Formulation containing LXA4 inhibits UVB radiation-induced $O_2^{\cdot-}$ production and LPO**
1639 **of skin**

1640 Superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) is an important source of ROS that is stimulated by UVB. UVB
1641 induces the production of $O_2^{\cdot-}$, which reacts with hydrogen peroxide (H_2O_2) generating the
1642 cytotoxic hydroxyl radical ($\cdot OH$). The $\cdot OH$ radical initiates the process of lipid peroxidation
1643 (LPO), which induces pro-inflammatory products that can damage DNA. In addition, high
1644 levels of peroxidation cause harmful effects on biological systems, such as loss of fluidity,
1645 inactivation of membrane enzymes and receptors, and increased ionic permeability, leading

1646 to cell membrane disruption [35], [36]. UVB radiation also increased skin LPO while
1647 treatment with formulation containing LXA4 inhibited this parameter reaching similar levels as
1648 for non-irradiated control group (Figure 8A). In this study, $O_2^{\cdot-}$ production was induced by
1649 UVB in the skin, while treatment with formulation containing LXA4 inhibited this production
1650 reaching non-irradiated control group levels (Figure 8B). No significant effects were observed
1651 in mice treated by control formulation without LXA4 (Figure 8).

1652 **Discussion**

1653 Solar UVB radiation (290–320 nm) is the most important environmental factor involved in the
1654 pathogenesis of skin cancers. The genotoxic properties of UVB radiation include mainly
1655 induction of oxidative stress, photoaging and photocarcinogenesis [37], [38].

1656 Previous studies have already shown that new families of lipid mediators, called lipoxins,
1657 resolvins, protectins and maresins have a potent effect on resolving inflammation. We have
1658 recently demonstrated that the systemic treatment with lipoxin A4 (LXA4), maresin 1 (MaR1)
1659 and resolvin D1 (RvD1) was efficient in reducing inflammation and oxidative stress in model
1660 a UVB-induced skin lesion in hairless mice [13], [29], [39]. Other studies have also reported
1661 that the LXA4 was able attenuating recruitment of neutrophils, to inhibit the their chemotaxis,
1662 adhesion and transmigration through vascular endothelial [40], [41] and epithelial [42] cells
1663 and by down-regulating production chemokine [43], [44]. Furthermore, the anti-inflammatory
1664 effect of LXA4 have been associated with increased non-phlogistic phagocytosis of apoptotic
1665 neutrophils by macrophages [45].

1666 In the present study, we investigated the effect of topical treatment with LXA4 (30 ng per
1667 mouse) embedded in emulsion in reducing inflammation and oxidative stress UVB-induced in
1668 hairless mice. Neutrophils are among the first cells to respond to injury and microbial
1669 invasion alarms [46]. Formulation containing LXA4 inhibited neutrophils recruitment (MPO),
1670 suggesting that this mediator reduces inflammation. This data is corroborated by the
1671 observation of reduced skin edema in group mice treated with formulation containing LXA4.

1672 The effects observed with formulation containing LXA4 in our study are in agreement with
1673 previous findings that showed that LXA4 attenuates neutrophil chemotaxis, endothelial cell
1674 adhesion, transendothelial and transepithelial migration and degranulation [40], [42], [47], in
1675 addition to reducing skin edema and MPO in the UVB-induced acute injury model when
1676 administered intraperitoneally [13].

1677 Studies have already shown that UVB causes induction of the metalloprotease-9 enzyme
1678 (MMP-9), responsible for damage to collagen and elastin (extracellular matrix) in the
1679 epidermis, through the upregulation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B [48], [49].
1680 Furthermore, UVB radiation induces keratinocyte apoptosis, degradation collagen and
1681 number mast cell enlargement [50], [51]. Our results showed that topical treatment with
1682 formulation containing LXA4 reduced MMP-9 activity, keratinocyte apoptosis (sunburn cells),
1683 collagen degradation and the number of mast cells. Consistent with our findings,
1684 experimental studies have already shown that LXA4 treatment suppresses MMP-2 and
1685 MMP-9 activity [13], [52].

1686 Inflammation caused by UVB exposure still alters the skin tissue, visualized by epidermal
1687 thickening, which was reduced with formulation containing LXA4 treatment. Similarly, other
1688 lipid mediators such as MaR1 and RvD1 have been shown to reduce keratinocyte apoptosis,
1689 epidermal thickening and mast cell numbers [29], [39]. In addition, the systemic treatment
1690 with LXA4 has also been shown to reduce epidermal thickening, collagen degradation and
1691 the sunburn cells UVB-induced [13].

1692 Another deleterious effect on the body observed after exposure to UVB radiation is the
1693 excessive production of ROS, which can initiate lipid peroxidation, inactivate stress-related
1694 antioxidant proteins, and aggravate skin damage [2], [7]. The increase in lipid peroxidation
1695 and hydroxyl radical production, in addition to the decrease in the skin's antioxidation
1696 capacity, observed by the reduction in the activity of FRAP and the endogenous antioxidants

1697 CAT and GSH have been used as markers of UVB-induced oxidative stress [2], [13], [22],
1698 [29], [39].

1699 The topical treatment with formulation containing LXA4 not only reduced oxidative stress, but
1700 also improved the antioxidant capacity of the skin after exposure to UVB irradiation by
1701 maintaining catalase and GSH at basal levels. Hydrogen peroxide is converted to water and
1702 oxygen by the enzyme catalase [53], [54]. GSH directly eliminates ROS or indirectly acting
1703 as a glutathione peroxidase coenzyme [55], [56].

1704 Additionally, our results suggest that LXA4 can significantly improve UVB induced oxidative
1705 stress, reducing LOOH and O₂⁻ production and in addition to improving the skin antioxidant
1706 capacity, increasing ferric reduction (FRAP assay). Similarly, antioxidative properties of LXA4
1707 and others lipics mediartores have been reported in many other oxidative stress related
1708 studys [13], [29], [39], [57].

1709 The anti-inflammatory and pro-resolving activities of LXA4 were correlated with the activation
1710 of the specific G protein-coupled receptor (ALXR/FPR2), known as one of the receptors
1711 involved in the resolution of inflammation [58]. Recent unpublished studies by the group
1712 showed that UVB increases mRNA expression for the ALXR / FPR2 receptor. Thus, the use
1713 of molecules that control the inflammation via activation of the ALXR/FPR2 receptor, such as
1714 lipoxins, holds promise. This finding corroborates the beneficial effects observed in the
1715 present study, in which we demonstrated that topical treatment with a formulation containing
1716 LXA4 reduced UVB-induced skin damage.

1717 The topical administration of medications, in addition to being safer when compared to other
1718 routes, has already been shown to be efficient in reducing damage caused by UVB [21], [22],
1719 [27]. Thus, the topical formulation containing LXA4 proved to be a promising agent for the
1720 treatment of damage caused by UVB. The anti-inflammatory and pro-resolution effect of this
1721 formulation is possibly associated with ALXR/FPR2 receptor activation.

1722

1723 **References**

- 1724 [1] C. Parrado, S. Mercado-Saenz, A. Perez-Davo, Y. Gilaberte, S. Gonzalez, e A.
1725 Juarranz, “Environmental Stressors on Skin Aging. Mechanistic Insights”, *Front.*
1726 *Pharmacol.*, vol. 10, p. 759, jul. 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.00759.
- 1727 [2] R. M. Martinez *et al.*, “Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and
1728 Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice”, *J. Nat. Prod.*, vol. 78, n° 7, p. 1647–
1729 1655, jul. 2015, doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00198.
- 1730 [3] L. Christensen, A. Suggs, e E. Baron, “Ultraviolet photobiology in dermatology”, in
1731 *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 996, Springer New York LLC,
1732 2017, p. 89–104.
- 1733 [4] K. M. Hanson e R. M. Clegg, “Observation and Quantification of Ultraviolet-induced
1734 Reactive Oxygen Species in Ex Vivo Human Skin¶”, *Photochem. Photobiol.*, vol. 76,
1735 n° 1, p. 57–63, jul. 2002, doi: 10.1562/0031-8655(2002)0760057oaqoui2.0.co2.
- 1736 [5] H. K. Kim, “Protective effect of garlic on cellular senescence in UVB-exposed HaCaT
1737 human keratinocytes”, *Nutrients*, vol. 8, n° 8, p. 464, ago. 2016, doi:
1738 10.3390/nu8080464.
- 1739 [6] Y. Xu e G. J. Fisher, “Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in
1740 skin photoaging”, *J. Dermatological Sci. Suppl.*, vol. 1, n° 2, p. S1–S8, dez. 2005, doi:
1741 10.1016/j.descs.2005.06.002.
- 1742 [7] S. Pillai, C. Oresajo, e J. Hayward, “Ultraviolet radiation and skin aging: Roles of
1743 reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for
1744 prevention of inflammation-induced matrix degradation - A review”, *International*
1745 *Journal of Cosmetic Science*, vol. 27, n° 1. John Wiley & Sons, Ltd, p. 17–34, fev. 01,
1746 2005, doi: 10.1111/j.1467-2494.2004.00241.x.
- 1747 [8] T. Quan, Z. Qin, W. Xia, Y. Shao, J. J. Voorhees, e G. J. Fisher, “Matrix-degrading

- 1748 metalloproteinases in photoaging”, in *Journal of Investigative Dermatology Symposium*
1749 *Proceedings*, 2009, vol. 14, n° 1, p. 20–24, doi: 10.1038/jidsymp.2009.8.
- 1750 [9] J. Kim *et al.*, “Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-
1751 metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts”, *J. Ethnopharmacol.*, vol.
1752 137, n° 1, p. 427–433, set. 2011, doi: 10.1016/j.jep.2011.04.072.
- 1753 [10] C. N. Serhan *et al.*, “Maresins: novel macrophage mediators with potent
1754 antiinflammatory and proresolving actions.”, *J. Exp. Med.*, vol. 206, n° 1, p. 15–23, jan.
1755 2009, doi: 10.1084/jem.20081880.
- 1756 [11] L. József, C. Zouki, N. A. Petasis, C. N. Serhan, e J. G. Filep, “Lipoxin A4 and aspirin-
1757 triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-κB and AP-1 activation,
1758 and IL-8 gene expression in human leukocytes”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, n° 20,
1759 2002.
- 1760 [12] F. Yang *et al.*, “Regional arterial infusion with lipoxin A4 attenuates experimental
1761 severe acute pancreatitis”, *PLoS One*, vol. 9, n° 9, p. 108525, set. 2014, doi:
1762 10.1371/journal.pone.0108525.
- 1763 [13] R. M. Martinez *et al.*, “Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and
1764 oxidative stress in mice”, *J. Dermatol. Sci.*, vol. 91, n° 2, p. 164–174, ago. 2018, doi:
1765 10.1016/j.jdermsci.2018.04.014.
- 1766 [14] X. Zhu, X. Peng, J. Lin, Y. Zhang, H. He, e G. Zhao, “Lipoxin A4 activates ALX/FPR2
1767 to attenuate inflammation in *Aspergillus fumigatus* keratitis”, *Int. Immunopharmacol.*,
1768 vol. 96, p. 107785, jul. 2021, doi: 10.1016/j.intimp.2021.107785.
- 1769 [15] Y. Li *et al.*, “Lipoxin A4 protects against paraquat-induced acute lung injury by
1770 inhibiting the TLR4/MyD88-mediated activation of the NF-κB and PI3K/AKT
1771 pathways”, *Int. J. Mol. Med.*, vol. 47, n° 5, p. 1–13, maio 2021, doi:
1772 10.3892/ijmm.2021.4919.

- 1773 [16] L. Zong *et al.*, “Lipoxin A4 Attenuates Cell Invasion by Inhibiting ROS/ERK/MMP
1774 Pathway in Pancreatic Cancer”, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, 2016, doi:
1775 10.1155/2016/6815727.
- 1776 [17] X. Y. Zhou *et al.*, “Effects of lipoxin A4 on lipopolysaccharide induced proliferation and
1777 reactive oxygen species production in RAW264.7 macrophages through modulation of
1778 G-CSF secretion”, *Inflamm. Res.*, vol. 56, n° 8, p. 324–333, ago. 2007, doi:
1779 10.1007/s00011-007-7012-7.
- 1780 [18] L. Wu *et al.*, “Lipoxin A4 Activates Nrf2 Pathway and Ameliorates Cell Damage in
1781 Cultured Cortical Astrocytes Exposed to Oxygen-Glucose Deprivation/Reperfusion
1782 Insults”, *J. Mol. Neurosci.*, vol. 56, n° 4, p. 848–857, ago. 2015, doi: 10.1007/s12031-
1783 015-0525-6.
- 1784 [19] Y. M. Fonseca, C. D. Catini, F. T. M. C. Vicentini, J. C. Cardoso, R. L. Cavalcanti De
1785 Albuquerque Junior, e M. J. Vieira Fonseca, “Efficacy of marigold extract-loaded
1786 formulations against UV-induced oxidative stress.”, *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, n° 6, p.
1787 2182–93, jun. 2011, doi: 10.1002/jps.22438.
- 1788 [20] M. Z. Campanini *et al.*, “Topical formulations containing Pimenta pseudocaryophyllus
1789 extract: In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy against UV-B-induced oxidative
1790 stress”, *AAPS PharmSciTech*, vol. 15, n° 1, p. 86–95, 2014, doi: 10.1208/s12249-013-
1791 0049-8.
- 1792 [21] R. Casagrande, S. R. Georgetti, W. A. Verri, D. J. Dorta, A. C. dos Santos, e M. J. V
1793 Fonseca, “Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-
1794 induced oxidative stress in hairless mice.”, *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 84, n° 1,
1795 p. 21–7, jul. 2006, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2006.01.006.
- 1796 [22] R. M. Martinez *et al.*, “Topical Formulation Containing Naringenin: Efficacy against
1797 Ultraviolet B Irradiation-Induced Skin Inflammation and Oxidative Stress in Mice.”,

- 1798 *PLoS One*, vol. 11, n° 1, p. e0146296, jan. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0146296.
- 1799 [23] R. M. Martinez *et al.*, “Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and
1800 Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice.”, *J. Nat. Prod.*, vol. 78, n° 7, p. 1647–55,
1801 jul. 2015, doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00198.
- 1802 [24] R. M. Martinez *et al.*, “Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and
1803 oxidative stress in mice”, *J. Dermatol. Sci.*, vol. 0, n° 0, doi:
1804 10.1016/J.JDERMSCI.2018.04.014.
- 1805 [25] R. M. Martinez *et al.*, “Hesperidin methyl chalcone inhibits oxidative stress and
1806 inflammation in a mouse model of ultraviolet B irradiation-induced skin damage.”, *J.*
1807 *Photochem. Photobiol. B.*, vol. 148, p. 145–53, jul. 2015, doi:
1808 10.1016/j.jphotobiol.2015.03.030.
- 1809 [26] A. L. Ivan *et al.*, “Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation
1810 and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro”, *J*
1811 *Photochem Photobiol B*, vol. 138, p. 124–133, 2014, doi:
1812 10.1016/j.jphotobiol.2014.05.010.
- 1813 [27] M. Z. Campanini *et al.*, “Efficacy of topical formulations containing *Pimenta*
1814 *pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in
1815 hairless mice”, *J Photochem Photobiol B*, vol. 127, p. 153–160, 2013, doi:
1816 10.1016/j.jphotobiol.2013.08.007.
- 1817 [28] A. V. Sorokin *et al.*, “Bioactive Lipid Mediator Profiles in Human Psoriasis Skin and
1818 Blood”, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 138, n° 7, p. 1518–1528, jul. 2018, doi:
1819 10.1016/j.jid.2018.02.003.
- 1820 [29] P. Saito *et al.*, “The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and
1821 Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice”, *Front. Pharmacol.*, vol. 9,
1822 p. 1242, out. 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.01242.

- 1823 [30] V. Katalinic, D. Modun, I. Music, e M. Boban, "Gender differences in antioxidant
1824 capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate;
1825 ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays.", *Comp. Biochem.*
1826 *Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 140, n° 1, p. 47–52, jan. 2005, doi:
1827 10.1016/j.cca.2005.01.005.
- 1828 [31] P. Saito *et al.*, "The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and
1829 Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice", *Front. Pharmacol.*, vol. 9,
1830 out. 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.01242.
- 1831 [32] T. Kobayashi, S. Hattori, Y. Nagai, e S. Tajima, "Differential regulation of the
1832 secretions of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1
1833 from human keratinocytes in culture", *IUBMB Life*, vol. 50, n° 3, p. 221–226, 2000, doi:
1834 10.1080/152165400300001552.
- 1835 [33] C. Bayerl, S. Taake, I. Moll, e E. G. Jung, "Characterization of sunburn cells after
1836 exposure to ultraviolet light", *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, vol. 11, n° 4,
1837 p. 149–154, ago. 1995, doi: 10.1111/j.1600-0781.1995.tb00157.x.
- 1838 [34] A. Tewari, M. M. L. Grage, G. I. Harrison, R. Sarkany, e A. R. Young, "UVA1 is skin
1839 deep: molecular and clinical implications.", *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 12, n°
1840 November 2016, p. 95–103, 2013, doi: 10.1039/c2pp25323b.
- 1841 [35] N. J. Sullivan *et al.*, "UV light B-mediated inhibition of skin catalase activity promotes
1842 Gr-1 + CD11b+ myeloid cell expansion", *J. Invest. Dermatol.*, vol. 132, n° 3 PART 1, p.
1843 695–702, mar. 2012, doi: 10.1038/jid.2011.329.
- 1844 [36] H. LINGNERT, K. VALLENTIN, e C. E. ERIKSSON, "MEASUREMENT OF
1845 ANTIOXIDATIVE EFFECT IN MODEL SYSTEM", *J. Food Process. Preserv.*, vol. 3, n°
1846 2, p. 87–103, abr. 1979, doi: 10.1111/j.1745-4549.1979.tb00574.x.
- 1847 [37] J. L. Ravanat, T. Douki, e J. Cadet, "Direct and indirect effects of UV radiation on DNA

- 1848 and its components”, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 63, n° 1–3, p. 88–102, out.
1849 2001, doi: 10.1016/S1011-1344(01)00206-8.
- 1850 [38] N. M. Wikonkal e D. E. Brash, “Ultraviolet radiation induced signature mutations in
1851 photocarcinogenesis”, in *Journal of Investigative Dermatology Symposium*
1852 *Proceedings*, 1999, vol. 4, n° 1, p. 6–10, doi: 10.1038/sj.jidsp.5640173.
- 1853 [39] T. L. C. Cezar *et al.*, “Treatment with maresin 1, a docosahexaenoic acid-derived pro-
1854 resolution lipid, protects skin from inflammation and oxidative stress caused by UVB
1855 irradiation”, *Sci. Rep.*, vol. 9, n° 1, p. 1–14, dez. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-
1856 39584-6.
- 1857 [40] J. G. Filep, C. Zouki, N. A. Petasis, M. Hachicha, e C. N. Serhan, “Anti-Inflammatory
1858 Actions of Lipoxin A4 Stable Analogs Are Demonstrable in Human Whole Blood:
1859 Modulation of Leukocyte Adhesion Molecules and Inhibition of Neutrophil-Endothelial
1860 Interactions”, *Blood*, vol. 94, n° 12, p. 4132–4142, dez. 1999, doi:
1861 10.1182/blood.v94.12.4132.
- 1862 [41] A. Papayianni, C. N. Serhan, e H. R. Brady, “Lipoxin A4 and B4 inhibit leukotriene-
1863 stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells.”, *J. Immunol.*, vol.
1864 156, n° 6, p. 2264–72, mar. 1996, Acessado: jun. 15, 2021. [Online]. Available at:
1865 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8690917>.
- 1866 [42] S. P. Colgan, C. N. Serhan, C. A. Parkos, C. Delp-Archer, e J. L. Madara, “Lipoxin A4
1867 modulates transmigration of human neutrophils across intestinal epithelial
1868 monolayers”, *J. Clin. Invest.*, vol. 92, n° 1, p. 75–82, 1993, doi: 10.1172/JCI116601.
- 1869 [43] S. Sodin-Semrl, B. Taddeo, D. Tseng, J. Varga, e S. Fiore, “ Lipoxin A 4 Inhibits IL-1 β -
1870 Induced IL-6, IL-8, and Matrix Metalloproteinase-3 Production in Human Synovial
1871 Fibroblasts and Enhances Synthesis of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases ”, *J.*
1872 *Immunol.*, vol. 164, n° 5, p. 2660–2666, mar. 2000, doi: 10.4049/jimmunol.164.5.2660.

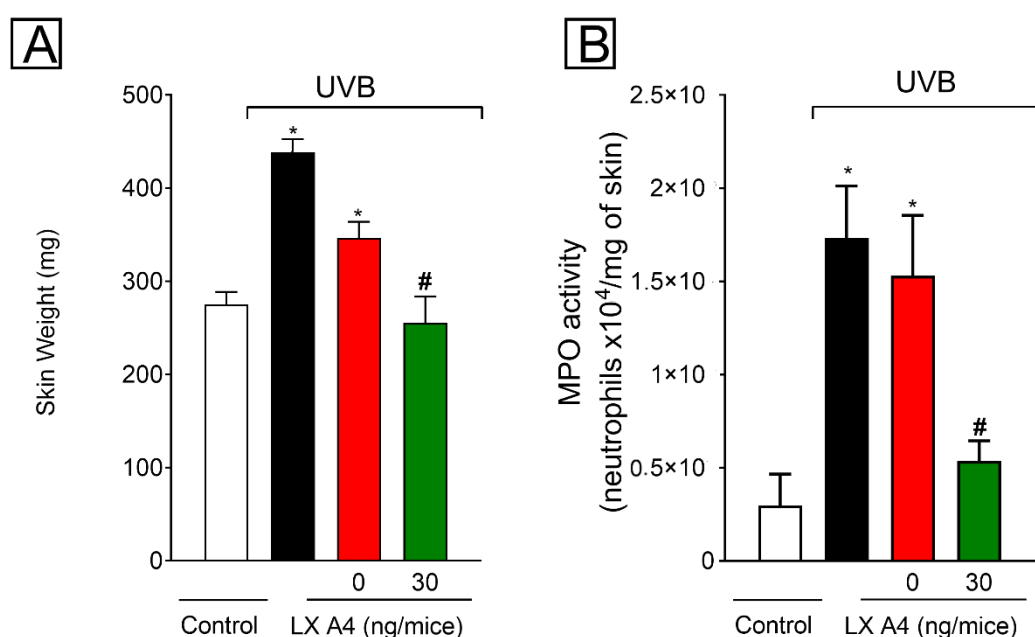
- 1873 [44] K. Gronert, A. Gewirtz, J. L. Madara, e C. N. Serhan, "Identification of a human
1874 enterocyte lipoxin A4 receptor that is regulated by interleukin (IL)-13 and interferon γ
1875 and inhibits tumor necrosis factor α -induced IL-8 release", *J. Exp. Med.*, vol. 187, n^o 8,
1876 p. 1285–1294, abr. 1998, doi: 10.1084/jem.187.8.1285.
- 1877 [45] C. Godson, S. Mitchell, K. Harvey, N. A. Petasis, N. Hogg, e H. R. Brady, "Cutting
1878 Edge: Lipoxins Rapidly Stimulate Nonphlogistic Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils
1879 by Monocyte-Derived Macrophages", *J. Immunol.*, vol. 164, n^o 4, p. 1663–1667, fev.
1880 2000, doi: 10.4049/jimmunol.164.4.1663.
- 1881 [46] I. Tabas e C. K. Glass, "Anti-inflammatory therapy in chronic disease: Challenges and
1882 opportunities", *Science*, vol. 339, n^o 6116. American Association for the Advancement
1883 of Science, p. 166–172, jan. 11, 2013, doi: 10.1126/science.1230720.
- 1884 [47] C. N. Serhan *et al.*, "Design of Lipoxin A4 Stable Analogs That Block Transmigration
1885 and Adhesion of Human Neutrophils", *Biochemistry*, vol. 34, n^o 44, p. 14609–14615,
1886 1995, doi: 10.1021/bi00044a041.
- 1887 [48] G. J. Fisher, Z. Wang, S. C. Datta, J. Varani, S. Kang, e J. J. Voorhees,
1888 "Pathophysiology of Premature Skin Aging Induced by Ultraviolet Light", *N. Engl. J.*
1889 *Med.*, vol. 337, n^o 20, p. 1419–1429, nov. 1997, doi: 10.1056/nejm199711133372003.
- 1890 [49] G. J. Fisher *et al.*, "Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid
1891 antagonism", *Nature*, vol. 379, n^o 6563, p. 335–339, jan. 1996, doi:
1892 10.1038/379335a0.
- 1893 [50] M. A. Grimaldeston, A. Simpson, J. J. Finlay-Jones, e P. H. Hart, "The effect of
1894 ultraviolet radiation exposure on the prevalence of mast cells in human skin", *Br. J.*
1895 *Dermatol.*, vol. 148, n^o 2, p. 300–306, fev. 2003, doi: 10.1046/j.1365-
1896 2133.2003.05113.x.
- 1897 [51] L. Benassi *et al.*, "1,25-dihydroxyvitamin D3, transforming growth factor β 1, calcium,

- 1898 and ultraviolet B radiation induce apoptosis in cultured human keratinocytes”, *J.*
1899 *Invest. Dermatol.*, vol. 109, n° 3, p. 276–282, 1997, doi: 10.1111/1523-
1900 1747.ep12335756.
- 1901 [52] R. F. Wu *et al.*, “Lipoxin A4 Suppresses Estrogen-Induced Epithelial–Mesenchymal
1902 Transition via ALXR-Dependent Manner in Endometriosis”, *Reprod. Sci.*, vol. 25, n° 4,
1903 p. 566–578, abr. 2018, doi: 10.1177/1933719117718271.
- 1904 [53] D. J. D’Orazio, Z. Haiman, e A. MacFadyen, “Accretion into the central cavity of a
1905 circumbinary disc”, *Mon. Not. R. Astron. Soc.*, vol. 436, n° 4, p. 2997–3020, dez. 2013,
1906 doi: 10.1093/mnras/stt1787.
- 1907 [54] K. U. Schallreuter *et al.*, “In Vivo and In Vitro Evidence for Hydrogen Peroxide (H₂O
1908 2) Accumulation in the Epidermis of Patients with Vitiligo and its Successful Removal
1909 by a UVB-Activated Pseudocatalase”, *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.*, vol. 4, p.
1910 91–96, 1999, doi: 10.1038/sj.jidsp.5640189.
- 1911 [55] B. Halliwell, “The wanderings of a free radical”, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 46, n° 5, p.
1912 531–542, mar. 2009, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2008.11.008.
- 1913 [56] M. A. Zaid, F. Afaq, D. N. Syed, M. Dreher, e H. Mukhtar, “Inhibition of UVB-mediated
1914 Oxidative Stress and Markers of Photoaging in Immortalized HaCaT Keratinocytes by
1915 Pomegranate Polyphenol Extract POMx”, *Photochem. Photobiol.*, vol. 83, n° 4, p.
1916 882–888, jul. 2007, doi: 10.1111/J.1751-1097.2007.00157.X.
- 1917 [57] Q. Zhao *et al.*, “Lipoxin A4 preconditioning and postconditioning protect myocardial
1918 ischemia/reperfusion injury in rats”, *Mediators of Inflammation*, vol. 2013. Mediators
1919 Inflamm, 2013, doi: 10.1155/2013/231351.
- 1920 [58] O. Corminboeuf e X. Leroy, “FPR2/ALXR agonists and the resolution of inflammation”,
1921 *J. Med. Chem.*, vol. 58, n° 2, p. 537–559, jan. 2015, doi: 10.1021/JM501051X.
- 1922

1923 **Figures**

1924 **Figure 1.** Topical formulation containing LX A4 reduces UVB irradiation-induced skin edema
 1925 and MPO activity. The skin edema (A) and MPO activity (B) were determined in samples
 1926 collected 12 h after the end of radiation. Results are presented as tissue weight in milligrams
 1927 for skin edema and as neutrophils $\times 10^4$ per milligram of tissue for MPO activity. Bars
 1928 represent means \pm SEM of 6 mice per group and are representative of two separate
 1929 experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's
 1930 test. * $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control and # $p < 0.05$ compared to the
 1931 untreated irradiated control group (black bar) and irradiated control group treated with base
 1932 formulation (red bar).

1933



1934

1935

1936

1937

1938

1939

1940

1941

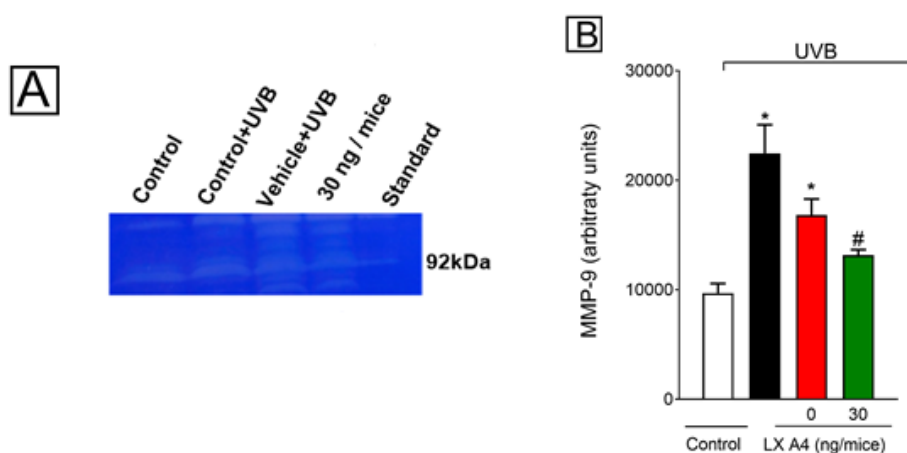
1942

1943

1944

1945 **Figure 2.** Topical formulation containing LXA4 inhibited UVB irradiation-induced MMP-9
1946 activity in the skin. MMP-9 activity was determined in samples dissected 12 h after the
1947 radiation. Image of gelatin zymography is presented in panel A and skin MMP-9 activity in
1948 panel B. MMP-9 MW 92 kDa. Results are presented as arbitrary units per sample for MMP-9
1949 activity. Bars represent means \pm SEM of 6 mice per group and are representative of two
1950 separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by
1951 Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control and # $p < 0.05$ compared to
1952 the untreated irradiated control group (black bar) and irradiated control group treated with
1953 base formulation (red bar).

1954



1955

1956

1957

1958

1959

1960

1961

1962

1963

1964

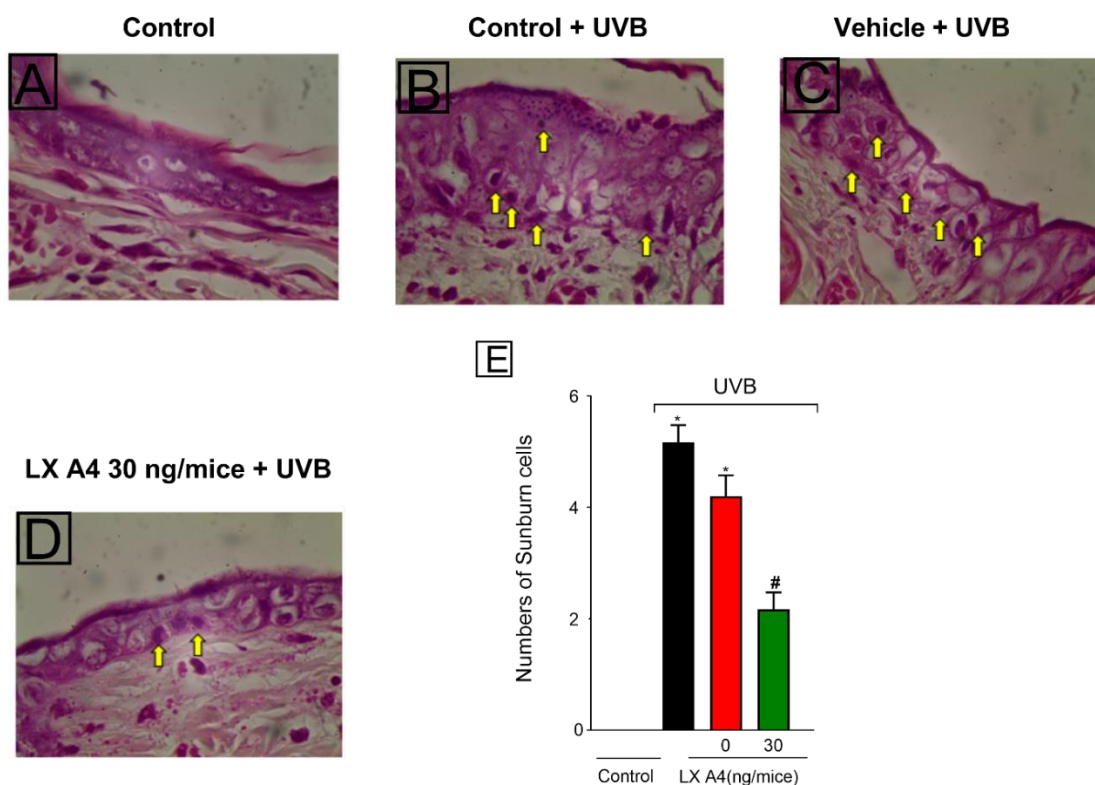
1965

1966

1967

1968 **Figure 3.** Topical formulation containing LX A4 reduced UVB irradiation-induced sunburn
 1969 cells formation. The number of sunburn cells was determined in samples dissected 12 h after
 1970 the radiation and stained with H&E. Representative images of non-irradiated control (A),
 1971 irradiation control (B), irradiated treated with formulation 1 without LX A4 (C), irradiated
 1972 treated with 30 ng of LX A4/mice (D). Quantitative analysis of sunburn cells in experimental
 1973 groups is presented per field in panel E. Original magnification 100x; 100 μm. Bars represent
 1974 means ± SEM of 6 mice per group and are representative of two separate experiments.
 1975 Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey’s test. * p < 0.05
 1976 compared to the non-irradiated control and # p < 0.05 compared to the untreated irradiated control
 1977 group (black bar) and irradiated control group treated with base formulation (red bar).

1978



1979

1980

1981

1982

1983

1984

1985

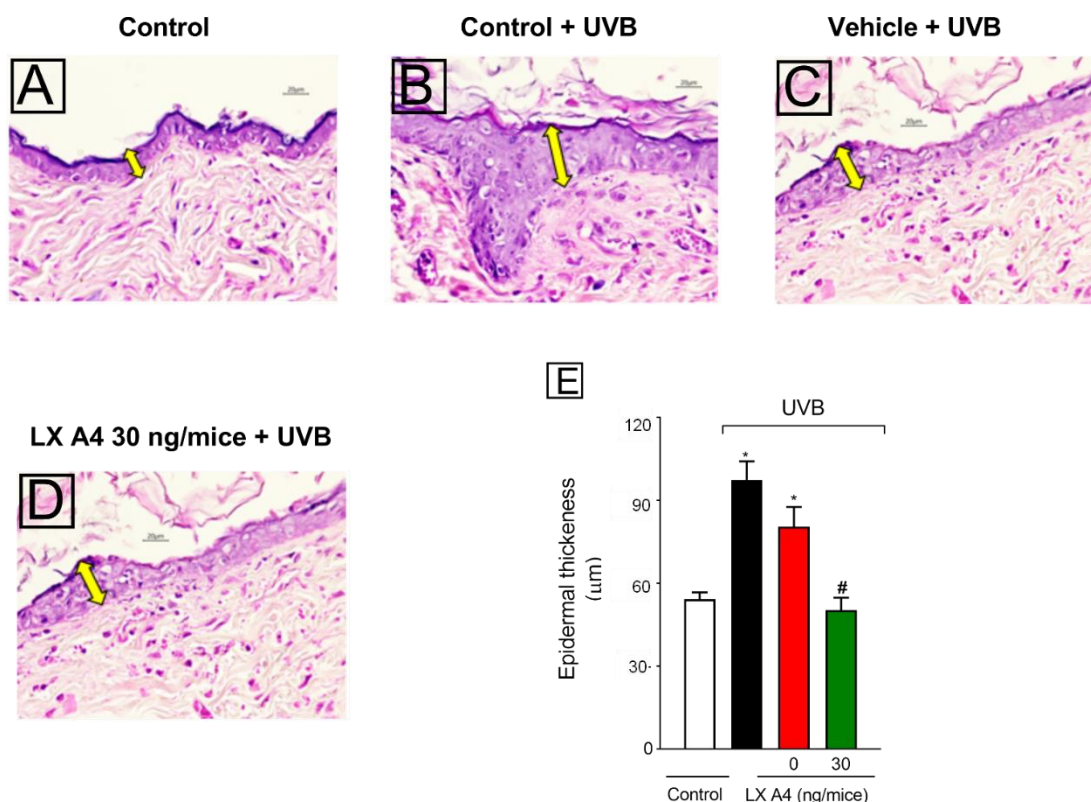
1986

1987

1988

1989 **Figure 4.** Topical formulation containing LXA4 reduced UVB irradiation-induced epidermal
 1990 thickening. The epidermal thickness was determined in samples dissected 12 h after the
 1991 radiation and stained with H&E. Representative images of non-irradiated control (A),
 1992 irradiation control (B), irradiated treated with formulation 1 without LXA4 (C), irradiated
 1993 treated with 30 ng/mice of LXA4 (D). Epidermal thickness of experimental groups is
 1994 presented in μm in panel E. Original magnification 40x; 100 μm . Bars represent means \pm
 1995 SEM of 6 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical
 1996 analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to
 1997 non-irradiated group and # $p < 0.05$ compared to the untreated irradiated control group (black
 1998 bar) and irradiated control group treated with base formulation (red bar).

1999



2000

2001

2002

2003

2004

2005

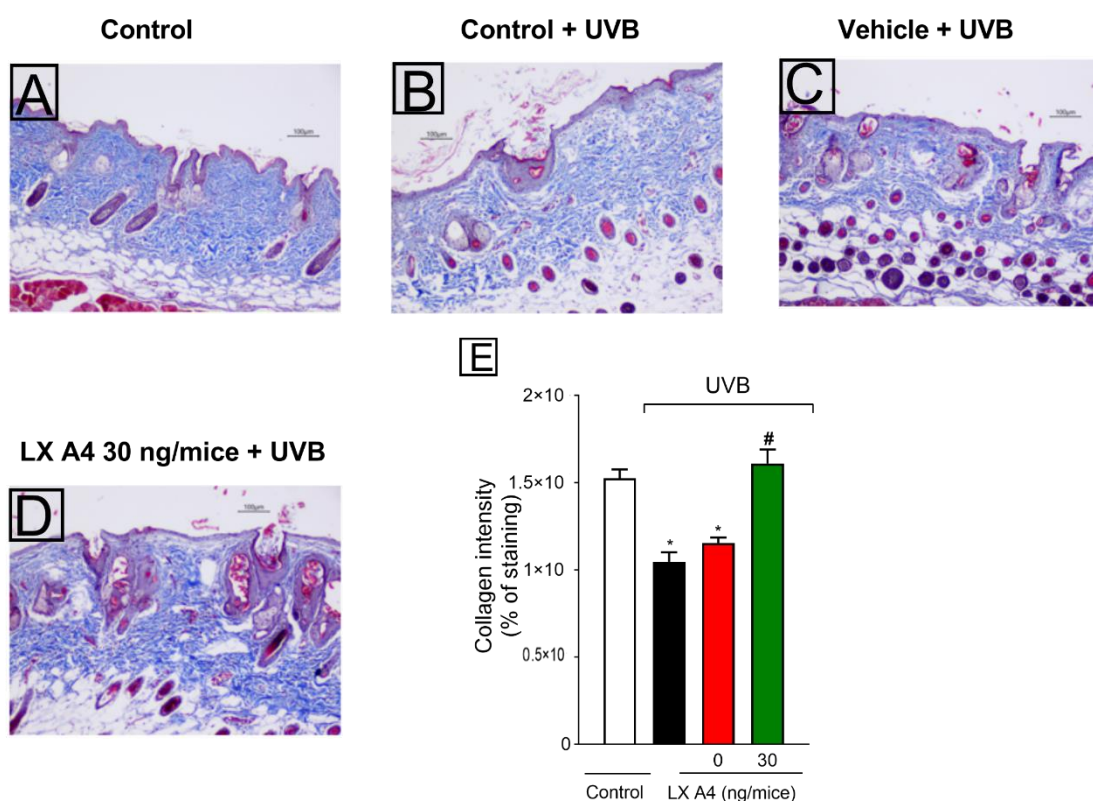
2006

2007

2008

2009 **Figure 5.** Topical formulation containing LXA4 inhibited UVB irradiation-induced collagen
 2010 degradation in the skin. Degradation of collagen was determined in samples dissected 12 h
 2011 after the radiation and stained with Masson's trichrome. Representative images of non-
 2012 irradiated control (A), irradiation control (B), irradiated treated with formulation without LXA4
 2013 (C), irradiated treated with 30 ng/mice of LXA4 (D). Quantitative analysis of collagen
 2014 degradation of experimental groups is presented as percentage of staining in panel E.
 2015 Original magnification 20x; 100 μ m. Bars represent means \pm SEM of 6 mice per group and
 2016 are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-
 2017 way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to non-irradiated group; # $p < 0.05$
 2018 compared to the untreated irradiated control group (black bar) and irradiated control group
 2019 treated with base formulation (red bar).

2020



2021

2022

2023

2024

2025

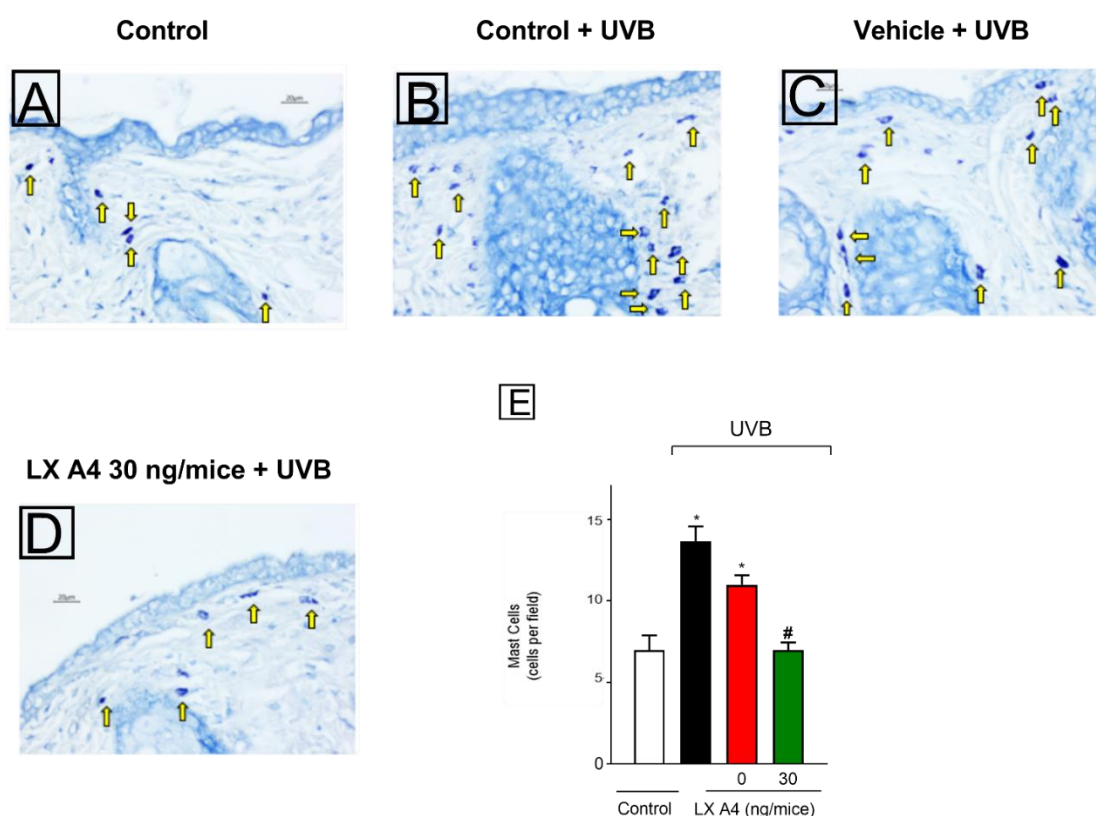
2026

2027

2028

2029 **Figure 6** Topical formulation containing LXA4 reduced UVB irradiation-induced mast cells
 2030 counts. The proliferation of mast cells was determined in samples dissected 12 h after the
 2031 radiation and stained with toluidine blue. Representative images of non-irradiated control (A),
 2032 irradiation control (B), irradiated treated with formulation without LXA4 (C), irradiated treated
 2033 with 30 ng/mice of LXA4 (D). Mast cells count of experimental groups is presented per field in
 2034 panel E. Original magnification 40x; 100 μ m. Bars represent means \pm SEM of 6 mice per group
 2035 and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-
 2036 way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to non-irradiated group and # $p <$
 2037 0.05 compared to the untreated irradiated control group (black bar) and irradiated control group
 2038 treated with base formulation (red bar).

2039



2040

2041

2042

2043

2044

2045

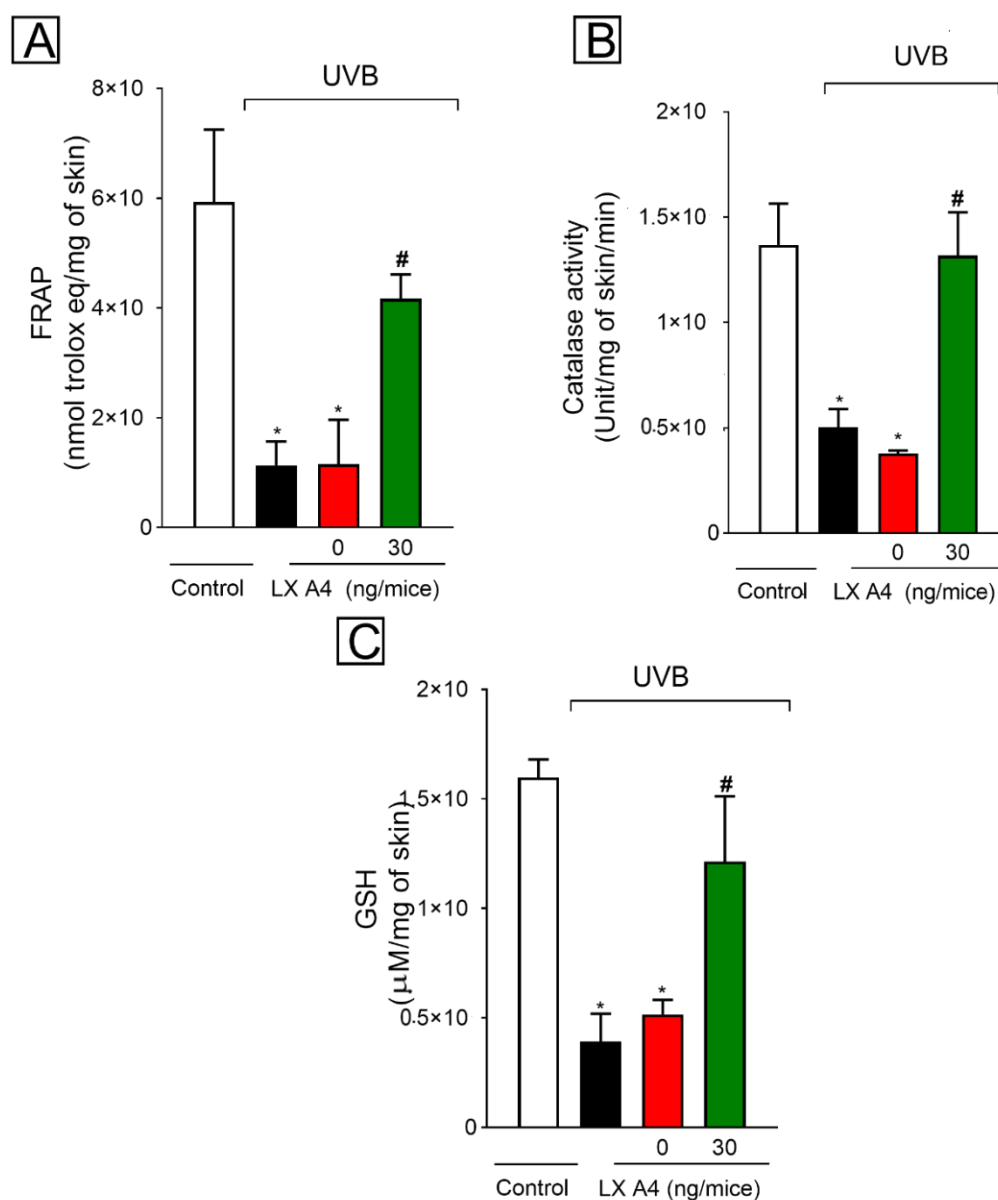
2046

2047

2048

2049 **Figure 7.** Topical formulation containing LX A4 inhibited UVB irradiation-induced decrease of
 2050 skin antioxidant capacity. Total antioxidant capacity FRAP (A) and GSH levels (C) were
 2051 determined in samples dissected 12 h after the radiation. For the catalase assay (B),
 2052 samples were dissected 2 h after the radiation. Bars represent means \pm SEM of 6 mice per
 2053 group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was
 2054 performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to non-
 2055 irradiated group and # $p < 0.$ compared to the untreated irradiated control group (black bar)
 2056 and irradiated control group treated with base formulation (red bar).

2057



2058

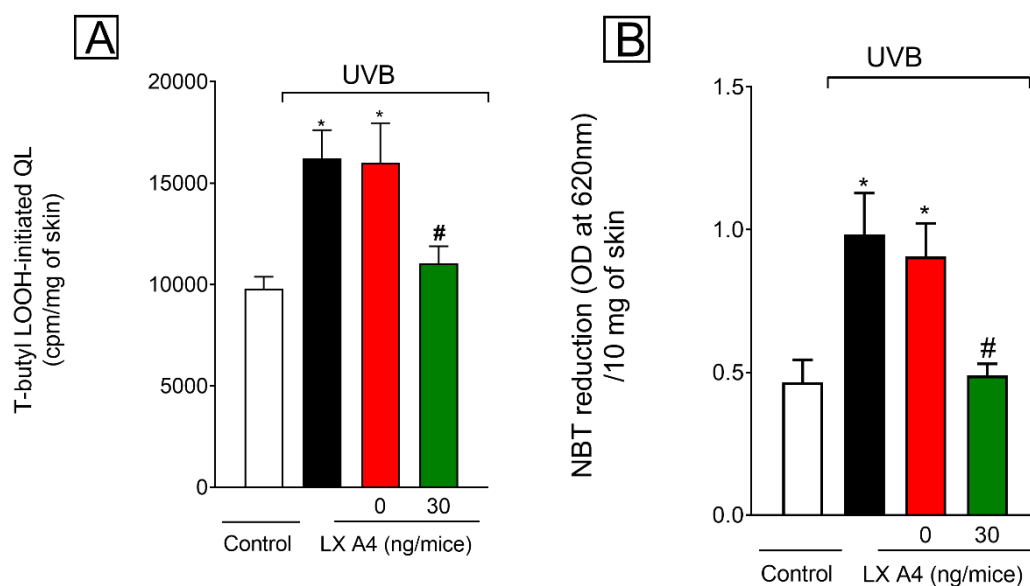
2059

2060

2061

2062 **Figure 8.** Topical formulation containing LXA4 inhibited UVB irradiation-induced lipid
2063 peroxidation and superoxide anion production. Lipid peroxidation (LOOH) (A) and
2064 Superoxide anion production (NBT reduction) (B) were determined in samples dissected 2 h
2065 after the radiation. Bars represent means \pm SEM of 6 mice per group and are representative
2066 of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA
2067 followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control and # $p < 0.05$
2068 compared to the untreated irradiated control group (black bar) and irradiated control group
2069 treated with t base formulation (red bar).

2070



2071

2072

2073

2074

2075

2076

2077

2078

2079

2080

2081

2082

2083

2084 5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

2085

2086 A exposição à radiação UVB induz profundas mudanças biológicas na pele, pois
2087 afeta os antioxidantes endógenos que protegem as células contra os efeitos deletérios
2088 causados pelas EROs. Os efeitos podem ser agudos como o eritema, inflamação local e até
2089 mesmo crônico como o fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese. Por isso, é necessário o
2090 estudo de novas substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias com o intuito de prevenir e
2091 tratar a pele contra a ação da RUV.

2092 Diante desse quadro é promissor desenvolver terapias para o controle da
2093 inflamação e estresse oxidativo induzidos pela radiação UVB, tendo como alvo seus
2094 mecanismos fisiopatológicos. Estas terapias podem ser consolidadas baseando-se na
2095 redução ou resolução da inflamação tratando o processo desencadeado pela radiação UVB
2096 com mediadores lipídicos anti-inflamatórios/pró-resolução como a 7(R) Maresina 1 e a
2097 Lipoxina A4.

2098 O desenvolvimento de formulações para tratamento tópico com efeito local é uma
2099 abordagem de via de administração importante para o tratamento cutâneo. A aplicação
2100 tópica possibilita a administração de medicamentos de forma segura e efetiva, além de
2101 evitar efeitos como irritação gastrointestinal, toxicidade sistêmica e metabolismo hepático.
2102 Diante disso, a administração de moléculas anti-inflamatórias e antioxidantes por via tópica
2103 tem se mostrado uma alternativa importante e eficaz para a proteção da pele contra os
2104 danos inflamatórios e oxidativos causados pela UVB.

2105 Apesar de pesquisas a respeito da possível aplicação terapêutica dos lipídios MaR1
2106 e LXA4, a investigação dos efeitos terapêuticos de formulações tópicas contendo esses
2107 mediadores *in vivo* em danos fotooxidativos cutâneos ainda não havia sido avaliados. Assim,
2108 o estudo da aplicabilidade de formulações tópicas contendo MaR1 ou LXA4 na
2109 fotoquimioprevenção é uma inovação do presente trabalho.

2110 Os resultados *in vivo* deste trabalho mostraram que o tratamento tópico com os
2111 lipídios MaR1 e LXA4 incorporados em creme e gel creme respectivamente protegeu a pele
2112 contra a inflamação e contra os danos oxidativos induzidos pela radiação UVB comparado
2113 com o grupo controle irradiado que não recebeu tratamento e com o grupo irradiado que
2114 recebeu tratamento apenas com a base. O efeito antioxidante destas formulações contendo
2115 os lipídios foi relacionado à manutenção do poder redutor do ferro, dos níveis de GSH,
2116 atividade de catalase e redução da produção de ânion superóxido. Somam-se a isso, as
2117 formulações contendo MaR1 e LXA4 também foram capazes de inibir o recrutamento de

2118 neutrófilos, a atividade da MMP-9, a produção de hidroperóxidos lipídicos, a apoptose dos
2119 queratinócitos, o espessamento da epiderme, o número de mastócitos e a degradação de
2120 fibras de colágeno.

2121 Ambas as formulações demonstraram efeitos promissores no modelo utilizado,
2122 contudo uma dose menor da formulação contendo MaR1 foi necessária para produzir os
2123 efeitos descritos neste trabalho. A dose utilizada nesta pesquisa foi 1,5 ng/animal de MaR1
2124 e 30 ng/animal de LXA4. Esta diferença de dose pode ser associada aos receptores que
2125 cada um destes mediadores ativa.

2126 O lípidio MaR1 ativa o receptor LGR6 que é conhecido por promover o reparo e a
2127 regeneração. O receptor LGR6 é amplamente expresso na epiderme e na derme o que
2128 corrobora com o efeito anti-inflamatório e antioxidante observados no presente estudo com a
2129 formulação tópica contendo este mediador.

2130 Já o lípidio LXA4 ativa principalmente os receptores ALXR/FPR2. O receptor
2131 ALXR/FPR2 é expresso em uma variedade de tipos de células, em particular, monócitos,
2132 basófilos, células dendríticas e linfócitos T, o que reforça seu papel na resposta imune-
2133 inflamatória.

2134 Um outro ponto relevante do presente trabalho é o esquema de tratamento
2135 utilizado. A dose proposta para cada lípidio foi dividida em três aplicações, a primeira uma
2136 hora e a segunda 10 minutos antes do início da irradiação e a terceira e última aplicação
2137 logo após o fim da etapa de irradiação. Esta proposta de tratamento possibilita que os
2138 mediadores MaR1 e LXA4 sejam aplicados no órgão a ser tratado, o que melhoraria seu
2139 processo de absorção e interação com as células e tecido alvo. O esquema de tratamento
2140 aplicado nesta pesquisa pode ter contribuído para a resposta anti-inflamatória e pró-
2141 resolutive destes mediadores no modelo de lesão cutânea induzida pela radiação UVB.

2142 Considerando os parâmetros oxidativos e inflamatórios avaliados e o efeito das
2143 formulações contendo MaR1 e LXA4 em reduzir tais parâmetros, sugere-se as formulações
2144 contendo MaR1 e LXA4 como uma nova alternativa terapêutica para o tratamento tópico dos
2145 danos causados pela radiação UVB na pele.

2146

2147

2148

2149

2150 **6 REFERENCIAS**

2151

2152 ABDULNOUR, R. E. E.; DALLI, J.; COLBY, J. K.; KRISHNAMOORTHY, N.; TIMMONS, J.
 2153 Y.; TAN, S. H.; COLAS, R. A.; PETASIS, N. A.; SERHAN, C. N.; LEVY, B. D. Maresin 1
 2154 biosynthesis during platelet-neutrophil interactions is organ-protective. **Proceedings of the**
 2155 **National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 111, n. 46, p.
 2156 16526–16531, 2014.

2157 ADRIANO, A. R.; ACOSTA, M. L.; AZULAY, D. R.; QUIROZ, C. D.; TALARICO, S. R.
 2158 Shiitake dermatitis: the first case reported in Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.
 2159 l.], v. 88, n. 3, p. 417–419, 2013. Disponível em:
 2160 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962013000300417&lng=en&tlng=en)
 2161 05962013000300417&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 30 maio. 2021.

2162 AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Inhibition of ultraviolet B-mediated
 2163 activation of nuclear factor kappaB in normal human epidermal keratinocytes by green tea
 2164 Constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate. **Oncogene**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1035–44, 2003.
 2165 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12592390>>

2166 AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling
 2167 and photocarcinogenesis. **Mutation research**, [s. l.], v. 571, n. 1–2, p. 153–73, 2005. a.
 2168 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510704004920>>.
 2169 Acesso em: 19 nov. 2016.

2170 AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. **Photochemoprevention of ultraviolet B**
 2171 **signaling and photocarcinogenesis**, Elsevier, 2005. b.

2172 BAE, M. J.; KARADENIZ, F.; AHN, B. N.; KONG, C. S. Evaluation of effective MMP inhibitors
 2173 from eight different brown algae in human fibrosarcoma HT1080 cells. **Preventive Nutrition**
 2174 **and Food Science**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 153–161, 2015.

2175 BANDEIRA-MELO, C.; SERRA, M. F.; DIAZ, B. L.; CORDEIRO, R. S. B.; SILVA, P. M. R.;
 2176 LENZI, H. L.; BAKHLE, Y. S.; SERHAN, C. N.; MARTINS, M. A. Cyclooxygenase-2-Derived
 2177 Prostaglandin E 2 and Lipoxin A 4 Accelerate Resolution of Allergic Edema in
 2178 *Angiostrongylus costaricensis*- Infected Rats: Relationship with Concurrent Eosinophilia .
 2179 **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 164, n. 2, p. 1029–1036, 2000.

2180 BANGERT, C.; BRUNNER, P. M.; STINGL, G. Immune functions of the skin. **Clinics in**
 2181 **Dermatology**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 360–376, 2011.

2182 BANNENBERG, G.; CHIANG, N.; MARSCHNER, J. A.; XIA, H.; SUN, S.; WANG, J.; WANG,
 2183 J.; WANG, F.; YAO, S. Maresin 1 Mitigates Sepsis-Associated Acute Kidney Injury in Mice
 2184 via Inhibition of the NF-κB/ STAT3/MAPK Pathways. [s. l.], 2019. Disponível em:
 2185 <www.frontiersin.org>

2186 BANNENBERG, G. L. Therapeutic applicability of anti-inflammatory and proresolving
 2187 polyunsaturated fatty acid-derived lipid mediators. **The Scientific World Journal**, [s. l.], v.
 2188 10, p. 676–712, 2010. Disponível em:
 2189 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20419279>&http://www.scopus.com/inward/record.
 2190 url?eid=2-s2.0-77952897873&partnerID=40&md5=23d46feb3c7e724fc427a321cb374714>

2191 BARKER, J. N. W. .; GRIFFITHS, C. E. .; NICKOLOFF, B. .; MITRA, R. .; DIXIT, V. .
 2192 Keratinocytes as initiators of inflammation. **The Lancet**, [s. l.], v. 337, n. 8735, p. 211–214,
 2193 1991. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673691921682>>.
 2194 Acesso em: 20 nov. 2016.

- 2195 BAYERL, C.; TAAKE, S.; MOLL, I.; JUNG, E. G. Characterization of sunburn cells after
2196 exposure to ultraviolet light. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, [s.
2197 l.], v. 11, n. 4, p. 149–154, 1995. Disponível em:
2198 <[http://www.deepdyve.com/lp/wiley/characterization-of-sunburn-cells-after-exposure-to-](http://www.deepdyve.com/lp/wiley/characterization-of-sunburn-cells-after-exposure-to-ultraviolet-light-7hvrEcglJn)
2199 ultraviolet-light-7hvrEcglJn>. Acesso em: 1 jun. 2021.
- 2200 BENASSI, L.; OTTANI, D.; FANTINI, F.; MARCONI, A.; CHIODINO, C.; GIANNETTI, A.;
2201 PINCELLI, C. 1,25-dihydroxyvitamin D₃, transforming growth factor β 1, calcium, and
2202 ultraviolet B radiation induce apoptosis in cultured human keratinocytes. **Journal of**
2203 **Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 109, n. 3, p. 276–282, 1997. Disponível em:
2204 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9284090/>>. Acesso em: 17 jun. 2021.
- 2205 BOLLER, S.; SOLDI, C.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, E. P.; CABRINI, D. A.;
2206 PIZZOLATTI, M. G.; ZAMPRONIO, A. R.; OTUKI, M. F. Anti-inflammatory effect of crude
2207 extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation.
2208 **Journal of ethnopharmacology**, [s. l.], v. 130, n. 2, p. 262–6, 2010. Disponível em:
2209 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874110002977>>. Acesso em: 20 nov.
2210 2016.
- 2211 BORGEAT, C.; SHEPPARD, K. Lipoxin formation during human neutrophil-platelet
2212 interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A₄ by platelet 12-lipoxygenase in
2213 vitro. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 85, n. 3, p. 772–780, 1990. Disponível
2214 em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2155925/>>. Acesso em: 19 jul. 2021.
- 2215 BORGEAT, P.; NACCACHE, P. Biosynthesis and biological activity of leukotriene B₄.
2216 **Clinical biochemistry**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 459–468, 1990. Disponível em:
2217 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2174753/>>. Acesso em: 20 jul. 2021.
- 2218 BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of
2219 Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker. **Journal**
2220 **of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 206–209, 1982. Disponível em:
2221 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15463018>>. Acesso em: 20
2222 nov. 2016.
- 2223 BRITTO, S. M.; SHANTHAKUMARI, D.; AGILAN, B.; RADHIGA, T.; KANIMOZHI, G.;
2224 PRASAD, N. R. Apigenin prevents ultraviolet-B radiation induced cyclobutane pyrimidine
2225 dimers formation in human dermal fibroblasts. **Mutation Research - Genetic Toxicology**
2226 **and Environmental Mutagenesis**, [s. l.], v. 821, p. 28–35, 2017.
- 2227 CAMPANINI, M. Z.; CUSTODIO, D. L.; IVAN, A. L.; MARTINS, S. M.; PARANZINI, M. J.;
2228 MARTINEZ, R. M.; VERRI JR., W. A.; VICENTINI, F. T.; ARAKAWA, N. S.; DE, J. F. T.;
2229 BARACAT, M. M.; CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R. Topical formulations containing
2230 *Pimenta pseudocaryophyllus* extract: In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy against
2231 UV-B-induced oxidative stress. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 86–95, 2014.
- 2232 CAMPANINI, M. Z.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; IVAN, A. L.; FERREIRA, V. S.; VILELA, F. M.;
2233 VICENTINI, F. T.; MARTINEZ, R. M.; ZARPELON, A. C.; FONSECA, M. J.; FARIA, T. J.;
2234 BARACAT, M. M.; VERRI JR., W. A.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R. Efficacy of
2235 topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced
2236 oxidative stress and inflammation in hairless mice. **J Photochem Photobiol B**, [s. l.], v. 127,
2237 p. 153–160, 2013.
- 2238 CANNY, G.; LEVY, O.; FURUTA, G. T.; NARRAVULA-ALIPATI, S.; SISSON, R. B.;
2239 SERHAN, C. N.; COLGAN, S. P. Lipid mediator-induced expression of
2240 bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. **Proceedings**
2241 **of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 99, n. 6,
2242 p. 3902–3907, 2002.

- 2243 CARINI, M.; ALDINI, G.; PICCONE, M.; FACINO, R. M. Fluorescent probes as markers of
2244 oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **II Farmaco**, [s. l.], v. 55, n.
2245 8, p. 526–534, 2000. Disponível em:
2246 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014827X00000379>>. Acesso em: 20
2247 nov. 2016.
- 2248 CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A.; BORIN, M. F.; LOPEZ, R. F. V;
2249 FONSECA, M. J. V. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical
2250 formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International journal of**
2251 **pharmaceutics**, [s. l.], v. 328, n. 2, p. 183–90, 2007. Disponível em:
2252 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517306006570>>. Acesso em: 19 nov.
2253 2016.
- 2254 CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A.; DORTA, D. J.; DOS SANTOS, A.
2255 C.; FONSECA, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against
2256 UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of photochemistry and**
2257 **photobiology. B, Biology**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 21–7, 2006. Disponível em:
2258 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134406000285>>. Acesso em: 20 nov.
2259 2016.
- 2260 CEZAR, T. L. C.; MARTINEZ, R. M.; ROCHA, C. Da; MELO, C. P. B.; VALE, D. L.; BORGHI,
2261 S. M.; FATTORI, V.; VIGNOLI, J. A.; CAMILIOS-NETO, D.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI,
2262 S. R.; VERRI, W. A.; CASAGRANDE, R. Treatment with maresin 1, a docosahexaenoic acid-
2263 derived pro-resolution lipid, protects skin from inflammation and oxidative stress caused by
2264 UVB irradiation. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019. Disponível em:
2265 <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39584-6>>. Acesso em: 30 maio. 2021.
- 2266 CHA, J. W.; PIAO, M. J.; KIM, K. C.; YAO, C. W.; ZHENG, J.; KIM, S. M.; HYUN, C. L.; AHN,
2267 Y. S.; HYUN, J. W. The Polyphenol Chlorogenic Acid Attenuates UVB-mediated Oxidative
2268 Stress in Human HaCaT Keratinocytes. **Biomolecules & therapeutics**, [s. l.], v. 22, n. 2, p.
2269 136–42, 2014. Disponível em:
2270 <[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3975475&tool=pmcentrez&rende](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3975475&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)
2271 [rtype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3975475&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)>
- 2272 CHATTERJEE, A.; SHARMA, A.; CHEN, M.; TOY, R.; MOTTOLA, G.; CONTE, M. S. The
2273 pro-resolving lipid mediator maresin 1 (MaR1) attenuates inflammatory signaling pathways in
2274 vascular smooth muscle and endothelial cells. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 11, 2014.
- 2275 CHEN, X. Q.; WU, S. H.; ZHOU, Y.; TANG, Y. R. Lipoxin A4-Induced Heme Oxygenase-1
2276 Protects Cardiomyocytes against Hypoxia/Reoxygenation Injury via p38 MAPK Activation
2277 and Nrf2/ARE Complex. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 67120, 2013. Disponível em:
2278 <www.plosone.org>. Acesso em: 9 jun. 2021.
- 2279 CHIANG, N.; CN, S.; SE, D.; JM, D.; DW, H.; GE, R.; T, S.; T, Y.; C, B. The lipoxin receptor
2280 ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. **Pharmacological reviews**,
2281 [s. l.], v. 58, n. 3, p. 463–487, 2006. Disponível em:
2282 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16968948/>>. Acesso em: 20 jul. 2021.
- 2283 CHIANG, N.; FREDMAN, G.; BÄCKHED, F.; OH, S. F.; VICKERY, T.; SCHMIDT, B. A.;
2284 SERHAN, C. N. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic
2285 requirements. **Nature**, [s. l.], v. 484, n. 7395, p. 524–528, 2012.
- 2286 CHIANG, N.; LIBREROS, S.; NORRIS, P. C.; DE LA ROSA, X.; SERHAN, C. N. Maresin 1
2287 activates LGR6 receptor promoting phagocyte immunoresolvent functions. **Journal of**
2288 **Clinical Investigation**, [s. l.], v. 129, n. 12, p. 5294–5311, 2019. Disponível em:
2289 <<https://doi.org/10.1172/JCI129448>>. Acesso em: 4 jun. 2021.

- 2290 CHOI, J.-Y.; CHOI, D.-I.; LEE, J.-B.; YUN, S.-J.; LEE, D.-H.; EUN, J.-B.; LEE, S.-C. Ethanol
2291 extract of peanut sprout induces Nrf2 activation and expression of antioxidant and detoxifying
2292 enzymes in human dermal fibroblasts: implication for its protection against UVB-irradiated
2293 oxidative stress. **Photochemistry and photobiology**, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 453–60, 2013.
2294 Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.2012.01244.x/full>>.
2295 Acesso em: 20 nov. 2016.
- 2296 CHRISTENSEN, L.; SUGGS, A.; BARON, E. Ultraviolet photobiology in dermatology. In:
2297 **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] : Springer New York LLC, 2017. v.
2298 996p. 89–104.
- 2299 CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis.
2300 **Free radical biology & medicine**, [s. l.], v. 48, n. 6, p. 749–62, 2010. Disponível em:
2301 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089158490900793X>>. Acesso em: 10 out.
2302 2016.
- 2303 COLGAN, S. P.; SERHAN, C. N.; PARKOS, C. A.; DELP-ARCHER, C.; MADARA, J. L.
2304 Lipoxin A4 modulates transmigration of human neutrophils across intestinal epithelial
2305 monolayers. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 92, n. 1, p. 75–82, 1993.
- 2306 CORMINBOEUF, O.; LEROY, X. FPR2/ALXR agonists and the resolution of inflammation.
2307 **Journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 537–559, 2015. Disponível em:
2308 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25365541/>>. Acesso em: 19 jul. 2021.
- 2309 D’ORAZIO, D. J.; HAIMAN, Z.; MACFADYEN, A. Accretion into the central cavity of a
2310 circumbinary disc. **Monthly Notices of the Royal Astronomical Society**, [s. l.], v. 436, n. 4,
2311 p. 2997–3020, 2013. Disponível em:
2312 <[http://academic.oup.com/mnras/article/436/4/2997/984794/Accretion-into-the-central-cavity-](http://academic.oup.com/mnras/article/436/4/2997/984794/Accretion-into-the-central-cavity-of-a)
2313 [of-a](http://academic.oup.com/mnras/article/436/4/2997/984794/Accretion-into-the-central-cavity-of-a)>. Acesso em: 30 maio. 2021.
- 2314 DALLI, J.; ZHU, M.; VLASENKO, N. A.; DENG, B.; HAEGGSTRÖM, J. Z.; PETASIS, N. A.;
2315 SERHAN, C. N. The novel 13S,14S-epoxy-maresinis converted by human macrophages to
2316 maresin 1 (MaR1), inhibits leukotriene A4 hydrolase (LTA4H), and shifts macrophage
2317 phenotype. **FASEB Journal**, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 2573–2583, 2013.
- 2318 DURÁN-ANIOTZ, C.; SEGAL, G.; SALAZAR, L.; PEREDA, C.; FALCÓN, C.; TEMPIO, F.;
2319 AGUILERA, R.; GONZÁLEZ, R.; PÉREZ, C.; TITTARELLI, A.; CATALÁN, D.; NERVI, B.;
2320 LARRONDO, M.; SALAZAR-ONFRAY, F.; LÓPEZ, M. N. The immunological response and
2321 post-treatment survival of DC-vaccinated melanoma patients are associated with increased
2322 Th1/Th17 and reduced Th3 cytokine responses. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, [s.
2323 l.], v. 62, n. 4, p. 761–772, 2013. Disponível em:
2324 <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00262-012-1377-3>>. Acesso em: 30 maio. 2021.
- 2325 EMRI, G.; HORKAY, I.; REMENYIK, E. [The role of free radicals in the UV-induced skin
2326 damage. Photo-aging]. **Orvosi hetilap**, [s. l.], v. 147, n. 16, p. 731–735, 2006. Disponível
2327 em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/16711258>>
- 2328 FIGUEIREDO, S. A.; VILELA, F. M. P.; SILVA, C. A. Da; CUNHA, T. M.; DOS SANTOS, M.
2329 H.; FONSECA, M. J. V. In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential
2330 of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B:
2331 Biology**, [s. l.], v. 131, p. 65–73, 2014. Disponível em:
2332 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24491421/>>. Acesso em: 30 maio. 2021.
- 2333 FILEP, J. G.; ZOUKI, C.; PETASIS, N. A.; HACHICHA, M.; SERHAN, C. N. Anti-
2334 Inflammatory Actions of Lipoxin A4 Stable Analogs Are Demonstrable in Human Whole
2335 Blood: Modulation of Leukocyte Adhesion Molecules and Inhibition of Neutrophil-Endothelial
2336 Interactions. **Blood**, [s. l.], v. 94, n. 12, p. 4132–4142, 1999.

- 2337 FISHER, G. J.; DATTA, S. C.; TALWAR, H. S.; WANG, Z. Q.; VARANI, J.; KANG, S.;
2338 VOORHEES, J. J. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid
2339 antagonism. **Nature**, [s. l.], v. 379, n. 6563, p. 335–339, 1996. Disponível em:
2340 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8552187/>>. Acesso em: 17 jun. 2021.
- 2341 FISHER, G. J.; WANG, Z.; DATTA, S. C.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J. J.
2342 Pathophysiology of Premature Skin Aging Induced by Ultraviolet Light. **New England**
2343 **Journal of Medicine**, [s. l.], v. 337, n. 20, p. 1419–1429, 1997. Disponível em:
2344 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9358139/>>. Acesso em: 17 jun. 2021.
- 2345 FISHER, G. J.; WANG, Z.; DATTA, S. C.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J. J.
2346 Pathophysiology of Premature Skin Aging Induced by Ultraviolet Light. [s. l.], 2009.
2347 Disponível em:
2348 <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199711133372003#.WDGw6Sejyko.mendeley>>.
2349 Acesso em: 20 nov. 2016.
- 2350 FONSECA, Y. M.; CATINI, C. D.; VICENTINI, F. T. M. C.; CARDOSO, J. C.; CAVALCANTI
2351 DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L.; VIEIRA FONSECA, M. J. Efficacy of marigold extract-
2352 loaded formulations against UV-induced oxidative stress. **Journal of pharmaceutical**
2353 **sciences**, [s. l.], v. 100, n. 6, p. 2182–93, 2011. Disponível em:
2354 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jps.22438/full>>. Acesso em: 20 nov. 2016.
- 2355 FONSECA, Y. M.; CATINI, C. D.; VICENTINI, F. T. M. C.; NOMIZO, A.; GERLACH, R. F.;
2356 FONSECA, M. J. V. Protective effect of Calendula officinalis extract against UVB-induced
2357 oxidative stress in skin: evaluation of reduced glutathione levels and matrix
2358 metalloproteinase secretion. **Journal of ethnopharmacology**, [s. l.], v. 127, n. 3, p. 596–
2359 601, 2010. Disponível em:
2360 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874109007740>>. Acesso em: 20 nov.
2361 2016.
- 2362 FREDMAN, G.; SERHAN, C. N. Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and
2363 RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 437,
2364 n. 2, p. 185 LP – 197, 2011. Disponível em:
2365 <<http://www.biochemj.org/content/437/2/185.abstract>>
- 2366 FUCHS, J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, l-
2367 ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection¹¹This review is dedicated to
2368 Lester Packer, University of California, Berkeley. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.],
2369 v. 25, n. 7, p. 848–873, 1998. Disponível em:
2370 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584998001610>>. Acesso em: 24 nov.
2371 2016.
- 2372 GAO, Y.; ZHANG, H.; LUO, L.; LIN, J.; LI, D.; ZHENG, S.; HUANG, H.; YAN, S.; YANG, J.;
2373 HAO, Y.; LI, H.; GAO SMITH, F.; JIN, S. Resolvin D1 Improves the Resolution of
2374 Inflammation via Activating NF- κ B p50/p50–Mediated Cyclooxygenase-2 Expression in Acute
2375 Respiratory Distress Syndrome. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 199, n. 6, p. 2043–
2376 2054, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28794232/>>. Acesso em: 6
2377 jun. 2021.
- 2378 GAO, Z. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor [κ]B kinase
2379 complex. **J. Biol. Chem.**, [s. l.], v. 277, p. 48115–48121, 2002. Disponível em:
2380 <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M209459200>>
- 2381 GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; MOURA-DE-CARVALHO VICENTINI, F. T.;
2382 VERRI, W. A.; FONSECA, M. J. V. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract
2383 by different in vitro methods and investigation of this activity after its incorporation in topical
2384 formulations. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official**

- 2385 **journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, [s. l.], v.
2386 64, n. 1, p. 99–106, 2006. Disponível em:
2387 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S093964110600083X>>. Acesso em: 19
2388 nov. 2016.
- 2389 GIERA, M.; IOAN-FACSINAY, A.; TOES, R.; GAO, F.; DALLI, J.; DEELDER, A. M.;
2390 SERHAN, C. N.; MAYBORODA, O. A. Lipid and lipid mediator profiling of human synovial
2391 fluid in rheumatoid arthritis patients by means of LC-MS/MS. **Biochimica et Biophysica**
2392 **Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1821, n. 11, p. 1415–1424, 2012.
2393 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.07.011>>
- 2394 GODSON, C.; MITCHELL, S.; HARVEY, K.; PETASIS, N. A.; HOGG, N.; BRADY, H. R.
2395 Cutting Edge: Lipoxins Rapidly Stimulate Nonphlogistic Phagocytosis of Apoptotic
2396 Neutrophils by Monocyte-Derived Macrophages. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 164,
2397 n. 4, p. 1663–1667, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10657608/>>.
2398 Acesso em: 15 jun. 2021.
- 2399 GONG, J.; LIU, H.; WU, J.; QI, H.; WU, Z. Y.; SHU, H. Q.; LI, H. Bin; CHEN, L.; WANG, Y.
2400 X.; LI, B.; TANG, M.; JI, Y. D.; YUAN, S. Y.; YAO, S. L.; SHANG, Y. Maresin 1 prevents
2401 lipopolysaccharide-induced neutrophil survival and accelerates resolution of acute lung
2402 injury. **Shock**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 371–380, 2015.
- 2403 GONG, J.; WU, Z. Y.; QI, H.; CHEN, L.; LI, H. Bin; LI, B.; YAO, C. Y.; WANG, Y. X.; WU, J.;
2404 YUAN, S. Y.; YAO, S. L.; SHANG, Y. Maresin 1 mitigates LPS-induced acute lung injury in
2405 mice. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 171, n. 14, p. 3539–3550, 2014.
- 2406 GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated
2407 chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle.
2408 **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 93–100, 1991. Disponível em:
2409 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/089158499190002K>>. Acesso em: 20 nov.
2410 2016.
- 2411 GRABAUSKAS, G.; WU, X.; OWYANG, C. 1091 - Resolvin D1 Acting on G1 Coupled Fpr2
2412 Receptor Inhibits Mast Cell Degranulation and Prevents Development of Visceral
2413 Hypersensitivity in lbs. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 154, n. 6, p. S-214, 2018. Disponível em:
2414 <<http://www.gastrojournal.org/article/S0016508518311065/fulltext>>. Acesso em: 15 jun.
2415 2021.
- 2416 GRIMBALDESTON, M. A.; SIMPSON, A.; FINLAY-JONES, J. J.; HART, P. H. The effect of
2417 ultraviolet radiation exposure on the prevalence of mast cells in human skin. **British Journal**
2418 **of Dermatology**, [s. l.], v. 148, n. 2, p. 300–306, 2003. Disponível em:
2419 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2133.2003.05113.x>>. Acesso em: 17
2420 jun. 2021.
- 2421 GRONERT, K.; GEWIRTZ, A.; MADARA, J. L.; SERHAN, C. N. Identification of a human
2422 enterocyte lipoxin A4 receptor that is regulated by interleukin (IL)-13 and interferon γ and
2423 inhibits tumor necrosis factor α -induced IL-8 release. **Journal of Experimental Medicine**, [s.
2424 l.], v. 187, n. 8, p. 1285–1294, 1998. Disponível em: <[pmc/articles/PMC2212233/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11141472/)>. Acesso
2425 em: 15 jun. 2021.
- 2426 GRONERT, K.; MARTINSSON-NISKANEN, T.; RAVASI, S.; CHIANG, N.; SERHAN, C.
2427 Selectivity of recombinant human leukotriene D(4), leukotriene B(4), and lipoxin A(4)
2428 receptors with aspirin-triggered 15-epi-LXA(4) and regulation of vascular and inflammatory
2429 responses. **The American journal of pathology**, [s. l.], v. 158, n. 1, p. 3–9, 2001. Disponível
2430 em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11141472/>>. Acesso em: 20 jul. 2021.
- 2431 HALLER, D.; RUSSO, M. P.; SARTOR, R. B.; JOBIN, C. IKK[beta] and phosphatidylinositol

- 2432 3-kinase/Akt participate in non-pathogenic Gram-negative enteric bacteria-induced RelA
2433 phosphorylation and NF- κ B activation in both primary and intestinal epithelial cell lines.
2434 **J. Biol. Chem.**, [s. l.], v. 277, p. 38168–38178, 2002. Disponível em:
2435 <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M205737200>>
- 2436 HALLIDAY, G. M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to
2437 UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. **Mutation research**, [s.
2438 l.], v. 571, n. 1–2, p. 107–20, 2005. Disponível em:
2439 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510704004890>>. Acesso em: 24 nov.
2440 2016.
- 2441 HAN, X.; YAO, W.; LIU, Z.; LI, H.; ZHANG, Z. J.; HEI, Z.; XIA, Z. Lipoxin A4 Preconditioning
2442 Attenuates Intestinal Ischemia Reperfusion Injury through Keap1/Nrf2 Pathway in a Lipoxin
2443 A4 Receptor Independent Manner. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v.
2444 2016, 2016.
- 2445 HANSON, K. M.; CLEGG, R. M. Observation and Quantification of Ultraviolet-induced
2446 Reactive Oxygen Species in Ex Vivo Human Skin. **Photochemistry and Photobiology**, [s.
2447 l.], v. 76, n. 1, p. 57–63, 2002. Disponível em:
2448 <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1562/0031-
2449 8655%282002%290760057OAOUI2.0.CO2](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1562/0031-8655%282002%290760057OAOUI2.0.CO2)>. Acesso em: 9 jun. 2021.
- 2450 HARPER, J. I.; GODWIN, H.; GREEN, A.; WILKES, L. E.; HOLDEN, N. J.; MOFFATT, M.;
2451 COOKSON, W. O.; LAYTON, G.; CHANDLER, S. A study of matrix metalloproteinase
2452 expression and activity in atopic dermatitis using a novel skin wash sampling assay for
2453 functional biomarker analysis. **The British journal of dermatology**, [s. l.], v. 162, n. 2, p.
2454 397–403, 2010. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-
2455 2133.2009.09467.x/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2133.2009.09467.x/full)>. Acesso em: 19 nov. 2016.
- 2456 HIRAMOTO, K.; KOBAYASHI, H.; YAMATE, Y.; ISHII, M.; SATO, E. F. Intercellular pathway
2457 through hyaluronic acid in UVB-induced inflammation. **Experimental dermatology**, [s. l.], v.
2458 21, n. 12, p. 911–4, 2012. Disponível em:
2459 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/exd.12032/full>>. Acesso em: 20 nov. 2016.
- 2460 HUANG, X. X.; BERNERD, F.; HALLIDAY, G. M. Ultraviolet a within sunlight induces
2461 mutations in the epidermal basal layer of engineered human skin. **American Journal of**
2462 **Pathology**, [s. l.], v. 174, n. 4, p. 1534–1543, 2009.
- 2463 IVAN, A. L.; CAMPANINI, M. Z.; MARTINEZ, R. M.; FERREIRA, V. S.; STEFFEN, V. S.;
2464 VICENTINI, F. T.; VILELA, F. M.; MARTINS, F. S.; ZARPELON, A. C.; CUNHA, T. M.;
2465 FONSECA, M. J.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI JR., W. A.;
2466 CASAGRANDE, R. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and
2467 oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. **J Photochem**
2468 **Photobiol B**, [s. l.], v. 138, p. 124–133, 2014. a.
- 2469 IVAN, A. L. M.; CAMPANINI, M. Z.; MARTINEZ, R. M.; FERREIRA, V. S.; STEFFEN, V. S.;
2470 VICENTINI, F. T. M. C.; VILELA, F. M. P.; MARTINS, F. S.; ZARPELON, A. C.; CUNHA, T.
2471 M.; FONSECA, M. J. V.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A.;
2472 CASAGRANDE, R. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and
2473 oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. **Journal of**
2474 **Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 138, p. 124–133, 2014. b.
- 2475 JIN, H.; LI, Y. H.; XU, J. S.; GUO, G. Q.; CHEN, D. L.; BO, Y. Lipoxin A 4 analog attenuates
2476 morphine antinociceptive tolerance, withdrawal-induced hyperalgesia, and glial reaction and
2477 cytokine expression in the spinal cord of rat. **Neuroscience**, [s. l.], v. 208, p. 1–10, 2012.
- 2478 JIN, W.; JIA, Y.; HUANG, L.; WANG, T.; WANG, H.; DONG, Y.; ZHANG, H.; FAN, M.; LV, P.

- 2479 Lipoxin A4 methyl ester ameliorates cognitive deficits induced by chronic cerebral
2480 hypoperfusion through activating ERK/Nrf2 signaling pathway in rats. **Pharmacology**
2481 **Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 124, p. 145–152, 2014.
- 2482 JÓZSEF, L.; ZOUKI, C.; PETASIS, N. A.; SERHAN, C. N.; FILEP, J. G. Lipoxin A4 and
2483 aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF- κ B and AP-1 activation,
2484 and IL-8 gene expression in human leukocytes. **Proceedings of the National Academy of**
2485 **Sciences**, [s. l.], v. 99, n. 20, 2002. a.
- 2486 JÓZSEF, L.; ZOUKI, C.; PETASIS, N. A.; SERHAN, C. N.; FILEP, J. G. Lipoxin A4 and
2487 aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF- κ B and AP-1 activation,
2488 and IL-8 gene expression in human leukocytes. **Proceedings of the National Academy of**
2489 **Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 99, n. 20, p. 13266–13271, 2002. b.
2490 Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.202296999>. Acesso em: 30 maio. 2021.
- 2491 KATALINIC, V.; MODUN, D.; MUSIC, I.; BOBAN, M. Gender differences in antioxidant
2492 capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate;
2493 ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comparative Biochemistry**
2494 **and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 140, n. 1, p. 47–52, 2005. a.
- 2495 KATALINIC, V.; MODUN, D.; MUSIC, I.; BOBAN, M. Gender differences in antioxidant
2496 capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate;
2497 ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comparative biochemistry**
2498 **and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, [s. l.], v. 140, n. 1, p. 47–52, 2005. b.
2499 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045605000062>>.
2500 Acesso em: 19 nov. 2016.
- 2501 KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial**
2502 **Plastic Surgery Clinics of North America**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 229–234, 2011. Disponível
2503 em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsc.2011.04.003>>
- 2504 KIM, H. K. Protective effect of garlic on cellular senescence in UVB-exposed HaCaT human
2505 keratinocytes. **Nutrients**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 464, 2016. Disponível em:
2506 <www.mdpi.com/journal/nutrients>. Acesso em: 9 jun. 2021.
- 2507 KIM, J.; LEE, C. W.; KIM, E. K.; LEE, S. J.; PARK, N. H.; KIM, H. S.; KIM, H. K.; CHAR, K.;
2508 JANG, Y. P.; KIM, J. W. Inhibition effect of Gynura procumbens extract on UV-B-induced
2509 matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts. **Journal of**
2510 **Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 137, n. 1, p. 427–433, 2011.
- 2511 KOBAYASHI, T.; HATTORI, S.; NAGAI, Y.; TAJIMA, S. Differential regulation of the
2512 secretions of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 from
2513 human keratinocytes in culture. **IUBMB Life**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 221–226, 2000.
- 2514 LEBER, A. L.; EVERHART, K.; BALADA-LLASAT, J.-M.; CULLISON, J.; DALY, J.; HOLT, S.;
2515 LEPHART, P.; SALIMNIA, H.; SCHRECKENBERGER, P. C.; DESJARLAIS, S.; REED, S. L.;
2516 CHAPIN, K. C.; LEBLANC, L.; JOHNSON, J. K.; SOLIVEN, N. L.; CARROLL, K. C.; MILLER,
2517 J.-A.; BARD, J. D.; MESTAS, J.; BANKOWSKI, M.; ENOMOTO, T.; HEMMERT, A. C.;
2518 BOURZAC, K. M. Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel
2519 for Detection of Bacteria, Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. [s. l.], 2016.
2520 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128>>
- 2521 LEVY, B. D.; CLISH, C. B.; SCHMIDT, B.; GRONERT, K.; SERHAN, C. N. Lipid mediator
2522 class switching during acute inflammation: Signals in resolution. **Nature Immunology**, [s. l.],
2523 v. 2, n. 7, p. 612–619, 2001.
- 2524 LEVY, B. D.; SERHAN, C. N. Resolution of Acute Inflammation In The Lung. **Annual Review**

- 2525 **of Physiology**, [s. l.], v. 76, p. 467–492, 2014.
- 2526 LI, Y.; DALLI, J.; CHIANG, N.; BARON, R. M.; QUINTANA, C.; SERHAN, C. N. NIH Public
2527 Access. [s. l.], v. 39, n. 5, p. 885–898, 2014.
- 2528 LI, Y.; WANG, N.; MA, Z.; WANG, Y.; YUAN, Y.; ZHONG, Z.; HONG, Y.; ZHAO, M. Lipoxin
2529 A4 protects against paraquat-induced acute lung injury by inhibiting the
2530 TLR4/MyD88-mediated activation of the NF- κ B and PI3K/AKT pathways. **International
2531 journal of molecular medicine**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 1–13, 2021. Disponível em:
2532 <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2021.4919/abstract>>. Acesso em: 9
2533 jun. 2021.
- 2534 LIMA, A. I. G.; MOTA, J.; MONTEIRO, S. A. V. S.; FERREIRA, R. M. S. B. Legume seeds
2535 and colorectal cancer revisited: Protease inhibitors reduce MMP-9 activity and colon cancer
2536 cell migration. **Food chemistry**, [s. l.], v. 197, n. Pt A, p. 30–8, 2016. Disponível em:
2537 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615300637>>. Acesso em: 21 nov.
2538 2016.
- 2539 LINGNERT, H.; VALLENTIN, K.; ERIKSSON, C. E. MEASUREMENT OF ANTIOXIDATIVE
2540 EFFECT IN MODEL SYSTEM. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 3,
2541 n. 2, p. 87–103, 1979. Disponível em:
2542 <<https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1745-4549.1979.tb00574.x>>. Acesso
2543 em: 13 jun. 2021.
- 2544 LIU, W.; DING, I.; CHEN, K.; OLSCHOWKA, J.; XU, J.; HU, D.; MORROW, G. R.;
2545 OKUNIEFF, P. Interleukin 1 β (IL1B) signaling is a critical component of radiation-induced
2546 skin fibrosis. **Radiation Research**, [s. l.], v. 165, n. 2, p. 181–191, 2006.
- 2547 LUIS, J. C.; PÉREZ, R. M.; GONZÁLEZ, F. V. UV-B radiation effects on foliar concentrations
2548 of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 101, n. 3, p.
2549 1211–1215, 2007.
- 2550 LUO, C. L.; LI, Q. Q.; CHEN, X. P.; ZHANG, X. M.; LI, L. L.; LI, B. X.; ZHAO, Z. Q.; TAO, L.
2551 Y. Lipoxin A4 attenuates brain damage and downregulates the production of pro-
2552 inflammatory cytokines and phosphorylated mitogen-activated protein kinases in a mouse
2553 model of traumatic brain injury. **Brain Research**, [s. l.], v. 1502, p. 1–10, 2013.
- 2554 LV CEF, C.; JIN CORRESPONDING AUTHOR, Q.; JIN, Q. Maresin-1 Inhibits Oxidative
2555 Stress and Inflammation and Promotes Apoptosis in a Mouse Model of Caerulein-Induced
2556 Acute Pancreatitis. [s. l.], 2019. Disponível em:
2557 <<https://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/917380>>
- 2558 MACHADO, F.; JE, J.; L, E.; A, D.; A, B.; CN, S.; J, A. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4
2559 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. **Nature medicine**, [s. l.], v. 12, n. 3, p.
2560 330–334, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16415877/>>. Acesso em:
2561 20 jul. 2021.
- 2562 MADERNA, P.; GODSON, C. **Lipoxins: Revolutionary road**, 2009.
- 2563 MARCON, R.; BENTO, A.; DUTRA, R.; BICCA, M.; LEITE, D. Maresin 1, a proresolving lipid
2564 mediator derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids, exerts protective actions in
2565 murine models of colitis. **J Immunol**, [s. l.], v. 191, 2013. a.
- 2566 MARCON, R.; BENTO, A. F.; DUTRA, R. C.; BICCA, M. a; LEITE, D. F. P.; CALIXTO, J. B.
2567 Maresin 1, a proresolving lipid mediator derived from omega-3 polyunsaturated Fatty acids,
2568 exerts protective actions in murine models of colitis. **Journal of immunology (Baltimore,
2569 Md.: 1950)**, [s. l.], v. 191, n. 8, p. 4288–98, 2013. b. Disponível em:

- 2570 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24038091>>
- 2571 MARTINEZ, R. Potencial terapêutico de lipoxinas para o controle da inflamação e estresse
2572 oxidativo induzidos por radiação UVB em camundongos. [s. l.], p. 1–91, 2018.
- 2573 MARTINEZ, R. M.; FATTORI, V.; SAITO, P.; MELO, C. B. P.; BORGHI, S. M.; PINTO, I. C.;
2574 BUSSMANN, A. J. C.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A.;
2575 CASAGRANDE, R. Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and oxidative
2576 stress in mice. **Journal of Dermatological Science**, [s. l.], v. 0, n. 0, [s.d.]. Disponível em:
2577 <[https://www.jdsjournal.com/article/S0923-1811\(18\)30201-](https://www.jdsjournal.com/article/S0923-1811(18)30201-9/fulltext#.Wvh9Lj73FoE.mendeley)
2578 9/fulltext#.Wvh9Lj73FoE.mendeley>. Acesso em: 13 maio. 2018.
- 2579 MARTINEZ, R. M.; FATTORI, V.; SAITO, P.; MELO, C. B. P.; BORGHI, S. M.; PINTO, I. C.;
2580 BUSSMANN, A. J. C.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A.;
2581 CASAGRANDE, R. Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and oxidative
2582 stress in mice. **Journal of Dermatological Science**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 164–174, 2018.
- 2583 MARTINEZ, R. M.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; STEFFEN, V. S.; CAVIGLIONE, C. V.; VIGNOLI,
2584 J. A.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A.; CASAGRANDE, R. Hesperidin
2585 methyl chalcone inhibits oxidative stress and inflammation in a mouse model of ultraviolet B
2586 irradiation-induced skin damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B:
2587 Biology**, [s. l.], v. 148, p. 145–153, 2015. a. Disponível em:
2588 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.03.030>>
- 2589 MARTINEZ, R. M.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; STEFFEN, V. S.; CAVIGLIONE, C. V.; VIGNOLI,
2590 J. A.; BARBOSA, D. S.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A.;
2591 CASAGRANDE, R. Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative
2592 Stress in the Skin of Hairless Mice. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 78, n. 7, p. 1647–
2593 1655, 2015. b.
- 2594 MARTINEZ, R. M.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; STEFFEN, V. S.; CAVIGLIONE, C. V.; VIGNOLI,
2595 J. A.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A.; CASAGRANDE, R. Hesperidin
2596 methyl chalcone inhibits oxidative stress and inflammation in a mouse model of ultraviolet B
2597 irradiation-induced skin damage. **Journal of photochemistry and photobiology. B,
2598 Biology**, [s. l.], v. 148, p. 145–53, 2015. c.
- 2599 MARTINEZ, R. M.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; STEFFEN, V. S.; CAVIGLIONE, C. V.; VIGNOLI,
2600 J. A.; BARBOSA, D. S.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A.;
2601 CASAGRANDE, R. Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative
2602 Stress in the Skin of Hairless Mice. **Journal of natural products**, [s. l.], v. 78, n. 7, p. 1647–
2603 55, 2015. d.
- 2604 MARTINEZ, R. M.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; STEFFEN, V. S.; SILVA, T. C. C.; CAVIGLIONE,
2605 C. V.; BOTTURA, C.; FONSECA, M. J. V.; VICENTINI, F. T. M. C.; VIGNOLI, J. A.;
2606 BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A.; CASAGRANDE, R. Topical
2607 Formulation Containing Naringenin: Efficacy against Ultraviolet B Irradiation-Induced Skin
2608 Inflammation and Oxidative Stress in Mice. **PloS one**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. e0146296, 2016.
2609 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0146296>>. Acesso em: 20 nov. 2016.
- 2610 MCADAM, E.; BREM, R.; KARRAN, P. Oxidative Stress-Induced Protein Damage Inhibits
2611 DNA Repair and Determines Mutation Risk and Therapeutic Efficacy. **Molecular cancer
2612 research: MCR**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 612–22, 2016. Disponível em:
2613 <<http://mcr.aacrjournals.org/content/early/2016/04/22/1541-7786.MCR-16-0053>>. Acesso
2614 em: 20 nov. 2016.
- 2615 MEERAN, S. M.; MANTENA, S. K.; KATIYAR, S. K. Prevention of Ultraviolet Radiation–
2616 Induced Immunosuppression by (–)-Epigallocatechin-3-Gallate in Mice Is Mediated through

- 2617 Interleukin 12–Dependent DNA Repair. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 12, n. 7, p.
2618 2272–2280, 2006. Disponível em:
2619 <<https://clincancerres.aacrjournals.org/content/12/7/2272>>. Acesso em: 19 jul. 2021.
- 2620 MEERAN, S. M.; PUNATHIL, T.; KATIYAR, S. K. IL-12 deficiency exacerbates inflammatory
2621 responses in UV-irradiated skin and skin tumors. **Journal of Investigative Dermatology**, [s.
2622 l.], v. 128, n. 11, p. 2716–2727, 2008.
- 2623 MELONI, M.; NICOLAY, J. F. Dynamic monitoring of glutathione redox status in UV-B
2624 irradiated reconstituted epidermis: effect of antioxidant activity on skin homeostasis.
2625 **Toxicology in Vitro**, [s. l.], v. 17, n. 5–6, p. 609–613, 2003. Disponível em:
2626 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233303001140>>. Acesso em: 20 nov.
2627 2016.
- 2628 MIAO, G.; LIU, Z.; WEI, S.; LUO, J.; FU, Z.; SUN, T. Lipoxin A4 attenuates radicular pain
2629 possibly by inhibiting spinal ERK, JNK and NF- κ B/P65 and cytokine signals, but not P38, in a
2630 rat model of non-compressive lumbar disc herniation. **Neuroscience**, [s. l.], v. 300, p. 10–18,
2631 2015.
- 2632 MONTENEGRO, L.; BONINA, F.; RIGANO, L.; GIOGILLI, S.; SIRIGU, S. Protective effect
2633 evaluation of free radical scavengers on UVB induced human cutaneous erythema by skin
2634 reflectance spectrophotometry. **International journal of cosmetic science**, [s. l.], v. 17, n.
2635 3, p. 91–103, 1995. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1467-2494.1995.tb00113.x/abstract>>. Acesso em: 20 nov. 2016.
- 2637 NATARAJAN, V. T.; GANJU, P.; RAMKUMAR, A.; GROVER, R.; GOKHALE, R. S.
2638 **Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation**, Nature Publishing Group,
2639 2014.
- 2640 NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. **Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-**
2641 **inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms**, Springer, 2010. Disponível em:
2642 <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00403-009-1001-3>>. Acesso em: 24 jun. 2021.
- 2643 NOONAN, F. P.; ZAIDI, M. R.; WOLNICKA-GLUBISZ, A.; ANVER, M. R.; BAHN, J.;
2644 WIELGUS, A.; CADET, J.; DOUKI, T.; MOURET, S.; TUCKER, M. A.; POPRATILOFF, A.;
2645 MERLINO, G.; DE FABO, E. C. Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B
2646 radiation requires melanin pigment. **Nature Communications**, [s. l.], v. 3, 2012.
- 2647 NORDGREN, T. M.; HEIRES, A. J.; WYATT, T. a; POOLE, J. a; LEVAN, T. D.; CERUTIS, D.
2648 R.; ROMBERGER, D. J. Maresin-1 reduces the pro-inflammatory response of bronchial
2649 epithelial cells to organic dust. **Respiratory research**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 51, 2013.
2650 Disponível em:
2651 <[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3668181&tool=pmcentrez&rende](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3668181&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)
2652 <[rtype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3668181&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)>
- 2653 PAPAYIANNI, A.; SERHAN, C. N.; BRADY, H. R. Lipoxin A4 and B4 inhibit leukotriene-
2654 stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells. **Journal of immunology**
2655 **(Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 156, n. 6, p. 2264–72, 1996. Disponível em:
2656 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8690917>>. Acesso em: 15 jun. 2021.
- 2657 PARRADO, C.; MERCADO-SAENZ, S.; PEREZ-DAVO, A.; GILABERTE, Y.; GONZALEZ,
2658 S.; JUARRANZ, A. Environmental Stressors on Skin Aging. Mechanistic Insights. **Frontiers**
2659 **in Pharmacology**, [s. l.], v. 10, p. 759, 2019. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso
2660 em: 8 jun. 2021.
- 2661 PAZ, M. L.; FERRARI, A.; WEILL, F. S.; LEONI, J.; MAGLIO, D. H. G. Time-course
2662 evaluation and treatment of skin inflammatory immune response after ultraviolet B irradiation.

- 2663 **Cytokine**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 70–7, 2008. Disponível em:
2664 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466608001877>>. Acesso em: 20 nov.
2665 2016.
- 2666 PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. **Ultraviolet radiation and skin aging: Roles of**
2667 **reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for**
2668 **prevention of inflammation-induced matrix degradation - A review**, John Wiley & Sons,
2669 Ltd, 2005. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1467-](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1467-2494.2004.00241.x)
2670 2494.2004.00241.x>. Acesso em: 9 jun. 2021.
- 2671 PODDA, M.; TRABER, M. G.; WEBER, C.; YAN, L.-J.; PACKER, L. UV-Irradiation Depletes
2672 Antioxidants and Causes Oxidative Damage in a Model of Human Skin. **Free Radical**
2673 **Biology and Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 55–65, 1998. Disponível em:
2674 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584997001421>>. Acesso em: 19 nov.
2675 2016.
- 2676 POLETTA, G. L.; SIMONIELLO, M. F.; MUDRY, M. D. Biomarkers of oxidative damage and
2677 antioxidant defense capacity in Caiman latirostris blood. **Comparative Biochemistry and**
2678 **Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 179, p. 29–36, 2016.
- 2679 QUAN, T.; QIN, Z.; XIA, W.; SHAO, Y.; VOORHEES, J. J.; FISHER, G. J. Matrix-degrading
2680 metalloproteinases in photoaging. In: JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY
2681 SYMPOSIUM PROCEEDINGS 2009a, **Anais... : Nature Publishing Group**, 2009.
- 2682 QUAN, T.; QIN, Z.; XIA, W.; SHAO, Y.; VOORHEES, J. J.; FISHER, G. J. Matrix-degrading
2683 metalloproteinases in photoaging. **The journal of investigative dermatology. Symposium**
2684 **proceedings**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 20–4, 2009. b. Disponível em:
2685 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087002415305050>>. Acesso em: 19 nov.
2686 2016.
- 2687 RAVANAT, J. L.; DOUKI, T.; CADET, J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA
2688 and its components. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v.
2689 63, n. 1–3, p. 88–102, 2001.
- 2690 REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress,
2691 inflammation, and cancer: how are they linked? **Free radical biology & medicine**, [s. l.], v.
2692 49, n. 11, p. 1603–16, 2010. Disponível em:
2693 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584910005381>>. Acesso em: 21 set.
2694 2016.
- 2695 RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H. De; PELÚZIO, M. do C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA,
2696 S. L. P. Da; QUEIROZ, M. E. L. R. De. A formação e os efeitos das espécies reativas de
2697 oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 133–149, 2005.
- 2698 RIEGER, M. Participation of metalloproteinases in photoaging. **Cosmetics and toiletries**, [s.
2699 l.], v. 114, n. 1, p. 65–70, 1999. Disponível em:
2700 <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=1688593>>. Acesso em: 20 nov. 2016.
- 2701 SAIJA, A. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective
2702 agents. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 199, n. 1, p. 39–47, 2000.
2703 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517300003586>>.
2704 Acesso em: 19 nov. 2016.
- 2705 SAITO, P.; MELO, C. P. B.; MARTINEZ, R. M.; FATTORI, V.; CEZAR, T. L. C.; PINTO, I. C.;
2706 BUSSMANN, A. J. C.; VIGNOLI, J. A.; GEORGETTI, S. R.; BARACAT, M. M.; VERRI, W. A.;
2707 CASAGRANDE, R. The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and
2708 Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice. **Frontiers in Pharmacology**, [s.

- 2709 I.], v. 9, 2018. a.
- 2710 SAITO, P.; MELO, C. P. B.; MARTINEZ, R. M.; FATTORI, V.; CEZAR, T. L. C.; PINTO, I. C.;
2711 BUSSMANN, A. J. C.; VIGNOLI, J. A.; GEORGETTI, S. R.; BARACAT, M. M.; VERRI, W. A.;
2712 CASAGRANDE, R. The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and
2713 Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice. **Frontiers in Pharmacology**, [s.
2714 l.], v. 9, p. 1242, 2018. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30429790>>.
2715 Acesso em: 30 maio. 2021.
- 2716 SANTANA BALOGH, T.; VALÉRIA, M.; VELASCO, R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.;
2717 BABY, A. R. **Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em**
2718 **fotoproteção * Ultraviolet radiation protection: current available resources in**
2719 **photoprotection**. [s.l: s.n.].
- 2720 SAWANE, M.; KIDOYA, H.; MURAMATSU, F.; TAKAKURA, N.; KAJIYA, K. Apelin
2721 attenuates UVB-induced edema and inflammation by promoting vessel function. **The**
2722 **American journal of pathology**, [s. l.], v. 179, n. 6, p. 2691–7, 2011. Disponível em:
2723 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944011008418>>. Acesso em: 23 out.
2724 2016.
- 2725 SCHWARZ, A.; BHARDWAJ, R.; ARAGANE, Y.; MAHNKE, K.; RIEMANN, H.; METZE, D.;
2726 LUGER, T. A.; SCHWARZ, T. Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for
2727 partial involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells. **The**
2728 **Journal of investigative dermatology**, [s. l.], v. 104, n. 6, p. 922–7, 1995.
- 2729 SERHAN, C.; DALLI, J.; KARAMNOV, S.; CHOI, A.; PARK, C. Macrophage proresolving
2730 mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. **Faseb J**, [s. l.], v. 26,
2731 2012. a.
- 2732 SERHAN, C. N.; BRAIN, S. D.; BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; HASLETT, C.; O'NEILL, L.
2733 A. J.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G.; WALLACE, J. L. Resolution of inflammation: state of the
2734 art, definitions and terms. **FASEB journal: official publication of the Federation of**
2735 **American Societies for Experimental Biology**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 325–32, 2007.
2736 Disponível em: <<http://www.fasebj.org/cgi/content/long/21/2/325>>. Acesso em: 24 nov. 2016.
- 2737 SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; DALLI, J.; LEVY, B. D. Lipid mediators in the resolution of
2738 inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. a016311,
2739 2015.
- 2740 SERHAN, C. N.; DALLI, J.; KARAMNOV, S.; CHOI, A.; PARK, C.; XU, Z.; JI, R.; ZHU, M.;
2741 PETASIS, N. A. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration
2742 and controls pain. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 1755–1765, 2012. b.
- 2743 SERHAN, C. N.; MADDOX, J. F.; PETASIS, N. A.; AKRITOPOULOU-ZANZE, I.;
2744 PAPAYIANNI, A.; BRADY, H. R.; COLGAN, S. P.; MADARA, J. L. Design of Lipoxin A4
2745 Stable Analogs That Block Transmigration and Adhesion of Human Neutrophils.
2746 **Biochemistry**, [s. l.], v. 34, n. 44, p. 14609–14615, 1995.
- 2747 SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat**
2748 **Immunol**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. 1191–1197, 2005. Disponível em:
2749 <<http://dx.doi.org/10.1038/ni1276>>
- 2750 SERHAN, C. N.; YANG, R.; MARTINOD, K.; KASUGA, K.; PILLAI, P. S.; PORTER, T. F.;
2751 OH, S. F.; SPITE, M. Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory
2752 and proresolving actions. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 206, n. 1, p. 15–
2753 23, 2009. Disponível em: <<http://jem.rupress.org/content/206/1/15>>. Acesso em: 19 nov.
2754 2016.

- 2755 SHETTY, P. K.; VENUVANKA, V.; JAGANI, H. V.; CHETHAN, G. H.; LIGADE, V. S.;
2756 MUSMADE, P. B.; NAYAK, U. Y.; REDDY, M. S.; KALTHUR, G.; UDUPA, N.; RAO, C. M.;
2757 MUTALIK, S. Development and evaluation of sunscreen creams containing morin-
2758 encapsulated nanoparticles for enhanced UV radiation protection and antioxidant activity.
2759 **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 10, p. 6477–6491, 2015. a. Disponível
2760 em: <pmc/articles/PMC4610788/>. Acesso em: 30 maio. 2021.
- 2761 SHETTY, P. K.; VENUVANKA, V.; JAGANI, H. V.; HONNAPPA, G.; CHETHAN; LIGADE, V.
2762 S.; MUSMADE, P. B.; NAYAK, U. Y.; REDDY, M. S.; KALTHUR, G.; UDUPA, N.;
2763 MALLIKARJUNA, C.; RAO; MUTALIK, S. Development and evaluation of sunscreen creams
2764 containing morin-encapsulate nanoparticles for enhanced UV radiation protection and
2765 antioxidant activity. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 6477–
2766 6491, 2015. b.
- 2767 SNIPPERT, H. J.; HAEGEBARTH, A.; KASPER, M.; JAKS, V.; VAN ES, J. H.; BARKER, N.;
2768 VAN DE WETERING, M.; VAN DEN BORN, M.; BEGTHEL, H.; VRIES, R. G.; STANGE, D.
2769 E.; TOFTGÅRD, R.; CLEVERS, H. Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all
2770 cell lineages of the skin. **Science**, [s. l.], v. 327, n. 5971, p. 1385–1389, 2010.
- 2771 SODIN-SEMRL, S.; TADDEO, B.; TSENG, D.; VARGA, J.; FIORE, S. Lipoxin A 4 Inhibits IL-
2772 1 β -Induced IL-6, IL-8, and Matrix Metalloproteinase-3 Production in Human Synovial
2773 Fibroblasts and Enhances Synthesis of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases . **The Journal**
2774 **of Immunology**, [s. l.], v. 164, n. 5, p. 2660–2666, 2000. Disponível em:
2775 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10679106/>. Acesso em: 15 jun. 2021.
- 2776 SOLIMAN, E.; VAN DROSS, R. Anandamide-induced endoplasmic reticulum stress and
2777 apoptosis are mediated by oxidative stress in non-melanoma skin cancer: Receptor-
2778 independent endocannabinoid signaling. **Molecular carcinogenesis**, [s. l.], v. 55, n. 11, p.
2779 1807–1821, 2016. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mc.22429/full>.
2780 Acesso em: 20 nov. 2016.
- 2781 SOROKIN, A. V.; DOMENICHELLO, A. F.; DEY, A. K.; YUAN, Z. X.; GOYAL, A.; ROSE, S.
2782 M.; PLAYFORD, M. P.; RAMSDEN, C. E.; MEHTA, N. N. Bioactive Lipid Mediator Profiles in
2783 Human Psoriasis Skin and Blood. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 138, n. 7,
2784 p. 1518–1528, 2018.
- 2785 SRINIVASAN, P.; SABITHA, K. E.; SHYAMALADEVI, C. S. Attenuation of 4-nitroquinoline 1-
2786 oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols. **Life sciences**, [s. l.], v. 80,
2787 n. 12, p. 1080–6, 2007. Disponível em:
2788 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320506009118>. Acesso em: 19 nov.
2789 2016.
- 2790 SULLIVAN, N. J.; TOBER, K. L.; BURNS, E. M.; SCHICK, J. S.; RIGGENBACH, J. A.;
2791 MACE, T. A.; BILL, M. A.; YOUNG, G. S.; OBERYSZYN, T. M.; LESINSKI, G. B. UV light B-
2792 mediated inhibition of skin catalase activity promotes Gr-1 + CD11b+ myeloid cell expansion.
2793 **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 132, n. 3 PART 1, p. 695–702, 2012.
2794 Disponível em: <www.jidonline.org>. Acesso em: 13 jun. 2021.
- 2795 T, L.; DA, W.; DW, G. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of
2796 inflammation. **Nature reviews. Immunology**, [s. l.], v. 2, n. 10, p. 787–795, 2002. Disponível
2797 em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12360216/>. Acesso em: 20 jul. 2021.
- 2798 TABAS, I.; GLASS, C. K. **Anti-inflammatory therapy in chronic disease: Challenges and**
2799 **opportunities**, American Association for the Advancement of Science, 2013. Disponível em:
2800 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23307734/>. Acesso em: 15 jun. 2021.
- 2801 TEWARI, A.; GRAGE, M. M. L.; HARRISON, G. I.; SARKANY, R.; YOUNG, A. R. UVA1 is

- 2802 skin deep: Molecular and clinical implications. **Photochemical and Photobiological**
2803 **Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 95–103, 2013. a.
- 2804 TEWARI, A.; GRAGE, M. M. L.; HARRISON, G. I.; SARKANY, R.; YOUNG, A. R. UVA1 is
2805 skin deep: molecular and clinical implications. **Photochemical & photobiological**
2806 **sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the**
2807 **European Society for Photobiology**, [s. l.], v. 12, n. November 2016, p. 95–103, 2013. b.
2808 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23192740>>
- 2809 TOUITOU, E.; GODIN, B. Skin nonpenetrating sunscreens for cosmetic and pharmaceutical
2810 formulations. **Clinics in dermatology**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 375–9, 2008. Disponível em:
2811 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X08000151>>. Acesso em: 19
2812 nov. 2016.
- 2813 VAYALIL, P. K.; ELEMENTS, C. A.; KATIYAR, S. K. Treatment of green tea polyphenols in
2814 hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of
2815 antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin.
2816 **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 927–936, 2003.
- 2817 VENZA, M.; VISALLI, M.; BENINATI, C.; GAETANO, G. V. De; TETI, D.; VENZA, I. Venza et
2818 al., 2015. [s. l.], v. 2015, 2015.
- 2819 VICENTINI, F. T. M. C.; SIMI, T. R. M.; DEL CIAMPO, J. O.; WOLGA, N. O.; PITOL, D. L.;
2820 IYOMASA, M. M.; BENTLEY, M. V. L. B.; FONSECA, M. J. V. Quercetin in w/o
2821 microemulsion: in vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin
2822 damages evaluated in vivo. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics :**
2823 **official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, [s.
2824 l.], v. 69, n. 3, p. 948–57, 2008. Disponível em:
2825 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641108000209>>. Acesso em: 20 nov.
2826 2016.
- 2827 VITALE, N.; KISSLINGER, A.; PALADINO, S.; PROCACCINI, C.; MATARESE, G.;
2828 PIERANTONI, G. M.; MANCINI, F. P.; TRAMONTANO, D. Resveratrol couples apoptosis
2829 with autophagy in UVB-irradiated HaCaT cells. **PloS one**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. e80728, 2013.
2830 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080728>>. Acesso em: 19 nov. 2016.
- 2831 WANG, H.; KOICHEVAR, I. E. Involvement of UVB-induced reactive oxygen species in TGF-
2832 β biosynthesis and activation in keratinocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v.
2833 38, n. 7, p. 890–897, 2005.
- 2834 WEI, H.; ZHANG, X.; WANG, Y.; LEBWOHL, M. Inhibition of ultraviolet light-induced
2835 oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein.
2836 **Cancer Letters**, [s. l.], v. 185, n. 1, p. 21–29, 2002. Disponível em:
2837 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383502002409>>. Acesso em: 20 nov.
2838 2016.
- 2839 WIKONKAL, N. M.; BRASH, D. E. Ultraviolet radiation induced signature mutations in
2840 photocarcinogenesis. In: JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY SYMPOSIUM
2841 PROCEEDINGS 1999, **Anais...** : Blackwell Publishing Inc., 1999.
- 2842 WU, L.; LI, H. H.; WU, Q.; MIAO, S.; LIU, Z. J.; WU, P.; YE, D. Y. Lipoxin A4 Activates Nrf2
2843 Pathway and Ameliorates Cell Damage in Cultured Cortical Astrocytes Exposed to Oxygen-
2844 Glucose Deprivation/Reperfusion Insults. **Journal of Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 56,
2845 n. 4, p. 848–857, 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12031-015-0525-6>>. Acesso em: 9 jun. 2021.
- 2847 WU, R. F.; HUANG, Z. X.; RAN, J.; DAI, S. J.; LIN, D. C.; NG, T. W.; CHEN, Q. X.; CHEN, Q.

- 2848 H. Lipoxin A4 Suppresses Estrogen-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition via ALXR-
2849 Dependent Manner in Endometriosis. **Reproductive Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 566–
2850 578, 2018. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1933719117718271>>.
2851 Acesso em: 17 jun. 2021.
- 2852 WU, Y.; WANG, Y. P.; GUO, P.; YE, X. H.; WANG, J.; YUAN, S. Y.; YAO, S. L.; SHANG, Y.
2853 A lipoxin A 4 analog ameliorates blood-brain barrier dysfunction and reduces MMP-9
2854 expression in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion injury. **Journal of Molecular**
2855 **Neuroscience**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 483–491, 2012. Disponível em:
2856 <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12031-011-9620-5>>. Acesso em: 24 jun. 2021.
- 2857 XU, Y.; FISHER, G. J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin
2858 photoaging. **Journal of Dermatological Science Supplement**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. S1–S8,
2859 2005. Disponível em:
2860 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1574075705000276>>. Acesso em: 19 nov.
2861 2016.
- 2862 YANG, F.; XIE, J.; WANG, W.; XIE, Y.; SUN, H.; JIN, Y.; XU, D.; CHEN, B.; ANDERSSON,
2863 R.; ZHOU, M. Regional arterial infusion with lipoxin A4 attenuates experimental severe acute
2864 pancreatitis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 108525, 2014. Disponível em:
2865 <www.plosone.org>. Acesso em: 9 jun. 2021.
- 2866 ZHAO, Q.; SHAO, L.; HU, X.; WU, G.; DU, J.; XIA, J.; QIU, H. **Lipoxin A4 preconditioning**
2867 **and postconditioning protect myocardial ischemia/reperfusion injury in rats**, *Mediators*
2868 *Inflamm*, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23956501/>>. Acesso em:
2869 21 jun. 2021.
- 2870 ZHOU, X. Y.; WU, P.; ZHANG, L.; XIONG, W.; LI, Y. S.; FENG, Y. M.; YE, D. Y. Effects of
2871 lipoxin A4 on lipopolysaccharide induced proliferation and reactive oxygen species
2872 production in RAW264.7 macrophages through modulation of G-CSF secretion.
2873 **Inflammation Research**, [s. l.], v. 56, n. 8, p. 324–333, 2007. Disponível em:
2874 <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00011-007-7012-7>>. Acesso em: 9 jun. 2021.
- 2875 ZHU, X.; PENG, X.; LIN, J.; ZHANG, Y.; HE, H.; ZHAO, G. Lipoxin A4 activates ALX/FPR2 to
2876 attenuate inflammation in *Aspergillus fumigatus* keratitis. **International**
2877 **Immunopharmacology**, [s. l.], v. 96, p. 107785, 2021. Disponível em:
2878 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576921004215>>. Acesso em: 9 jun. 2021.
- 2879 ZONG, L.; LI, J.; CHEN, X.; CHEN, K.; LI, W.; LI, X.; ZHANG, L.; DUAN, W.; LEI, J.; XU, Q.;
2880 SHAN, T.; MA, Q.; SUN, H. Lipoxin A4 Attenuates Cell Invasion by Inhibiting ROS/ERK/MMP
2881 Pathway in Pancreatic Cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2016,
2882 2016.
- 2883
- 2884
- 2885
- 2886
- 2887
- 2888
- 2889
- 2890