



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DAVID LAIOS DO VALE

**PROTECTINA DX EM MODELO DE IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B:  
AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO CONTRA OS DANOS FOTO-  
OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS DA PELE EM CAMUNDONGOS  
SEM PELO**

---

Londrina  
2022

DAVID LAIOS DO VALE

**PROTECTINA DX EM MODELO DE IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B:  
AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO CONTRA OS DANOS FOTO-  
OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS DA PELE EM CAMUNDONGOS  
SEM PELO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Rúbia Casagrande

Londrina  
2022

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

Vale, David Laios do.

Protectina DX em modelo de irradiação ultravioleta B: avaliação do efeito terapêutico contra os danos foto-oxidativos e inflamatórios na pele de camundongos sem pelo / David Laios do Vale. - Londrina, 2022.  
124 f.

Orientador: Rúbia Casagrande.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Protectina DX - Tese. 2. Inflamação - Tese. 3. Estresse oxidativo - Tese. 4. Lipídio pró-resolução - Tese. I. Casagrande, Rúbia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 61

DAVID LAIOS DO VALE

**PROTECTINA DX EM MODELO DE IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B:  
AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO CONTRA OS DANOS FOTO-  
OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS DA PELE EM CAMUNDONGOS  
SEM PELO**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra Maria de Fátima Borin  
Universidade de Brasília – UnB

---

Profa. Dra Marcela Maria Baracat  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Marco Aurélio Fornazieri  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

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

Londrina, 24 de abril de 2022.

## DEDICATÓRIA

Ao meu pai, José Luiz Barman, que me despertou a curiosidade e me incentivou a percorrer o caminho do conhecimento.

A minha mãe, Eloiza Barman, por acreditar que a educação é transformadora e me incentivar a atingir meu melhor potencial.

Ao meu companheiro, Rogério Silva, pelo apoio, incentivo, amizade e conselho.

A todas as pessoas que perderam algum familiar ou amigo em decorrência da pandemia de COVID.

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, a Deus por ser minha base espiritual, por ter me dado fé que conseguiria atingir meus objetivos pessoais e profissionais.

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo para a realização desta obra e por entenderem a minha ausência em datas importantes.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rúbia Casagrande, por me conduzir no aprimoramento das minhas habilidades científicas, pela autonomia e principalmente por me preparar a ser, futuramente, professor-pesquisador neste país.

Ao Prof. Dr. Waldiceu Verri que contribuiu para esta pesquisa, disponibilizando seu laboratório, equipamentos e seu conhecimento.

À Camilla Arriero que me ajudou nos experimentos, alegrou o laboratório e organizou os protocolos do biotério.

Aos companheiros de laboratório Ingrid, Priscila, Talita, Cristina, Denise, que me auxiliaram nas rotinas do laboratório.

À Telma Saraiva e Tiago Zaninelli que me ajudaram no laboratório de Dor e Inflamação.

Aos colaboradores e aos professores da Pós-Graduação em Ciências da Saúde por todo auxílio prestado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

Aos meus amigos Grégori, Frederico e Isadora pelos anos de amizade e por torcerem pelas minhas conquistas.

A todos os pesquisadores envolvidos na pesquisa da vacina contra o COVID que graças a eles, indiretamente, esta obra pode ser finalizada.

*“A ciência não tem pátria”*

Louis Pasteur

Vale, David Laios. **Protectina DX em modelo de irradiação ultravioleta B**: avaliação do efeito terapêutico contra os danos foto-oxidativos e inflamatórios na pele de camundongos sem pelo. 2022. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## RESUMO

A atenuação dos danos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs) e a resolução da inflamação é um processo fundamental para a homeostasia celular. Durante a exposição excessiva à radiação UVB, ocorre um desequilíbrio na pele, diminuindo as capacidades antioxidantes endógenas e, devido a diversas reações, ocorre um aumento das EROs em decorrência do processo inflamatório estabelecido. Novas substâncias são avaliadas como lipídios pró-resolução derivados do ômega-3, para reduzir os danos causados pela radiação ultravioleta. Dentre estes lipídios destaca-se a protectina DX (PDX), a qual é obtido a partir da dupla lipoxigenação do ácido docohexanóico, encontrado em neutrófilos ou exsudatos inflamatórios, com efeito anti-inflamatório e antioxidante *in vitro* e alguns modelos de inflamação e estresse oxidativo *in vivo*. No entanto, até o momento, seus efeitos contra a pele exposta à radiação UVB não foram documentados. No estudo atual, os camundongos sem pelo e os da linhagem LysM-eGFP foram expostos à radiação UVB (dose de 4,14 J/cm<sup>2</sup>) e após, a pele foi coletada para os ensaios para determinação do efeito antioxidante e anti-inflamatório. Mostramos que a PDX administrado por via intraperitoneal (1 ng administrado antes e após a irradiação) e via tópica (0,7 ng em três tratamentos) foram capazes de diminuir o edema cutâneo, a atividade da metaloproteinase-9, a degradação de fibras colágenas, a apoptose dos queratinócitos e o espessamento epidérmico em comparação com o grupo irradiado e não tratado. Demonstramos que a PDX, nas duas vias de administração, manteve os níveis de glutathiona reduzida, a atividade da catalase, o poder redutor do ferro e a capacidade de reduzir o radical ABTS similares ao controle não irradiado. A PDX também diminuiu a produção de hidróperóxidos, ânions superóxidos e o recrutamento de mastócitos. Por fim, mostramos a redução do recrutamento de neutrófilos marcados em linhagem LysM-eGFP+ e a diminuição de macrófagos no grupo tratado com PDX. Em conclusão, nosso estudo sugere que o PDX tem um papel protetor contra danos fotooxidativos e inflamatórios e pode ser uma terapia eficaz para doenças de pele relacionadas à exposição à radiação.

**Palavras-chaves:** protectina DX; irradiação UVB; antioxidante; inflamação.

Vale, David Laios. **Protectin DX in an ultraviolet B irradiation model**: evaluation of the therapeutic effect against photo-oxidative and inflammatory damage in the skin of hairless mice. 121 p. Thesis (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## ABSTRACT

The attenuation of damage caused by reactive oxygen species (ROS) and the resolution of inflammation is a fundamental process for cellular homeostasis. During excessive exposure to UVB radiation, there is an imbalance on the skin, reducing endogenous antioxidant capacities and, due to various reactions, an increase in ROS occurs as a result of the established inflammatory process. New substances are evaluated as pro-resolving lipids derived from omega-3, to reduce the damage caused by ultraviolet radiation. Among these lipids, protectin DX (PDX) stands out, which is obtained from the double lipoxidation of docosahexaenoic acid, found in neutrophils or inflammatory exudates, with anti-inflammatory and antioxidant effects in vitro and some models of inflammation and oxidative stress in vivo. However, to date, its effects against skin exposed to UVB radiation have not been documented. In the current study, hairless mice and those of the LysM-eGFP strain were exposed to UVB radiation (dose of 4,14 J/cm<sup>2</sup>) and after that, the skin was collected for assays to determine the antioxidant and anti-inflammatory effect. we showed that PDX applied intraperitoneally (1 ng administered before and after irradiation) and topically (0.7 ng in three treatments) were able to decrease skin edema, metalloproteinase-9 activity, collagen fiber degradation, keratinocyte apoptosis, and epidermal thickening compared to the irradiated and untreated group. We demonstrate that PDX, in both forms of administration, maintained reduced glutathione levels, catalase activity, iron-reducing power, and the ability to reduce ABTS radical similar to the non-irradiated control. PDX also decreased the production of hydroperoxides, superoxide anions, and the recruitment of mast cells. Finally, we show a reduction in recruitment of labeled neutrophils in LysM-eGFP<sup>+</sup> lineage and a decrease in macrophages in the group treated with PDX. In conclusion, our study suggests that PDX has a protective role against photooxidative and inflammatory damage and may be an effective therapy for skin diseases related to radiation exposure.

**Key words:** protectin DX; UVB radiation; antioxidant; inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Comparação entre incidência de radiação UVA e UVB em um dia de verão de céu claro (2015) na latitude de 29°4'S (Sul do Brasil) usando radiômetros de banda larga UVB/UVA contínuos (EKO Instruments Trading, Tóquio, Tóquio-para, Japão.....19
- Figura 2** - Modelo de ativação de Nrf-2 pelo fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e pelas EROs. Após ativação de Nrf-2 ocorre a migração para o núcleo e a ligação com o elemento responsivo a antioxidante (ARE) induzindo a transcrição de genes alvos .....20
- Figura 3** - Radiação UVB estimula a inflamação e a sobrevivência da célula através da via STAT3 (fator de transcrição ativado por tirosinas quinases) pelo receptor EGFR (fator de crescimento epidérmico) ou pela ativação das PKCs (proteínas quinase C) .....21
- Figura 4** - Mecanismo de ação da radiação UV na pele e suas consequências .....23
- Figura 5** - Biossíntese de lipídios pró-resolução.....25
- Figura 6** - Biossíntese de protectinas e resolvinas .....26
- Figura 7** - Estrutura química de lipídios pró-resolução derivados do DHA. Diferença da duplas ligações nos trienos conjugados de NPD1 (Z,E,E) e PDX (E,Z,E) .....27
- Figura 8** - Organização dos tempos de tratamento com os protocolos experimentais para avaliação do efeito antioxidante e anti-inflamatório de PDX administrada intraperitoneal .....35
- Figura 9** - Organização dos tempos de tratamento com os protocolos experimentais para avaliação do efeito da PDX administrada por via tópica .....36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -	Constituintes do gel de separação e do gel de concentração .....	38
-------------------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Ativador de proteína-1
ARE	Elemento de resposta antioxidante
APS	Persulfato de amônio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
CDK	Ciclina
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
CYP450	Citocromo P-450
DHA	Ácido docohexanoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade optica
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da media
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe 2+	Ferro
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloreto férrico hexahidratado
FRAP	Poder antioxidante de redução férrica
GPx	Glutathiona peroxidase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
H & E	Hematoxilina e Eosina
HCl	Ácido clorídrico
HO•	Radical hidroxil
HO-1	Hemeoxigenase-1
HTAB	Brometo de hexadecil trietil amônio
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio

IL	Interleucina
I $\kappa$ B	Fator inibidor de $\kappa$ B
JAK	Janus-associated-kinases
KCl	Cloreto de potássio
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio dibásico
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico
KOH	Hidróxido de potássio
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
LPO	Peroxidação lipídica
LPR	Lipídios pro-resolução
MAPK	Proteína ativada por mitógeno
MMPs	Metaloproteinases da matriz
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenine dinucleotídeo fosfato
NAG	N-acetil-glucosamina
NBT	Nitroblue tetrazolium
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear- $\kappa$ B
NPD1	Neuroprotectina D1
Nrf2	Fator nuclear eritróide 3 relacionado ao fator 2
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion superóxido
.OH	Radical hidroxil
PBS	Tampão fosfato salino
PD1	Protectina D1
PDX	Protectina DX
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mesangeiro
RUV	Radiação ultravioleta
RvE1	Resolvina E1
RvE2	Resolvina E2
RvE3	Resolvina E3
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
STAT	Sinal de transdução e ativação da transcrição

TCA	Ácido tricloro acético
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TPTZ	2,4,6 tripiridil-S-triazina
Tris	Hidroximetil aminometano
UV	Radiação ultravioleta
UVB	Radiação ultraviolet B

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO UVB COM A PELE.....	18
1.2	LIPÍDIOS PRÓ-RESOLUÇÃO: PROTECTINAS .....	24
1.3	AÇÃO PRO-RESOLUTIVA DA PROTECTINA PDX.....	27
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
3.1	MATERIAIS.....	31
3.1.1	Materiais de Consumo.....	31
3.1.2	Materiais Permanentes.....	31
3.2	MÉTODOS.....	32
3.2.1	Diluição da Protectina DX (PDX) .....	32
3.2.2	Preparo das Formulações Tópicas.....	32
3.2.3	Animais Experimentais .....	33
3.2.4	Sistema e Fonte de Radiação UVB.....	33
3.2.5	Protocolo Experimental para Administração Intraperitoneal de PDX.....	34
3.2.6	Protocolo Experimental para Administração das Formulações Tópicas .....	36
3.2.7	Avaliação do Edema de Pele.....	37
3.2.8	Determinação da Atividade/Secreção de Proteinases por Zimografia em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) .....	37
3.2.9	Avaliação do Poder Antioxidante Redutor do Ferro na Pele.....	39
3.2.10	Avaliação do Poder Antioxidante Pelo Ensaio de Sequestro do Radical 2,2',Azinobis (3-Etilbenzotiazolina-6-Ácido Sulfônico) (ABTS) .....	39
3.2.11	Quantificação do Antioxidante Endógeno: Glutationa Reduzida (GSH) .....	40
3.2.12	Avaliação dos Níveis do Antioxidante Endógeno: Catalase (CAT) .....	41
3.2.13	Avaliação da Produção de Ânion Superóxido (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ) .....	41
3.2.14	Avaliação da Produção de Hidroperóxido (LOOH).....	42

3.2.15	Histologia.....	43
3.2.16	Atividade NAG .....	43
3.2.17	Ensaio de Imunofluorescência.....	43
3.2.18	Análise Estatística dos Resultados.....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGOS CIENTÍFICOS .....</b>	<b>45</b>
4.1	PRO-RESOLVING PROTECTIN DX ADMINISTERED INTRAPERITONEAL IN HAIRLESS MICE ATTENUATE THE OXIDATIVE AND INFLAMMATORY EFFECTS INDUCED BY UVB IRRADIATION.....	45
4.2	USE OF EMULSION CONTAINING PROTECTIN DX (PDX) AGAINST PHOTOOXIDATIVE AND INFLAMMATORY DAMAGE CAUSED BY UVB- IRRADIATION IN HAIRLESS MICE.....	80
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>110</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>112</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Diversas interações moleculares e celulares reguladas de acordo com as respostas ao meio ambiente ocorrem na pele. Ela é o maior órgão do corpo humano e apresenta diferentes tipos celulares e estruturas que funcionam cooperativamente (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017). Anatomicamente, a pele é dividida em duas camadas: epiderme e derme. A primeira é constituída de cinco estratos: basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo, os quais são responsáveis pela adesão e replicação celular, formação de queratina, barreira contra a penetração de substâncias e impermeabilidade à água (AZULAY, 2017). A segunda é a responsável por apoiar a epiderme e unir a hipoderme, é o local composto por elementos fibrosos, filamentos difusos e celulares, vasos sanguíneos, linfáticos, terminações nervosas, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. Também nesta camada há fibroblastos, fibras de colágeno tipo I e III, fibras elásticas e células do sistema imunológico como macrófagos e mastócitos (MOTOYAMA e KIHARA, 2017; WOLFF, GOLDSMITH, *et al.*, 2011).

Um dos principais fatores físicos que agride a pele é a radiação ultravioleta (RUV), a qual apresenta energia necessária para causar modificações celulares e moleculares alterando o microambiente cutâneo. A RUV faz parte do espectro eletromagnético e está compreendida entre 100 e 400 nm de comprimento de onda. Ela recebe uma subdivisão baseada no comprimento de onda, as quais compreendem: UVA (400-315 nm), UVB (315 a 280 nm) e UVC (menor que 280 nm) (SHETTY, VENUVANKA, *et al.*, 2015). A RUV consegue atingir diferentes camadas da pele, por exemplo, a radiação UVA consegue penetrar em estratos mais profundos da epiderme, por outro lado, a radiação UVB é absorvida predominantemente na epiderme afetando os queratinócitos. Já UVC não atinge a pele porque é bloqueada pela camada de ozônio. Todas as moléculas presentes na pele como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e que apresentam ligação dupla ou tripla entre os carbonos, podem absorver esta energia da RUV, sendo denominados posteriormente de cromóforos (TEWARI, GRAGE, *et al.*, 2013). Os cromóforos reagem com o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) (XU e FISHER, 2005). Estas por sua vez também são produzidas pela respiração aeróbia, ativação

de leucócitos durante a inflamação e absorção de radiação ionizante produzindo ânion superóxido (HIRAMOTO, KOBAYASHI, *et al.*, 2012).

A geração excessiva de EROs, em consequência da exposição prolongada à RUV, pode interferir com mecanismos de ação e interação direta com o DNA, RNA e outros componentes celulares (MARTINEZ, PINHO-RIBEIRO, *et al.*, 2015; FERNANDEZ, VAN LONKHUYZEN, *et al.*, 2014). No entanto, a pele apresenta mecanismos para inibir ou remover as EROs utilizando enzimas como a catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e outras substâncias presentes como alfa tocoferol e beta caroteno (HUBER, ALMEIDA e FÁTIMA, 2008). Quando a produção de EROs ultrapassa a capacidade das células em reduzi-las quimicamente, a concentração de radicais livres aumenta incontrolavelmente, rompendo o equilíbrio oxidante/antioxidante, instalando-se o estresse oxidativo cutâneo, desencadeando o início do processo de carcinogênese (VITALE, KISSLINGER, *et al.*, 2013; SOLIMAN e DROSS, 2016; VENZA, VISALLI, *et al.*, 2015).

Além dos efeitos oxidantes, a RUV causa inflamação através da ativação dos queratinócitos em expressar uma variedade de citocinas, quimiocinas e recrutamento de outras células do sistema imune como mastócitos e neutrófilos. Estas células polimorfonucleares liberam diversas enzimas como as metaloproteinases responsáveis em degradar o colágeno, influenciando diretamente no fotoenvelhecimento cutâneo (TERUI, OKUYAMA e TAGAMI, 2001; VERRI, VICENTINI, *et al.*, 2012). Somado a isso, elas também geram EROs, necessitando ainda mais da ação dos antioxidantes endógenos para reestabelecer a homeostasia celular. Ao nível molecular, a RUV induz a fosforilação de tirosina-quinase associada ao receptor de proteína-quinase C, ativa fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF-kB), fator de proteína-1 (AP-1) e p53, os quais expressam uma série de genes responsáveis pela produção de enzimas que regulam o ciclo celular, estimulam a produção de interleucinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatória (IL-10) (AHN, KIM, *et al.*, 2013; KWON, AHN, *et al.*, 2015).

Clinicamente, a RUV causa modificações cutâneas agudas em decorrência da inflamação local como eritema, edema, dor e alteração do tecido. A queimadura solar é a principal consequência aguda que ocorre após o excesso de exposição a RUV (SKOTARCZAK, OSMOLA-MAŃKOWSKA, *et al.*, 2015). Não obstante, outras

doenças cutâneas também podem se desenvolver como a urticária solar, dermatite actínica crônica e tantas outras são agravadas pela exposição à RUV como Lupus Eritematoso Sistêmico, Dermatomiosite, Porfíria cutânea e o Xeroderma Pigmentoso (JUNIOR, CHIACCHIO e CRIADO, 2018). Este último, por exemplo, é uma doença genética, na qual não há proteínas de reparo celular e a RUV amplifica os danos no DNA dos queratinócitos aumentando o risco de desenvolvimento de melanoma e outras neoplasias cutâneas (BLACK, 2016).

Neste contexto, novas terapias são necessárias para controlar ou inibir a inflamação e o estresse oxidativo cutâneo induzidos pela radiação UVB. Uma nova classe de fármacos ganhou repercussão pelo seu efeito anti-inflamatório denominados lipídios pró-resolução (SERHAN, 2014). Estudos anteriores já mostram efeito terapêutico do uso de maresina e resolvina no modelo de irradiação UVB em pele de camundongos (CEZAR, MARTINEZ, *et al.*, 2019; SAITO, MELO, *et al.*, 2018). A administração intraperitoneal e tópica destes LPR pode afetar as alterações moleculares desencadeadas pela RUV e conseqüentemente as sequelas biológicas e clínicas resultantes.

Deste modo, destaca-se a protectina DX, um ácido graxo poliinsaturado di-hidroxiado, isômero da protectina D1, pertencente à classe de mediadores endógenos referidos como mediadores lipídicos pró-resolução (SERHAN e PETASIS, 2011). A PDX é um ácido produzido por dupla lipoxigenação do ácido docohexanóico que apresenta propriedade anti-inflamatória além das ações pró-resolução, incluindo a inibição da infiltração de células polimorfonucleares, proteção dos órgãos afetados e estimulação da regeneração do tecido (LAGARDE, GUICHARDANT e BERNOUD-HUBAC, 2020). Há estudos que mostram que a PDX regula citocinas, aumenta limiar de dor e estimula as ações mediadas por macrófagos como a própria fagocitose (FONSECA, ORLANDO, *et al.*, 2017).

Não há na literatura o uso de PDX para avaliação de inflamação e estresse oxidativo cutâneo induzidos pela radiação UVB. Sendo assim, a proposta deste trabalho foi avaliar o efeito terapêutico da PDX *in vivo*, administrada por via intraperitoneal e via tópica contra os danos causados pela exposição à RUV.

Os próximos tópicos abordarão os danos causados na pele por exposição a UVB e PDX como fármaco promissor as novas abordagens terapêuticas.

## 1.2 INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO UVB COM A PELE

No início do século XIX, Johan Ritter identificou no espectro solar uma região que estava além da luz visível violeta denominada de radiação ultravioleta, a qual compreende o comprimento de onda que varia de 400 a 100 nm. Em 1932 foi apresentada, pela primeira vez na reunião de Copenhague do Segundo Congresso Internacional de Luz, as propriedades de transmissão de três filtros de lâmpadas as quais dividem a RUV em UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (abaixo de 290 nm) (LIM, HÖNIGSMANN e HAWK, 2007). Esta divisão, especialmente para a pesquisa em pele é de extrema importância já que a radiação UVA consegue ultrapassar a camada epidérmica e a UVB é essencialmente absorvida na primeira camada cutânea (SHETTY, VENUVANKA, *et al.*, 2015).

A radiação eletromagnética é avaliada baseando-se na teoria das partículas e sua energia é denominada fótons. A energia de cada fóton é expressa pela lei de Planck, na qual os níveis de energia são iguais a constante de Planck multiplicado pela frequência do fóton (LIM, HÖNIGSMANN e HAWK, 2007). O produto desta equação então é inversamente proporcional ao comprimento de onda. Ou seja, quanto maior o comprimento de onda menor é o conteúdo energético.

No entanto, a dose necessária de radiação UV para resultar eritema ou quaisquer lesões cutâneas é calculado pelo tempo de exposição e irradiância da lâmpada UVB (CASAGRANDE, GEORGETTI, *et al.*, 2006a). A irradiância se refere a intensidade de radiação incidente (medida por um aparelho chamado radiômetro) e expressa em unidades miliwatts por centímetro quadrado. A dose é calculada pelo tempo integral da irradiância e é expressa em Joules por centímetro quadrado.

$$Dose\ de\ irradiação\ \left(\frac{J}{cm^2}\right) : \frac{tempo\ exposição\ (min) \times 60 \times irradiância\ \left(\frac{mW}{cm^2}\right)}{1000}$$

A dose mínima necessária para causar eritema leve é de 0,7Jcm<sup>-2</sup>. Shindo *et al.*, 1994 verificou que a exposição solar durante 4-5 horas no outono em uma latitude na Califórnia (38°N) resultava em uma dose de irradiação de 25 Jcm<sup>-2</sup>. Em outro estudo foi comparada a dose de irradiação de UVA e UVB em um mesmo local (latitude, longitude e altitude) e identificaram que a UVA foi maior durante o dia, conforme ilustrado abaixo:

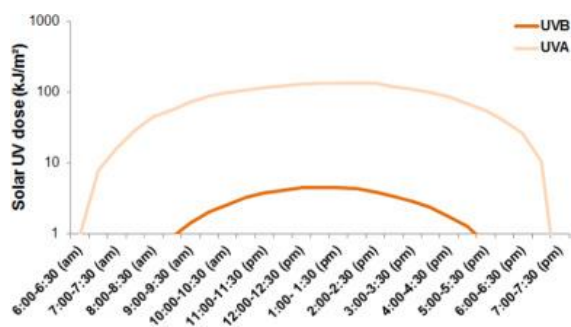


Figura 1: Comparação entre incidência de radiação UVA e UVB em um dia de verão de céu claro (2015) na latitude de 29°4'S (Sul do Brasil) usando radiômetros de banda larga UVB/UVA contínuos (EKO Instruments Trading, Tóquio, Tóquio-para, Japão) (SCHUCH, MORENO, *et al.*, 2017).

Uma vez que a RUV possui energia e esta é absorvida pelos componentes da pele (melanina, proteínas e DNA, por exemplo), ocorre a formação dos cromóforos (YOUNG, 1997). Os cromóforos podem liberar a energia absorvida na forma de luz, calor ou passar por reações químicas. Essas reações são de maior interesse em dermatologia pois os produtos formados iniciam mudanças celulares que levam a respostas clínicas. Exemplo dessa reação é a absorção da RUV pela 7-deidrocolesterol transformando em pré-vitamina D3 até formar a vitamina D3 (IRURETAGOYENA, HIRIGOYEN, *et al.*, 2015). Entretanto, outras reações não são benéficas à pele como, por exemplo, a formação de radicais livres gerados a partir dos cromóforos (oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio ou hidroxila) (TRAUTINGER, 2001).

O estrato córneo é composto por células achatadas, mortas e sem núcleo com queratina no citoplasma, contendo ceramidas e lipídios neutros (colesterol, ácidos graxos e estéres de colesterol) (FOLDVARI, 2000). A RUV danifica direta e indiretamente tais lipídios do estrato córneo e as membranas lipídicas das células vivas, gerando também espécies reativas de oxigênio (EROs) (ZIEGLER, JONASON, *et al.*, 1994). Todavia, as EROs são depuradas por mecanismos enzimáticos como a catalase (decompõe o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água), superóxido dismutase (converte o superóxido em peróxido de hidrogênio), glutathiona peroxidase e os não enzimáticos como alfa tocoferol, ácido ascórbico, beta caroteno (PODDA, TRABER, *et al.*, 1998; HUBER, ALMEIDA e FÁTIMA, 2008). Somado a isso, os lipídios

oxidados nas membranas dos queratinócitos são clivados pela enzima fosfolipase A2 para formar o ácido araquidônico, o qual é substrato da enzima ciclo-oxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) produzindo prostaglandinas que medeiam diversas reações inflamatórias (MAGNONI, EUCLIDI, *et al.*, 2002).

A pele apresenta mecanismos endógenos que contrabalançam a produção das EROs e um destes mecanismos é a ativação do fator de transcrição Nrf-2 (fator nuclear derivado de eritróide -2) (Figura 2). Quando o Nrf-2 é ativado, ele migra para o núcleo da célula e se liga ao elemento responsivo a antioxidante (ARE) induzindo a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes como a própria superóxido dismutase, catalase entre outros (BEYER, KELLER, *et al.*, 2007). O fator de transcrição Nrf-2 também regula a produção de enzimas anti-inflamatórias como a hemeoxigenase-1 (HO-1). No entanto a atividade da Nrf-2 pode ser regulada negativamente pelo aumento de citocinas inflamatórias como a IL-1 $\beta$  e IL-6 e metaloproteinase-9.

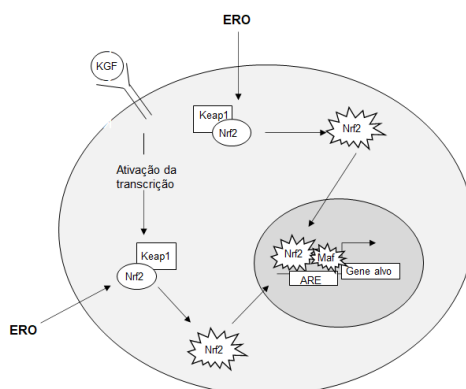


Figura 2: Modelo de ativação de Nrf-2 pelo fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e pelas EROs. Após ativação de Nrf-2 ocorre a migração para o núcleo e a ligação com o elemento responsivo a antioxidante (ARE) induzindo a transcrição de genes alvos - figura modificada (BRAUN, HANSELMANN, *et al.*, 2002).

Algumas proteínas que agem como cromóforos também são receptores de superfície celular. A RUV consegue agir em tais receptores de membrana mesmo sem ligantes e quando ativados, fosforilam proteínas citoplasmáticas responsáveis pela sinalização celular (produção de novas proteínas, divisão celular entre outros). Um exemplo é o que ocorre com os receptores CD95 que são ativados pela RUV levando à apoptose celular, independentemente do DNA (BANG, GNIADOCKI, *et al.*, 2003).

No entanto, a RUV também atua em algumas proteínas mantendo-as permanentemente fosforiladas ativando vias de respostas celulares como a produção excessiva de metaloproteinases (MMP) (ZIEGLER, JONASON, *et al.*, 1994).

Sobre as modificações celulares, é sabido que as células epidérmicas como queratinócitos, Langerhans, melanócitos e leucócitos contribuem para liberação de citocinas após exposição à RUV. Diversas citocinas são liberadas, principalmente pelos queratinócitos, incluindo IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), entre outros (ANSEL, PERRY, *et al.*, 1990; GRÖNE, 2002). Os danos causados pelas EROs estimulam a liberação de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e estas iniciam a via de sinalização intracelular e a expressão gênica para produção de mais citocinas. Ademais, as EROs fosforilam o inibidor kappa B ativando o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), que vai até o núcleo e promove a expressão de genes de citocinas (RYU, KANG, *et al.*, 2019; BELLEZZA, MIERLA e MINELLI, 2010). Este fator também é ativado pela própria RUV e, portanto, há aumento da quantidade de citocinas e com isso ocorre aumento do recrutamento de células do sistema imunológico para a pele deixando o órgão inflamado.

Outra via ativada corresponde aos fatores de transcrição STAT (*signal transducers and activators of transcription*) que permitem a proliferação e sobrevivência de queratinócitos expostos à UVB e promoção da inflamação da pele. Basicamente, após a exposição à UVB o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é ativado e então fosforila o *Janus-associated-kinase* (Jak), o qual se liga ao STAT3 e através de uma cascata de reações se une ao DNA e aumenta a transcrição de genes pró-inflamatórios e inibe a apoptose (Figura 3) (FEEHAN e SHANTZ, 2016).

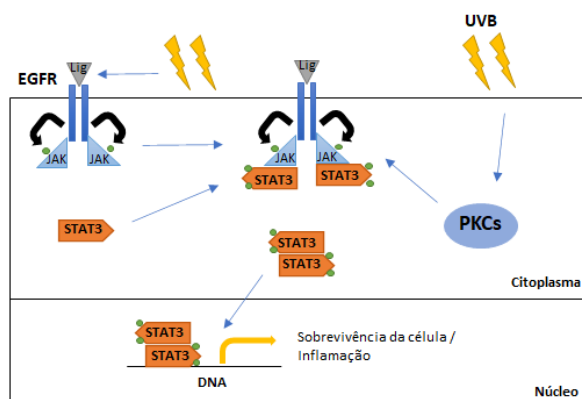


Figura 3: Radiação UVB estimula a inflamação e a sobrevivência da célula através da via STAT3 (fator de transcrição ativado por tirosinas quinases) pelo receptor EGFR (fator de

crescimento epidérmico) ou pela ativação das PKCs (proteínas quinases C) - figura modificada (FEEHAN e SHANTZ, 2016).

A exposição à RUV altera a morfologia dos queratinócitos condensando a cromatina e formando as células denominadas “sunburns cells” resultando no processo de apoptose (YOUNG, 1987; LAETHEM, CLAERHOUT, *et al.*, 2005). Apesar disso, ocorre estímulo da camada basal replicando mais queratinócitos e, como consequência há o aumento da espessura da camada epidérmica evidenciado em outros estudos (CEZAR, MARTINEZ, *et al.*, 2019; KUMAGAI, MARTINEZ, *et al.*, 2021). O óxido nítrico, é outra substância produzida pelos queratinócitos e que reage com o superóxido formando peroxinitrito. Este é um potente ativador de várias vias de sinalização, incluindo MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) e as cascatas de sinalização da tirosina quinase. O óxido nítrico também desempenha função na resposta inflamatória causando vasodilatação e eritema (LORCA e WU, 2020; CHANG, TSAO, *et al.*, 2003).

Mais dois fatores de transcrição estão envolvidos com a resposta à RUV: AP-1 e p53. O AP-1 desempenha papel relevante para o ciclo celular uma vez que quando ativado induz a proliferação, diferenciação e apoptose celular. Ele também interfere com a síntese de colágeno tipo I e III, bloqueia o efeito de algumas citocinas como o TGF- $\beta$  e aumenta a atividade de enzimas responsáveis por degradar os componentes da matriz extracelular (metaloproteinase) (AHN, KIM, *et al.*, 2013; ONOUE, KOBAYASHI, *et al.*, 2003).

Já o p53, conhecido por ser um gene supressor tumoral (*TP53*), é responsável por codificar uma proteína que regula negativamente a progressão do ciclo celular, chamada de proteína p53. Essa proteína apresenta meia vida curta, quando não mutada (HARRIS, 1996) e se liga a um promotor de gene descrito como WAF1 produzindo a proteína p21. Especificamente, a p21 terá um efeito significativo na divisão da célula. Para uma célula progredir de G1 para S, na fase de mitose, as proteínas ciclinas ligam-se às enzimas quinases dependentes de ciclina (CdK) e as ativam. Então este complexo de ciclinas e CdKs fosforilam outras proteínas responsáveis pela progressão da célula em fase S. Quando há a presença do p21, este se liga ao complexo ciclina e Cdks bloqueando sua atividade e impedindo a fosforilação das proteínas responsáveis pela transição de fases da célula na mitose.

Portanto, interrompe-se a fase G1 e a célula entra em apoptose (HAINAUT e HOLLSTEIN, 1999).

Contudo quando há mutação no gene *TP53*, não ocorre a transcrição adequada para proteína supressora tumoral e não ativa a transcrição de outros genes, consequentemente não ocorre o bloqueio da atividade da Cdk e a célula não interrompe sua progressão durante a mitose impedindo o processo de apoptose (EL-DEIRY, 2016). A progressão de células com alterações no DNA pode levar a um acúmulo de mutações adicionais e aumentar a probabilidade de desenvolver neoplasia.

Dessa forma, há inúmeros mecanismos que são ativados pela RUV levando à inflamação cutânea, ao fotoenvelhecimento e ao câncer de pele (Figura 4). Assim, o uso de novas substâncias que atuam nos mecanismos fisiopatológicos surge como uma alternativa nas terapias de fotoproteção e prevenção de doenças cutâneas.

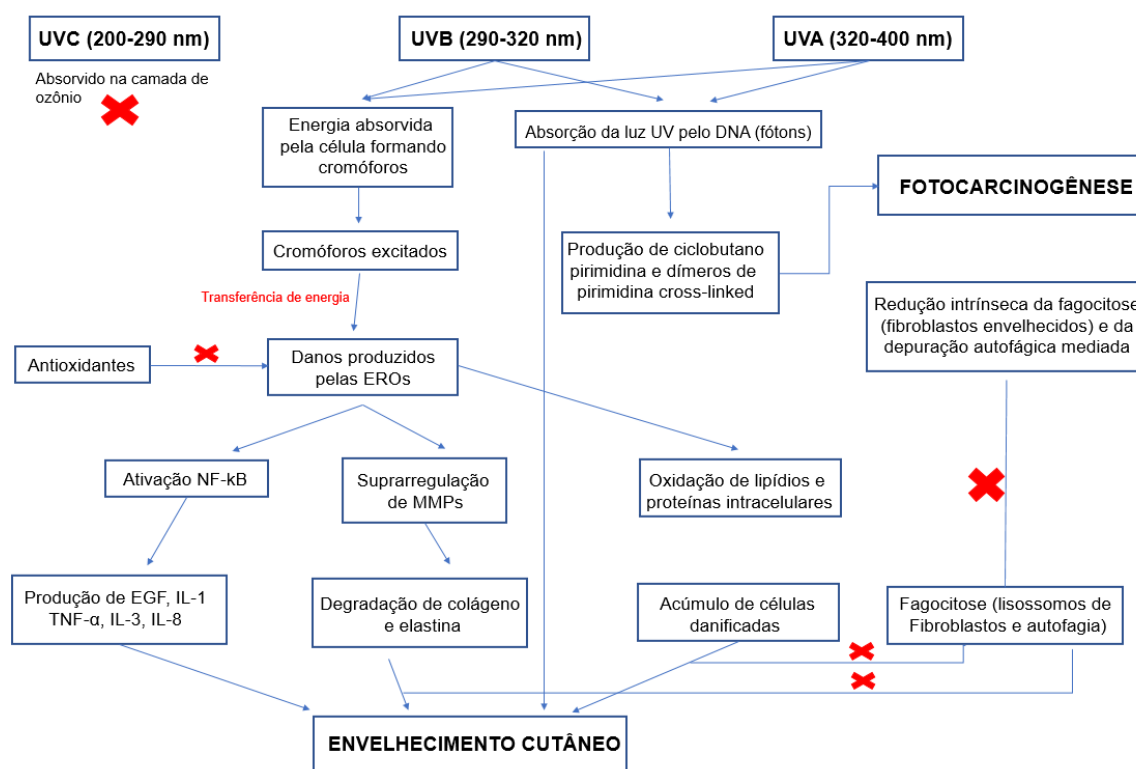


Figura 4: Mecanismo de ação da radiação UV na pele e suas consequências. EROs = espécies reativas de oxigênio, EGF = fator de crescimento epidermal, MMPs = metaloproteinases, IL = interleucina, TNF = fator de necrose tumoral, X = reação bloqueada. Figura modificada (PEDIĆ, PONDELJAK e ŠITUM, 2020).

## 1.2 LIPÍDIOS PRÓ-RESOLUÇÃO: PROTECTINAS

A injúria inflamatória ativa mediadores nas células danificadas produzindo ácido araquidônico pelas enzimas fosfolipases e por diferentes reações produz as prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas (ABBAS, KUMAR, *et al.*, 2010). As prostaglandinas são produzidas pelos mastócitos, macrófagos e células endoteliais através da ação de duas enzimas, ciclooxigenase-1 e ciclooxigenase-2, e estão envolvidas na patogenia da dor, febre, deixando a pele sensível à dor (alodínia) (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). Já os leucotrienos, formados pela ação das lipoxigenases, são secretados pelos leucócitos e têm como ação a quimiotaxia de neutrófilos, os quais geram EROs e liberam enzimas lisossômicas. (WRIGHT, MOOTS, *et al.*, 2010). As lipoxinas, diferente dos outros dois, inibem o recrutamento dos leucócitos e os componentes celulares da inflamação (SERHAN, CHIANG e DYKE, 2008).

Durante anos supunha-se que a resolução da inflamação ocorria de forma passiva. No entanto, novos estudos mostram que esta fase de resolução é proveniente de lipídios pró-resolução derivados do ômega 3 e classificados em quatro grupos: lipoxinas, resolvinas, maresinas e protectinas (Figura 5) (SERHAN, CHIANG e DALLI, 2018). A fase pró-resolutiva se inicia principalmente em células da imunidade inata, como neutrófilos e macrófagos. A fase de resolução começa com o aparecimento de uma classe de mediadores lipídicos, responsável por direcionar a síntese para a formação dos lipídios pró-resolução. A primeira classe sintetizada são as lipoxinas que iniciam a fase resolutiva da inflamação, sendo, posteriormente, acompanhadas pela síntese de outras classes de lipídios pró-resolução, provenientes do ácido eicosapentaenóico e docohexanóico, em concentrações e tempos diferentes (SERHAN, 2014).

O ácido eicosapentaenóico (EPA) por ação da enzima COX-2 (dependente ou não de ácido acetilsalicílico) ou por enzimas do citocromo P450, forma o ácido 18-hidroperóxi-eicosapentaenóico e, posteriormente, ácido 18-hidroxi-eicosapentaenóico. Este intermediário é convertido por leucócitos humanos em resolvina E1 e E2 por ação da enzima 5 lipoxigenase. Já a resolvina E3 é produzida pela ação da enzima 15 lipoxigenase (SERHAN, CHIANG e DALLI, 2018). As resolvinas da série E já mostraram reduzir a inflamação dérmica, peritonite, migração

de células dendríticas e a produção de interleucinas inflamatórias em estudos anteriores (ARITA, BIANCHINI, *et al.*, 2005; ISOBE, ARITA, *et al.*, 2012).

O ácido docohexanóico (DHA) é encontrado em muitos tecidos, como a retina, os pulmões e o sistema nervoso. Ele é precursor de três famílias de lipídios pró-resolução, quimicamente distintos, os quais incluem as resolvinas da série D, protectinas e as maresinas. O DHA sofre reação de lipoxigenação produzindo o ácido 14-hidroperoxi-docohexanóico e então forma as maresinas. No entanto, o DHA também pode reagir com a COX-2 ou a enzima 15 lipoxigenase formando as protectinas ou as resolvinas da série D (SERHAN, CHIANG e DALLI, 2018). A maresina e as resolvinas série D já foram avaliadas em modelo de inflamação/estresse oxidativo em pele e mostraram-se ativas contra os danos cutâneos causados pela radiação UVB (SAITO, MELO, *et al.*, 2018; CEZAR, MARTINEZ, *et al.*, 2019). Porém, ainda não há na literatura informações sobre protectina em modelo de irradiação UVB.

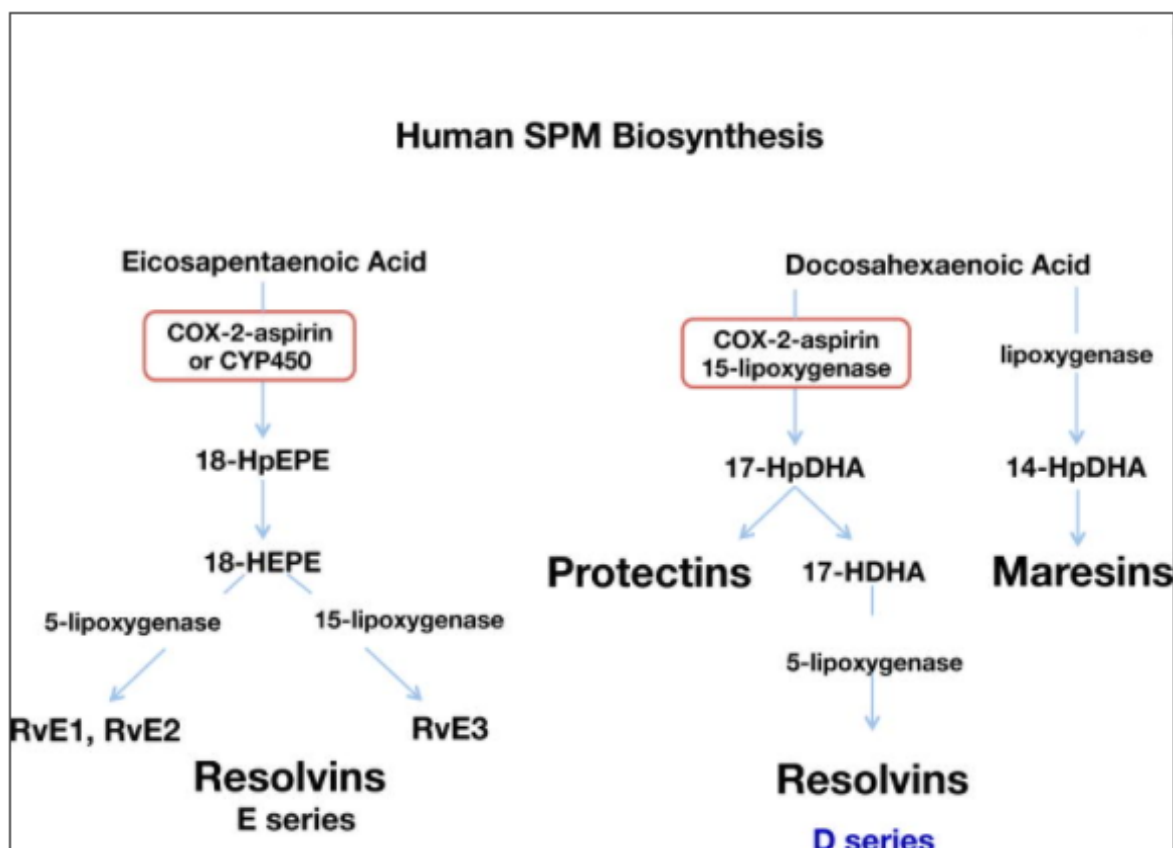


Figura 5: Biossíntese de lipídios pró-resolução. COX-2: ciclooxigenase 2; CYP450: citocromo P450; 18-HpEPE: ácido 18-hidroperoxi-eicosapentaenóico; 18-HEPE: ácido 8-hidroxi-eicosapentaenóico; RvE1: resolvina E1; RvE2: resolvina E2; RvE3: resolvina E3; 17-HpDHA:

ácido 17-hidroperoxi-docohexanóico; 17-HDHA: ácido 17-hidro-docohexanóico; 14-HpDHA: ácido 14-hidroperoxi-docohexanóico (SERHAN, CHIANG e DALLI, 2018).

Sobre a família protectina, houve esclarecimento em relação a sua estrutura química, uma vez que apresentam 2 substâncias derivadas do DHA, as quais possuem um grupo álcool no carbono 17: neuroprotectina D1(NPD1)/protectina D1 (PD1) e protectina DX (PDX). Atualmente há uma divergência na literatura a respeito da protectina D1 (PD1) e a protectina DX (PDX) por conta da configuração de seu carbono assimétrico (BALAS, GUICHARDANT, *et al.*, 2014). Estereoisômeros, como PD1 e PDX são biológica e farmacologicamente diferentes. A talidomida, que ficou mundialmente conhecida por causa teratogenicidade com o fármaco levógero (S), é exemplo da importância da diferença dos estereoisômeros, uma vez que o enântiômero dextrógero (R) apresenta propriedades analgésicas, sedativas e antieméticas (TOKUNAGA, YAMAMOTO, *et al.*, 2018). Esclarecer a estrutura química é importante pois determina a ação farmacológica e possibilita o desenvolvimento de novos medicamentos em escala industrial.

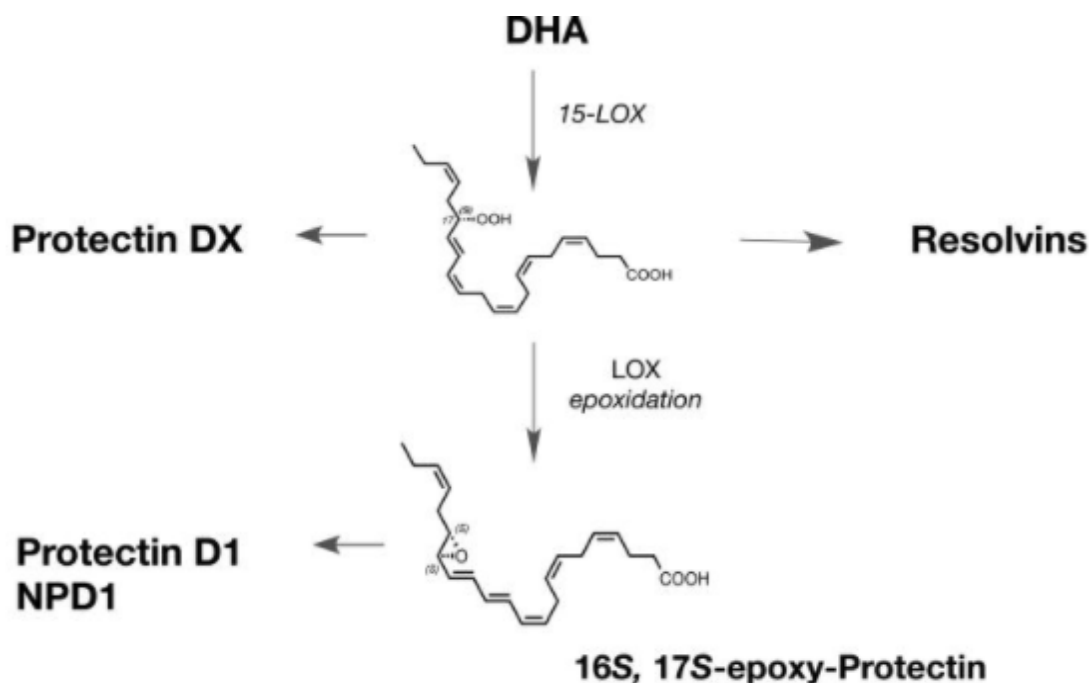


Figura 6: Biossíntese de protectinas e resolvinas. 15-LOX: 15- lipoxigenação (SERHAN, CHIANG e DALLI, 2018).

O NPD1 foi descoberto em 2003 e foi denominado neuroprotectina devido as suas propriedades neuroprotetoras no cérebro após isquemia e ação contra o estresse oxidativo e por ter sido o primeiro mediador neuroprotetor (MUKHERJEE, MARCHESELLI, *et al.*, 2004). Anos depois, Serhan *et al.*, 2011 mostraram que além de sua atividade no sistema nervoso, este lipídio pró-resolução tem efeitos em outros órgãos e então renomearam para protectina D1 (PD1). Esta substância é biossintetizada por meio de uma mono-lipoxigenação seguida de formação de epóxido nos carbonos 16 e 17. PD1 foi identificada em cérebro, sangue humano, células gliais, neutrófilos, macrófagos, células T e epitélio pigmentar da retina (BAZAN, 2009; SHEETS, JUN, *et al.*, 2013).

PDX (ácido 10(S),17(S)Dihidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-hexaenóico) é uma protectina da série D, ou seja, do DHA (Figura 7). É obtida da dupla lipoxigenação do ácido docohexanóico, encontrado em neutrófilos ou exsudatos inflamatórios (BALAS, GUICHARDANT, *et al.*, 2014). Tem massa molecular de 360,23, logP 5,06, solúvel em etanol, absorvância em 270 nm (CAYMAN CHEMICAL, 2019).

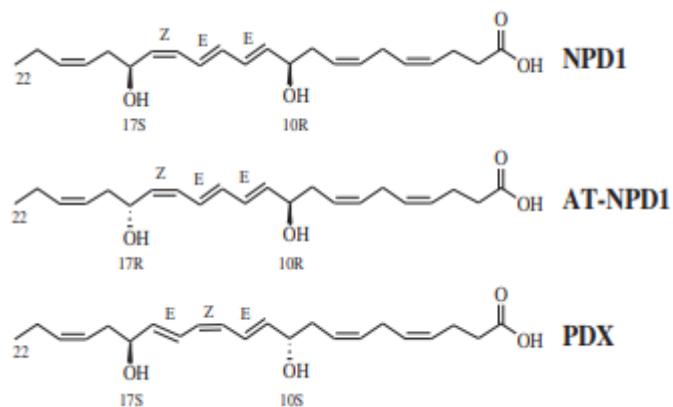


Figura 7: Estrutura química de lipídios pró-resolução derivados do DHA. Diferença das duplas ligações nos trienos conjugados de NPD1 (Z,E,E) e PDX (E,Z,E) - Modificado (BALAS, GUICHARDANT, *et al.*, 2014).

### 1.3 AÇÃO PRO-RESOLUTIVA DA PROTECTINA PDX

Um dos primeiros estudos a respeito da ação biológica da PDX mostrou a diminuição da agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico e colágeno, o

que não foi verificado em outros compostos derivados do DHA como os trienos conjugados E, E, Z (PD1) e os derivados trans (E, E, E). O mecanismo de inibição da agregação plaquetária ocorre pela ação antagônica da PDX no receptor de tromboxano A<sub>2</sub> e na inibição da COX-1 (CHEN, VÉRICEL, *et al.*, 2011).

A PDX tem efeito antioxidante devido ao aumento de proteínas como catalase e superóxido dismutase evidenciado em estudo utilizando células endoteliais da veia umbilical humana e tratadas com hidróperóxido (HWANG, JUNG, *et al.*, 2019). Ela inibe a produção de EROs, por meio da inibição da NADPH oxidase, induzida por formil-metionil-leucil-fenilalanina, e a liberação de mieloperoxidase por neutrófilos humanos em uma dose-dependente de 10 µM. No entanto, este ensaio *in vitro* mostrou que apenas 8% da PDX foi incorporada aos neutrófilos após período de incubação. Neste mesmo estudo, a COX-2, uma enzima abundante em macrófagos ativados e outras células inflamatórias, foi inibida pela presença da PDX (LIU, BOUSSETTA, *et al.*, 2014).

Outro mecanismo de ação da PDX está relacionado com a supressão da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNO), presente nos músculos e no fígado de camundongos (WHITE, ST-PIERRE, *et al.*, 2014). O óxido nítrico é liberado durante a inflamação e causa vasodilatação com aumento da permeabilidade capilar levando ao edema, conforme discutido no item 1.2. Somado a isso, este lipídio pró-resolução mostrou-se eficaz em reduzir as citocinas inflamatórias como TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-6 e IL-17, no modelo de resistência à insulina. Somado a isso, PDX promove a fosforilação do AMPK (proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina) responsável pelo processo de modulação de diferentes vias metabólicas, reduzindo a produção e a liberação de citocinas pró-inflamatórias e contribuindo para a homeostasia celular (KIM, YANG, *et al.*, 2016). Em outro estudo Jung *et al.*, 2017 demonstraram, em células C2C12 tratadas com palmitato, que o PDX induziu a fosforilação do AMPK, bloqueando o IκB e consequentemente evitando a translocação do fator NF-κB para o núcleo.

A PDX é capaz de regular o edema pulmonar através da expressão da proteína Na, K-ATPase promovendo drenagem do fluido alveolar através da via de sinalização ligada ao AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) pela via do ALX (receptor de lipoxina 4) e pela via Nedd4-2 (*neural precursor cell expressed*

*developmentally down-regulated 4-like*) (ZHUO, HAO, *et al.*, 2018). Em outro estudo, foi analisado o potencial da PDX em lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeos, o qual mostrou que dentre as três doses utilizadas (1, 10 e 100 ng/camundongo) apenas o grupo tratado com 1 ng apresentou resultado satisfatório. Nesta mesma concentração ocorreu a inibição de citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e aumentou a liberação de citocina anti-inflamatória IL-10 (TAN, CHEN, *et al.*, 2018). Estudo feito por Li *et al.*, 2017 mostrou que a PDX inibiu a infiltração das células inflamatórias e a deposição de matriz extracelular (colágeno) no modelo de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina, corroborando com estes resultados.

Os macrófagos, ativados durante o processo inflamatório, são derivados de precursores dos monócitos e sofrem diferenciação específica dependendo do tecido lesionado. Os fenótipos dos subconjuntos de macrófagos são denominados macrófago M1 e M2. O primeiro é caracterizado pela produção de citocinas pró-inflamatórias, produção de EROs e promoção de resposta Th1. Já o segundo participa da remodelação de tecidos, regulação da resposta imune, além de secretar IL-10, CCL17, CCL22 e CCL24 (DAVIS, TSANG, *et al.*, 2013). Logo, uma via que pode ser utilizada para otimizar a resposta inflamatória é o uso de fármacos que ativem macrófagos M2. Xia *et al.*, 2017 relataram que PDX aumenta a sobrevivência de camundongos em modelo de sepse por meio da atividade fagocítica dos macrófagos, diminuindo a resposta inflamatória e facilitando a polarização M2 de macrófagos peritoneais.

De acordo com as informações discutidas, os lipídios pró-resolução mostram-se como substâncias promissoras para novos medicamentos por agirem nos mecanismos fisiopatológicos ocasionados pela radiação UVB. Entretanto, o efeito terapêutico da protectina DX administrada por via intraperitoneal e incorporada em formulação para uso tópico *in vivo* ainda não foi avaliado para modelo de inflamação e estresse oxidativo induzido pela radiação UVB.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antioxidante e anti-inflamatório/pró-resolução do lipídio protectina DX administrado via intraperitoneal e tópica no controle dos danos cutâneos induzidos pela radiação UVB.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos terapêuticos, mecanismo de ação e a melhor dose-resposta da protectina DX quando administrada via intraperitoneal e incorporado em formulação por via tópica no modelo de lesão cutânea induzida pela radiação UVB com enfoque em:
  - Edema de pele;
  - Atividade de metaloproteinase-9;
  - Recrutamento de macrófagos e neutrófilos;
  - Atividade do poder antioxidante da pele por meio dos ensaios de ABTS (2,2´azino-bis (3-etilbenzoatizolina-6-ácido sulfônico) e FRAP (poder de redução do íon ferro);
  - Níveis de antioxidante endógeno glutathiona e catalase;
  - Produção de hidroperóxidos e de ânions superóxidos;
  - Avaliação da espessura da epiderme, densidade de fibras colágenas número de queratinócitos apoptóticos e mastócitos através do ensaio de histologia.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Materiais de Consumo

Protectin DX com pureza  $\geq 95\%$  (10 (S), 17 (S) - dihidroxi-4Z, 7Z, 11E, 13Z, 15Z, 19Z-ácido docosahexaenóico) da Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, EUA). Hidroperóxido de tert-butil, TPTZ (2,4,6-Tris (2-piridil) -s-triazina), azul brilhante R, glutathiona reduzida (GSH), brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), N-etilmaleimida, o-dianisidina dicloridrato, fluoreto de fenilmetanossulfonil, ácido 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), nitroblue tetrazolium (NBT), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), trolox, DMSO (dimetilsulfóxido), bisacrilamida foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Ácido cítrico, hidróxido de sódio, ácido clorídrico e fosfato de potássio Merck (grau analítico, Darmstadt, Hessen, Alemanha). Isoflurano da Abbott (Chicago, IL, EUA). Xileno cianol e hidroximetilaminometano (Tris) foram obtidos da Amresco (Solon, OH, EUA). Acrilamida, dodecilsulfato de sódio (SDS), glicerol, copolímero de VP/acriloidimetiltaurato de amônio (Aristoflex®) (5%) e cera auto-emulsificante Polawax® obtidos da Pharmaspecial (São Paulo, SP, Brazil). Todos os outros reagentes usados eram de qualidade farmacêutica.

##### 3.1.2 Materiais Permanentes

Câmara de madeira projetada para irradiação; Lâmpada ultravioleta fluorescente PHILIPS TL/12 40W RS-UVB, MedicalHoland®; Radiômetro IL 1700 Research Radiometer. Detectores: SED240 – filtro UVB (290nm), SED005 – filtro UV (350nm); Deionizador de água, Purebal Option-Q, Elga®; Homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370); Balança analítica, HR-120, A&d®, precisão de 4 casas; Banho-maria, 314/2 DN, Nova Ética®; Agitador mecânico, Fisatom®; Banho-maria 100, Fanem; Centrífuga refrigerada, Rotina 46R, Hettich Zentrifugen®; pHmetro, Tec-3MP, TECNAL®; Estufa 0-120°C, De Leo & Cia®; Fonte elétrica para eletroforese MS 300V, Major Science®; Leitor de microplaca, Asys Expert Plus, Biochrom®; Leitor de microplaca, Enspire, Perkin Elmer®; Leitor de microplaca,

Multiskan GO, Thermo Scientific; Luminômetro Glomax® 20/20; Sistema de eletroforese Mini Vertical, Mini-Protean® Tetra System, Bio-RAD®.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Diluição da Protectina DX (PDX)

Solução de PDX foi preparada em etanol e armazenada em -80°C até o uso. No dia dos experimentos, alíquotas da solução de PDX foram dissolvidas em salina para que 200 µL (quantidade usada para aplicação intraperitoneal) contivesse 1 ng, 0,1 ng ou 0,01 ng. As doses de PDX para este estudo foram determinadas de acordo com estudo anterior no qual 1 ng/animal apresentou efeitos pró-resolução não evidenciados nas doses 10 e 100 ng/animal (TAN, CHEN, *et al.*, 2018). A partir da dose de 1 ng, foram pesquisados também os efeitos de concentrações menores (0,1 e 0,01 ng).

Após os ensaios realizados com PDX intraperitoneal, a dose resposta de 1 ng/animal/tratamento (2 ng de PDX ao total) foi escolhida para veiculação em emulsão por apresentar resultados satisfatórios com ação antioxidante e anti-inflamatória, não verificada em outras concentrações de PDX.

### 3.2.2 Preparo das Formulações Tópicas

Para o preparo das formulações tópicas foi escolhido o copolímero de acriloldimetiltaurato (Aristoflex® - dispersão à 5%) (20% m/m) pela sua característica de melhor espalhabilidade e menor risco de interação com o fármaco, e a base auto-emulsionante não-iônica, que neste estudo foi a cera auto-emulsionante Polawax® (álcool cetoestearílico + monoestearato de sorbitol polioxietileno 20 OE) cuja proporção estava em 2% (m/m). A escolha dessas bases foi em decorrência de outros estudos feitos pelo próprio grupo de pesquisa o qual padronizou este veículo.

A dispersão de Aristoflex® foi misturada ao Polawax® após aquecimento delas até a temperatura 70°C e, a seguir, a emulsão resultante foi agitada até resfriamento (40°C). Então, foi acrescentado o emoliente triglicérides de ácido

cáprico e caprílico (5%), o agente umectante propilenoglicol (6%) e uma solução conservante (Pheonip®) (0,4%) na formulação.

Após 24 horas do preparo, as formulações foram separadas e identificadas como formulação controle (sem PDX) e formulação contendo PDX. Uma alíquota da solução diluída de PDX foi adicionada à formulação (0,7ng/0,5g de formulação) que foi aplicada no dorso do animal. A formulação controle foi denominada TFC; a formulação contendo PDX foi denominada TFcPDX. Para o estudo tópico foram padronizados três tratamentos seguindo o protocolo experimental.

### 3.2.3 Animais Experimentais

Para os experimentos com administração tópica e intraperitoneal foram utilizados camundongos sem pelo da linhagem HRS/J, de ambos os sexos, adultos e com massa de 20 a 30 g. Apenas para os experimentos com administração intraperitoneal foram utilizados camundongos da linhagem LysM-eGFP C57BL, fêmeas, adultas e com massa de 25-30 g. Todas as linhagens de camundongos foram mantidos no Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina com temperatura controlada de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração. Os experimentos foram realizados conforme as normas da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (registrado no Ofício Circular CEUA nº148/2016, processo CEUA nº 11146.2016.97). Todos os esforços foram feitos para minimizar o uso de animais e seu sofrimento.

### 3.2.4 Sistema e Fonte de Radiação UVB

A fonte de luz utilizada nos experimentos para indução das lesões foto-oxidativas foi a lâmpada UVB fluorescente modelo PHILIPS TL/12 40W RS (Medical). A lâmpada emite radiação na faixa  $\lambda$  de 270 a 400 nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm. A medida da irradiância foi realizada utilizando-se um radiômetro (IL 1700) com detectores para radiação UV (SED 005) e, especialmente, para UVB (SED 240) (CARINI, ALDINI, *et al.*, 2000; CASAGRANDE, GEORGETTI, *et al.*,

2006a). A lâmpada foi instalada numa câmara de madeira desenvolvida especificamente para a indução do estresse oxidativo e inflamação. Os camundongos foram separados em caixas de plástico e cobertos com uma tela plástica para garantir a total exposição da região dorsal. Foi realizado um rodízio com as caixas contendo os animais devido às variações de radiação ao longo da lâmpada. Os animais foram colocados a 20 cm de distância da lâmpada UVB e expostos à radiação à temperatura ambiente com livre movimentação na caixa (CASAGRANDE, GEORGETTI, *et al.*, 2006a). Conforme a irradiância da lâmpada UVB, os animais ficaram expostos por 5 h e 30 min, resultando na dose de radiação de 4,14 J/cm<sup>2</sup>. Esta dose é capaz de induzir a inflamação e o estresse oxidativo conforme descrito em estudos anteriores (CAMPANINI, PINHO-RIBEIRO, *et al.*, 2013; IVAN, CAMPANINI, *et al.*, 2014).

### 3.2.5 Protocolo Experimental para Administração Intraperitoneal de PDX

Inicialmente os camundongos HRS/J (sem pelo) foram designados aleatoriamente para diferentes grupos com 6 camundongos cada:

- Grupo 1: controle não irradiado;
- Grupo 2: controle irradiado tratado com solução salina;
- Grupo 3: irradiado e tratado com 0,01 ng de PDX;
- Grupo 4: irradiado e tratado com 0,1 ng de PDX;
- Grupo 5: irradiado e tratado com 1 ng de PDX;

Os camundongos foram tratados por via intraperitoneal, com 200 µL para atingir as doses de 0,01; 0,1 e 1 ng/animal, 30 minutos antes e 30 minutos após a sessão de irradiação (Figura 8). Os animais foram eutanasiados após 12 horas da irradiação e as amostras de pele foram coletadas para os seguintes ensaios: edema, avaliação de FRAP, capacidade em reduzir o radical ABTS, níveis de GSH, atividade de metaloproteinase (MMP-9) e histologia.

A partir da definição da melhor dose para resposta ao uso de PDX intraperitoneal, seguiu-se para a segunda fase de experimentos. Nesta fase foram irradiados os grupos 1, 2 e 5, com a mesma quantidade de animais (6 animais por grupo), seguindo o mesmo protocolo de tratamentos com a eutanásia 2 horas após o final da irradiação. A pele coletada foi utilizada para os seguintes ensaios: produção

de ânion superóxido, atividade de catalase e produção de hidroperóxidos. A terceira fase foi realizada usando a melhor dose resposta de PDX intraperitoneal em camundongos LysM e-GFP seguindo o protocolo de tratamento e dose de irradiação com eutanásia destes animais após 12 horas da irradiação.

As amostras foram divididas para os diferentes testes e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para as análises. Apenas o teste de edema cutâneo foi realizado no mesmo dia em que a pele foi retirada. Os animais foram terminalmente anestesiados com 5% de isoflurano nos ensaios com eutanásia 12 h após a irradiação ou anestesiados seguido de decapitação nos ensaios com eutanásia 2 horas após o término da radiação UVB ( $4,14\text{J}/\text{cm}^2$ ). As peles foram lavadas com NaCl 145mM (CASAGRANDE, GEORGETTI, *et al.*, 2006a; IVAN, CAMPANINI, *et al.*, 2014).

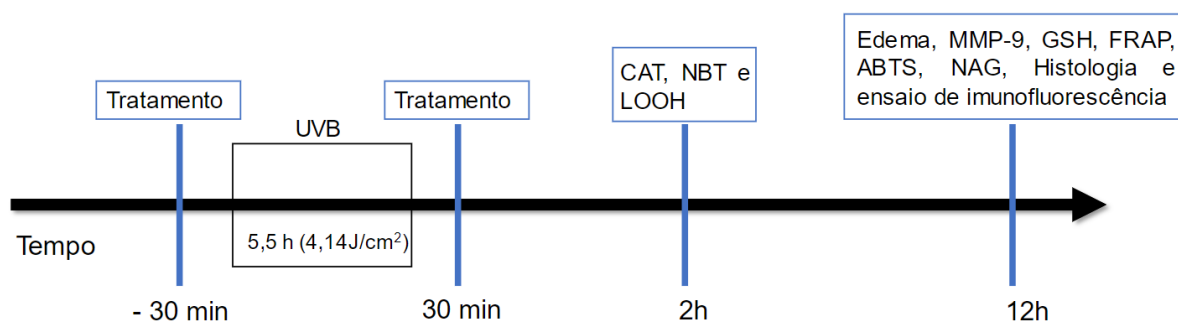


Figura 8. Fluxograma dos tempos de tratamento com os protocolos experimentais para avaliação do efeito antioxidante e anti-inflamatório de PDX administrada intraperitoneal. Os animais foram irradiados com radiação UVB durante 5 horas e 30 min ( $4,14\text{ J}/\text{cm}^2$ ). Trinta minutos antes e trinta minutos após a irradiação os animais foram tratados com  $200\text{ }\mu\text{L}$  de solução contendo PDX em diferentes doses, para os grupos 3, 4 e 5 ( $0,01$ ;  $0,1$  e  $1\text{ ng}/\text{animal}$ ). Os animais foram eutanasiados e amostras de pele foram coletadas 2 horas (para os testes de produção do ânion superóxido [NBT], atividade da catalase [CAT], produção de hidroperóxidos [LOOH]) e 12 horas (para os testes de edema, atividade de metaloproteinase-9 [MMP-9], níveis de glutathiona reduzida [GSH], avaliação do poder antioxidante redutor de ferro [FRAP], transferência de elétrons ao radical [ABTS], produção de N-acetil-glucosamina [NAG], histologia e ensaio de imunofluorescência), após o fim da radiação UVB.

### 3.2.6 Protocolo Experimental para Administração das Formulações Tópicas

A figura 6 resume o protocolo experimental utilizado para avaliação do efeito terapêutico da PDX administrada nos camundongos por via tópica. Para os ensaios, os animais foram distribuídos em quatro grupos com seis animais cada:

- Grupo 1: controle não irradiado;
- Grupo 2: controle irradiado;
- Grupo 3: controle irradiado tratado com formulação tópica sem PDX;
- Grupo 4: irradiado e tratado com formulação tópica contendo PDX.

A partir dos resultados de PDX intraperitoneal (2 ng PDX/animal), os camundongos foram tratados topicamente, na parte dorsal, com 0,5 g de formulação contendo 0,7 ng de PDX, 1 hora antes, 5 minutos antes e 6 horas após o início da sessão de irradiação UVB (Figura 9) (MELO, SAITO, *et al.*, 2021). Os animais foram terminalmente eutanasiados com 5% de isoflurano para os testes de 12 horas (edema, atividade de MMP-9, níveis de GSH, avaliação de FRAP e capacidade de reduzir o radical ABTS e histologia) ou anestesiados seguido de decapitação para os testes de 2 horas (produção do ânion superóxido, catalase e hidroperóxidos) após a finalização da exposição à radiação UVB. As peles foram lavadas com NaCl 145mM (KUMAGAI, MARTINEZ, *et al.*, 2021). O teste de edema cutâneo foi realizado logo após a coleta, as amostras de pele para o ensaio de histologia foram armazenadas em formol 10% e as amostras para os demais testes foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para as análises subsequentes.

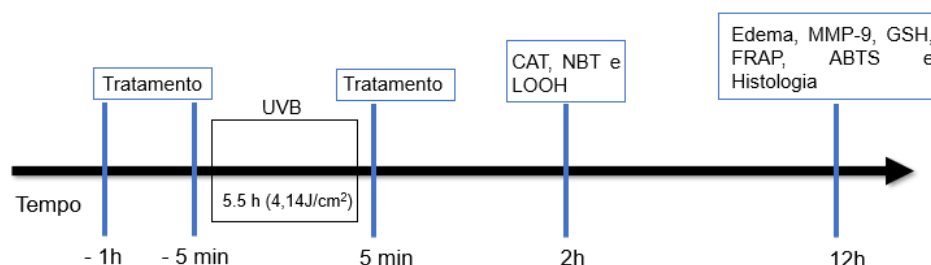


Figura 9. Fluxograma dos tempos de tratamento com os protocolos experimentais para avaliação do efeito da PDX administrada por via tópica. Os animais foram irradiados com radiação UVB durante 5 horas e 30 min ( $4,14 \text{ J/cm}^2$ ). Os animais foram tratados com formulação controle e formulação com PDX uma hora e 5 minutos antes do início da radiação

e cinco minutos após a finalização da irradiação (grupo 3 e 4). Os animais foram eutanasiados e amostras de pele foram coletadas 2 horas (para os testes de produção do ânion superóxido [NBT], atividade da catalase [CAT], produção de hidroperóxidos [LOOH]) e 12 horas (para os testes de edema, atividade de metaloproteinase-9 [MMP-9], níveis de glutatona reduzida [GSH], avaliação do poder antioxidante redutor de ferro [FRAP], transferência de elétrons ao radical [ABTS] e histologia), após o fim da radiação UVB.

### 3.2.7 Avaliação do Edema de Pele

O excesso de exposição à radiação UVB sobre a pele causa reação inflamatória levando entre outras consequências ao edema cutâneo (MARTINEZ *et al.*, 2015).

As amostras de pele do dorso de cada animal foram coletadas com auxílio de um molde com área fixa de 5mm de diâmetro e posteriormente foram pesadas e os resultados expressos em miligrama (mg) de pele (IVAN, CAMPANINI, *et al.*, 2014; MARTINEZ, PINHO-RIBEIRO, *et al.*, 2015). O efeito dos tratamentos no edema causado pela radiação UVB foi mensurado pelo aumento do peso de pele na região dorsal. A análise foi feita comparando-se o peso de pele entre os diferentes grupos.

### 3.2.8 Determinação da Atividade/Secreção de Proteinases Por Zimografia em Gel de Poliacrilamida Com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

A determinação da enzima metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) foi realizada através da atividade gelatinase no método de zimografia em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (FONSECA, MARQUELE-OLIVEIRA, *et al.*, 2011). As metaloproteinases são enzimas importantes em degradar as matrizes extracelulares, como o colágeno, e podem desenvolver o fotoenvelhecimento cutâneo (BAE, KARADENIZ, *et al.*, 2015; LIMA, MOTA, *et al.*, 2015).

Foi feito um *pool* das amostras de pele de cada grupo e armazenadas em microtubos. As amostras foram homogeneizadas com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370), na proporção 1:4 em tampão fosfato Tris/HCl 50 mM (pH 7,4) com cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) e 1% de inibidores de proteinases (fenantrolina, fluoreto de fenilmetilsulfonila e N-etilmaleimida).

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

Tabela 1. Constituintes do gel de separação e do gel de concentração

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

Após a finalização da solução do gel de separação e de concentração, os mesmos foram aplicados no equipamento do sistema de eletroforese Mini Verical (Bio-Rad®). O interior da cuba de eletroforese foi preenchido com tampão Tris/glicina 190 mM (pH 8,3) contendo 0,1% de SDS. Antes da aplicação das amostras, o gel foi submetido a uma pré-corrída de 10 mA por 15 minutos. Após, foram aplicados 25 µL de cada amostra. Durante a eletroforese a corrente aplicada foi de 10 mA para o gel de concentração e 13 mA para o gel de separação, sendo que a última corrente foi mantida constante por 15 minutos após a saída do corante do gel de separação.

Depois de finalizada a eletroforese, o gel foi lavado com solução de triton X-100 2% por 1 hora, sob constante agitação e incubado por 12 horas em tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7,4), contendo CaCl<sub>2</sub> 5mM e 0,02% de azida sódica a 37°C. Ao final da incubação, o gel foi corado com uma solução contendo 0,25% de azul brilhante, 10% de ácido acético e 50% de metanol em água deionizada. Zonas de

atividade enzimática foram detectadas como regiões de coloração negativa contra um fundo escuro. A atividade proteolítica foi analisada quantitativamente comparando os resultados das amostras dos animais tratados com os controles não tratados pelo programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) (ONOUÉ, KOBAYASHI, *et al.*, 2003; CASAGRANDE, GEORGETTI, *et al.*, 2006a).

### 3.2.9 Avaliação do Poder Antioxidante Redutor do Ferro na Pele

O poder redutor do ferro nos diferentes tecidos foi avaliado através do método de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) validado em estudo anterior (KATALINIC, 2005) e adaptado para avaliação do poder antioxidante de redução férrica em pele (MARTINEZ, PINHO-RIBEIRO, *et al.*, 2015)

Foram coletadas amostras de pele da região dorsal (aproximadamente 30 mg) e homogeneizadas em 500 µL de KCl a 1,15% com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370). Posteriormente, foram centrifugadas a 1.000 xg por 10 min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para a análise. Para a reação, foram adicionados 30 µL do sobrenadante e 150 µL de reagente FRAP. O branco foi preparado com 30 µL de KCl a 1,15% e 150 µL do reagente de FRAP. O reagente de FRAP foi preparado adicionando 2,5 mL de uma solução 10 mM de 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ) em HCl 40 mM com 2,5 mL de cloreto de ferro hexahidratado 20mM e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH 3,6), e esta solução foi incubada a 37°C por 30 min antes do uso. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 595 nm (EnSpire, Perkin Elmer). Foi realizada o preparo de uma curva padrão utilizando-se diferentes concentrações de Trolox (antioxidante análogo solúvel da vitamina E) de 0,5 a 20 µM. Os resultados foram expressos como nmol equivalente de Trolox/mg de pele (KATALINIC *et al.*, 2005).

### 3.2.10 Avaliação do Poder Antioxidante pelo Ensaio de Sequestro do Radical 2,2',Azinobis (3-Etilbenzotiazolina-6-Ácido Sulfônico) (ABTS)

O ensaio baseia-se na capacidade de o antioxidante sequestrar o cátion ABTS<sup>+</sup> causando uma redução da absorvância (ZUL, FARHAT, *et al.*, 2015).

Para a reação de ABTS, as amostras foram homogeneizadas em 400  $\mu\text{L}$  de KCl a 1,15% com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370) e centrifugadas a 1.000  $\times g$  por 10 min a 4°C, posteriormente o sobrenadante foi utilizado para análise.

A solução de ABTS foi preparada após reagir 7 mM da solução de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio resultando no cátion ABTS<sup>+</sup>. Esta solução ficou 16 horas armazenada em frasco âmbar e em geladeira a 8°C. Também foi preparado o tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ) pH 7,4. Após as 16 horas, a solução de ABTS foi misturada com tampão fosfato até atingir a absorvância de 0,8 em 730 nm. Foi adicionado 7  $\mu\text{L}$  do sobrenadante junto com 200  $\mu\text{L}$  da solução de ABTS diluída. O branco era composto apenas do tampão. Após 6 minutos de reação, foi realizada a leitura com comprimento de onda em 730 nm (EnSpire, Perkin Elmer). Uma curva padrão foi preparada com diferentes concentrações de Trolox (0,01 a 20nM) e os resultados foram expressos em nmol equivalente de Trolox/mg de pele (KATALINIC, 2005; MARTINEZ, PINHO-RIBEIRO, *et al.*, 2015).

### 3.2.11 Quantificação do Antioxidante Endógeno: Glutationa Reduzida (GSH)

A enzima glutatona é importante na homeostasia da pele por eliminar os radicais livres que foram produzidos durante a exposição à radiação UV. O ensaio baseia-se da reação da quebra da ligação do ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) pelo grupo sulfidríla da glutatona e, para tal, é detectada a quantidade do ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico (SRINIVASAN, SABITHA e SHYAMALADEVI, 2007)

As amostras de pele foram pesadas e posteriormente diluídas (1:4) em EDTA 0,02 M. Foi usado o homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370) para trituração da pele. Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) a 50%, com o intuito de precipitar as proteínas do meio reacional, na proporção de 1:0,2 de EDTA e TCA, respectivamente. A mistura foi centrifugada a 2700  $\times g$  por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recentrifugado a 2.700  $\times g$  por 10 minutos a 4°C, e então o sobrenadante final foi utilizado para análise.

Para o ensaio de quantificação dos níveis de GSH na pele foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do último sobrenadante em microplaca com o meio reacional contendo 100  $\mu\text{L}$

de tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e 5 µL de uma solução de 1,9mg/mL de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) em metanol. Após 5 minutos de incubação, a leitura da microplaca foi realizada no espectrofotômetro (EnSpire, Perkin Elmer) com comprimento de onda em 405 nm. Foi preparada uma curva analítica com 5 a 150 µM do padrão de GSH. Os resultados foram expressos em µM de GSH/mg de pele (SRINIVASAN, SABITHA e SHYAMALADEVI, 2007; MARTINEZ, PINHO-RIBEIRO, *et al.*, 2015)

### 3.2.12 Avaliação dos Níveis do Antioxidante Endógeno: Catalase (CAT)

A catalase é uma heme enzima responsável por reduzir o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. O nível dessa enzima se reduz quando há um estresse oxidativo, indicando um possível desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a ação antioxidante endógena (PALLAVI KRISHNA SHETTY, 2015).

O ensaio para a catalase foi realizado triturando-se as amostras em 500 µL de EDTA 0,02 M com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 2.700 xg durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recentrifugado a 2.700 xg durante 15 minutos a 4°C. Após isso, 10 µL do sobrenadante final reagiram com 160 µL de tampão Tris/HCl 1M com EDTA 5 mM pH 8,0, 20 µL de água deionizada. O branco foi usado para cada amostra, ou seja, 10 µL do sobrenadante foram misturadas com 160 µL de tampão Tris/HCl 1M com EDTA 5 mM pH 8,0, 20 µL de peróxido de hidrogênio. A velocidade com que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é reduzido pela ação da CAT foi avaliada por meio da diminuição no valor da absorbância pela diferença entre a leitura inicial e a leitura 30 segundos após a adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (EnSpire, Perkin Elmer) em 240 nm com temperatura mantida em 25°C. Os resultados foram expressos como unidade de catalase/mg de pele.

### 3.2.13 Avaliação da Produção de Ânion Superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

O ânion superóxido é um íon produzido endogenamente, durante o processo de respiração celular aeróbia. Em processos patológicos de injúria ao tecido, como a

exposição à radiação UVB, ocorre aumento da quantidade deste ânion e para manter a homeostasia do meio, ativa-se a enzima superóxido dismutase (SOD). Esta por sua vez converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio favorecendo a geração de outro radical induzindo a permanência do estresse oxidativo cutâneo (CHA, PIAO, *et al.*, 2014).

Para quantificação de ânion superóxido, foi utilizado o ensaio de NBT (*nitroblue tetrazolium*) (CAMPANINI, PINHO-RIBEIRO, *et al.*, 2013). As amostras coletadas foram trituradas, usando o homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370), em 500 µL de EDTA 0,02 M, centrifugadas a 2.000 xg por 20 segundos a 4°C.

Para a reação, 50 µL do sobrenadante foi incubado por 1 hora em microplaca. Em seguida, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e adicionado 100 µL de NBT na concentração de 1mg/mL (água deionizada) nas células fixadas. Após 15 minutos, o NBT foi cuidadosamente removido e ao precipitado foram adicionados 20 µL de metanol 100% para fixação. O composto formado pela redução do NBT (formazan) foi solubilizado com 120 µL de KOH 2 M e 140 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A redução do NBT para formazan foi medida em espectrofotômetro (EnSpire, Perkin Elmer) com comprimento de onda em 620 nm. Os resultados foram mostrados como densidade óptica (DO) por 10 mg de pele.

#### 3.2.14 Avaliação da Produção de Hidroperóxido (LOOH)

As amostras de pele coletada foram trituradas em 800 µL de tampão fosfato (PBS) pH 7,4 contendo NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370). Em seguida, centrifugadas a 700 xg a 4°C por 2 minutos. Foi usado 70 µL do sobrenadante para a reação com 420 µL de tampão de reação (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM e NaCl 0,9%, pH 7,4), 10 µL de terc-butil e 10 µL de luminol. Cada amostra foi analisada por 3.600 segundos no equipamento Glomax® 20/20 (Madison, Wisconsin, EUA), resultando na mesma quantidade de pontos de quimioluminescência. Os resultados foram expressos em unidades de luz relativa por mg de pele (MELO, SAITO, *et al.*, 2021).

### 3.2.15 Histologia

As amostras de pele foram coletadas após 12 horas da sessão de irradiação e foram fixadas em paraformaldeído a 4% e desidratadas em banhos de soluções de etanol com concentrações crescentes (70%, 95% e 100%) e diafanizadas com xilol para inclusão de parafina. O bloco de parafina contendo a amostra foi seccionado a 5  $\mu$ m e corados por diferentes corantes: com hematoxilina/eosina para análise de espessura da pele (objetiva 40x) e da presença de “sunburns cells” (objetiva 100x), tricômio Masson para análise de fibra de colágeno (objetiva 10x) e azul de toluidina para determinar a contagem de mastócitos (objetiva 40x). As análises foram feitas com o software Infinity Analyze (Lumenera®) (SAITO, MELO, *et al.*, 2018; CEZAR, MARTINEZ, *et al.*, 2019).

### 3.2.16 Atividade NAG

Uma enzima lisossomal expressa em macrófagos foi avaliada usando ensaio cinético-colorimétrico de N-acetil-glucosamina (NAG). A amostra de pele foi homogeneizada em tampão fosfato 0,05 M (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) usando Tissue-Tearor (Biospec 985370). Os homogeneizados foram centrifugados a 12.000 xg por 2 min a 4°C. Retirou-se 50  $\mu$ L de sobrenadante e misturou-se com 50  $\mu$ L de 4-Nitrofenil N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida mantendo incubado por 10 min a 37°C. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu$ L de tampão glicina 0,2 M (pH 10) e a absorbância foi determinada a 400 nm (EnSpire, Perkin Elmer®). A atividade NAG da amostra foi comparada com uma curva padrão de macrófagos. Os resultados são apresentados como atividade NAG (número de macrófagos por miligrama de pele) (BOURBOUZE, RAFFI, *et al.*, 1991; BELEBECHA, CASAGRANDE, *et al.*, 2020).

### 3.2.17 Ensaio de Imunofluorescência

Para o ensaio de imunofluorescência em pele foram usados camundongos LysM-eGFP por expressarem a proteína fluorescente verde (eGFP) controlada pelo promotor da lisozima M (LysM) presente em grânulos de neutrófilos. Os animais foram

raspados 48 horas antes da irradiação e foram tratados de acordo com o protocolo esquematizado na figura 5. Estudo anterior possibilitou a análise do recrutamento de leucócitos para a pele neste modelo de irradiação UVB (CEZAR, MARTINEZ, *et al.*, 2019). A imagem foi capturada usando microscópio confocal (Leica TCS SP8, Leica, Wetzlar, Alemanha) com uma objetiva de 20x. As imagens foram processadas usando o software Leica EL6000 (Leica, Wetzlar, Alemanha). A intensidade da fluorescência foi quantificada por um analista que não sabia quem eram os grupos tratados dos controles. Foram escolhidos um campo por amostra com indicativo de recrutamento de neutrófilos para o tecido da pele. Os resultados são expressos em intensidade de fluorescência eGFP (%) (CEZAR, MARTINEZ, *et al.*, 2019).

### 3.2.18 Análise Estatística dos Resultados

Todos os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) com um fator seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey e apresentados pela média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de mensurações feitas com 6 animais em cada grupo por experimento. As análises foram realizadas usando-se o software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram considerados significativamente diferentes para  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 PRO-RESOLVING PROTECTIN DX ADMINISTERED INTRAPERITONEAL IN HAIRLESS MICE ATTENUATE THE OXIDATIVE AND INFLAMMATORY EFFECTS INDUCED BY UVB IRRADIATION

### CLINICAL AND EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY AND PHYSIOLOGY

David L. Vale <sup>a</sup>, Camilla C. A. Rodrigues <sup>a</sup>, Priscila Saito <sup>a</sup>, Ingrid Caroline Pinto <sup>a</sup>, Telma Saraiva-Santos <sup>b</sup>, Waldiceu A. Verri Jr. <sup>b</sup>, Marcela M. Baracat<sup>a</sup>, Sandra R. Georgetti <sup>a</sup>, Rúbia Casagrande\*<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Avenida Robert Koch, 60, Hospital Universitário, 86039-440, Londrina, Paraná, Brazil.*

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

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

**Running Head:** Administration intraperitoneal protectin DX inhibit UVB irradiation-induced skin damage

## **Pro-resolving protectin DX administered intraperitoneal in hairless mice attenuate the oxidative and inflammatory effects induced by UVB irradiation**

### **ABSTRACT**

The attenuation of damage caused by reactive oxygen species (ROS) and the resolution of inflammation is a fundamental process for cellular homeostasis. During excessive exposure to UVB radiation, there is an unbalance in the skin, decreasing the endogenous antioxidant capacities, and, due to several reactions, there is an increase in ROS as a result of the established inflammatory process. In order to reduce the damage caused by ultraviolet radiation, new substances are evaluated as pro-resolution lipids, which are inflammatory mediators derived from omega-3. Protectin DX (PDX) is obtained from the double lipoxygenation of docosahexaenoic acid, found in neutrophils or inflammatory exudates, and its anti-inflammatory effect and antioxidant potential has already been documented. However, to date its effects against skin exposed to UVB radiation have not been reported. In the current study, we showed that PDX applied intraperitoneally (1 ng dose administered before and after irradiation) was able to decrease skin edema, metalloproteinase-9 activity, keratinocyte apoptosis, and epidermal thickening compared to the irradiated and untreated group. We also demonstrated that PDX maintained reduced glutathione levels, catalase activity, maintained the reducing power of iron, the ability to reduce the ABTS radical, and decreased the production of hydroperoxide and superoxide anions. In conclusion, our study suggests that PDX has a protective role against photooxidative and inflammatory damage and may be an effective therapy for skin diseases related to radiation exposure.

**Keywords:** Protectin DX, Oxidative stress, Inflammation, Ultraviolet B.

## 1. Introduction

The skin is constantly being physically attacked by exposure to ultraviolet radiation. This physical factor is subdivided into three bands according to wavelength: UVA (400-320 nm), UVB (320-280 nm), and UVC (less than 280 nm) (1). Specifically, UVB radiation is absorbed in the epidermal layer of the skin, mainly affecting keratinocytes. The energy from UVB radiation reacts with skin molecules as lipids, proteins, nucleic acids forming chromophores (2). A series of chemical reactions of chromophores produce reactive oxygen species (ROS), which are highly reactive, and endogenous antioxidant mechanisms are activated to counteract the installed oxidative stress (3,4).

However, these mechanisms are self-limited and an excess of ROS accumulates with enough energy to react with DNA and RNA, which can cause errors in cell division and trigger the carcinogenic process (5). UVB radiation also initiates the inflammatory process, causing clinical signs of edema, erythema, pain, and tissue change (6). This process occurs through the activation of inflammatory cytokines, recruitment of neutrophils, macrophages, mast cells, among other cells (7). Inflammation is also a generator of ROS, further increasing cutaneous oxidative stress.

In this context, new therapies that help in the inflammation resolution process and reduce the production of ROS are necessary to avoid the formation or worsening of sensitive skin diseases caused by ultraviolet radiation (lupus erythematosus, dermatomyositis, xeroderma pigmentosum, and others) (8,9). For a long time, the resolution of inflammation was considered a passive process, but recent studies show that it is an active process involved with the production of substances anti-inflammatory called pro-resolution lipid mediators (10).

Lipid mediators are involved in the regulation of the inflammatory process to prevent the exacerbated progression of pro-inflammatory mediators, allowing the cell to return to its state

of homeostasis after aggression (11). The components of lipid mediators include several substances as examples: lipoxins, resolvins, maresins, and protectins (10,12). Lipoxins are derived from omega-6 fatty acid and the rest are derived from omega-3 fatty acid (10).

One of the latest lipid mediators to be discovered is protectin DX (PDX), an isomer of protectin D1, produced by double lipoxygenation through docosahexaenoic acid (DHA) (13). PDX is an active metabolite that acts by inhibiting: the production of ROS (14), insulin resistance in skeletal muscles of obese mice (15), pulmonary edema in a sepsis model (16), and the replication of the influenza virus (17). The anti-inflammatory and antioxidant results of PDX have been demonstrated *in vitro* and in some *in vivo* models. Although, there are no studies on its effect on the UVB radiation-induced inflammation and oxidative stress model. Here, we investigated *in vivo* effect of PDX related to the maintenance of endogenous antioxidants and the decrease in inflammation in the skin after UVB radiation exposure.

## 2. Materials and Methods

### *Materials*

Protectin DX (10(S),17(S)- dihydroxy-4Z,7Z,11E,13Z,15Z,19Z-docosahexaenoic acid (from Cayman Chemical Ann Arbor, Michigan, USA). Tert-butyl hydroperoxide, Acrós Organics (Geel, Antwerp, Belgium). TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine), Brilliant blue R, reduced glutathione (GSH), hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), N-ethylmaleimide, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG), phenylmethanesulfonyl fluoride, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), nitroblue tetrazolium (NBT), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), trolox, DMSO (dimethylsulfoxide), bisacrylamide were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Isoflurane from Abbott (Chicago, IL, USA). Xylene cyanol and hydroxymethyl aminomethane (Tris) were obtained from Amresco (Solon, OH, USA). Acrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS), glycerol from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Optimum cutting temperature reagent (Tissue-Tek, O.C.T. Compound, Sakura Finetek, Torrence, CA, USA). All other reagents used were from pharmaceutical grade.

### *Effect of protectin DX against photooxidative and inflammatory skin damage induced by UVB irradiation in vivo*

*Animals.* The experiments were performed in hairless mice (HRS/J) weighing 25-30 g, female and obtained from the Londrina State University (UEL), Paraná, Brazil and LysM-eGFP<sup>+</sup> background C57BL/6 mice weighing 20-25 g, obtained from Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, SP, Brazil. Mice had free access to water and food at a temperature of 23°C ± 2 and a 12 h light and 12 h dark cycles. The Animal Ethics Committee (Of. Circ. CEUA

n° 148/2016, process CEUA n° 11146.2016.97) of the Londrina State University approved all procedures. All efforts were made to minimize animal use and their suffering.

*Experimental protocol.* First, HRS/J mice (a hairless strain) were randomly designed to different groups with 6 mice each: sham, irradiated control group treated with saline, irradiated group treated with 0.01 ng of PDX (PDX-0.01ng), irradiated group treated with 0.1 ng of PDX (PDX-0.1ng) irradiated group treated with 1 ng of PDX (PDX-1ng). Mice were treated intraperitoneally (i.p.) at 30 minutes before and 6 h after the beginning of UVB irradiation session (Figure 1) (18). Mice were anesthetized with 3% isoflurane after 2 h or 12 h after irradiation, depending on the assay. Dorsal skin samples were collect followed by storage at -80°C before analysis. The exceptions were skin edema where samples were weighed immediately after collection and samples for histology which were stored in 10% formalin. In a previous study, the 100 ng and 10 ng/animal dose failed to provide lung protective effects, however the 1 ng/animal dose was effective in this animal model and also show anti-inflammatory pro-resolution functions (19). To test whether PDX would present this same effect, we use the concentration of 1 ng and lower (0.01 and 0.1 ng/animal/treatment) to allow an observation of the best dose-response in a skin irradiation model. After the first step, we use the PDX-1 ng for experiments involving LysM-eGFP mice, catalase activity, anion superoxide and hydroperoxide production.

*Irradiation.* The UVB source to induce pathological changes in the skin was a Philips TL/12 RS 40W (Medical-Holand) lamp emitting a continuous spectrum at 313 nm. In the apparatus, the lamp was mounted 20 cm above the place where the mice were placed on, resulting in an irradiation of 0.209 mW/cm<sup>2</sup> as measured by an IL 1700 radiometer (Newburyport, MA, USA) equipped with sensor of UV (SED005) and UVB (SED240). The irradiation dose was 4.14

J/cm<sup>2</sup> (20,21). Experiments using this UVB irradiation model have been validated in previous studies using the same irradiation dosage as described above (18,20,22).

*Histology.* Histologic processing was performed with fixation in formaldehyde and embedding in paraffin. Histological sections were made and stained with hematoxylin and eosin for counting sunburn cells present in the epidermis (x100 magnification) (23) and to determine epidermal thickness (40x)(18). Masson's trichrome to evidence collagen fibers (x10 magnification) and toluidine for mast cell quantification (x40 magnification) (24). Experiments were performed two times and in every group in each time the experiment was performed the number of mice was 6 summing up 12 mice per group. All histological sections were analyzed using light microscopy and software Infinity Analyze (Lumenera® Software). The digital images were processed using of the Image J program.

*Skin Edema.* Dorsal skin biopsy was carefully removed from euthanized mice and weighed using a precision scale (25). All samples presented a constant diameter of 5 mm. Results are expressed in mg of skin tissue obtained from the weight of each sample.

*NAG activity.* A lysosomal enzyme expressed in macrophage was evaluated using N-acetyl glucosamine (NAG) kinetic-colorimetric assay. Skin sample was homogenized in 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) using Tissue-Tearor (Biospec 985370). The homogenates were centrifuged at 12000 xg for 2 min at 4°C. Withdrew 50 µL of supernatant and was mixed with 50 µL of 4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide and incubated for 10 min at 37°C. Then, 50 µL of 0.2 M glycine buffer (pH 10) was added and the absorbance was determined at 400 nm (EnSpire, Perkin Elmer®). The NAG activity of the sample was compared to a standard curve of macrophages. The results are presented as NAG activity (number of macrophage per milligram of skin) (26,27).

*Assay to determine the concentration of reduced glutathione (GSH).* Skin sample was homogenized in 0.02 M EDTA using Tissue-Tearor (Biospec 985370) at a ratio 1:4 w/w dilution. Whole homogenates underwent 50% trichloroacetic acid treatment and centrifugation twice under refrigeration at 4°C during 10 min at 2700 xg. The reaction mixture contained 50 µL of sample, 100 µL of 0.4 M Tris and 5 µL DTNB (1.9 mg/mL in methanol). The reaction mixture was allowed 5 min interval to react and then, reading of absorbance at 405 nm was done (EnSpire, Perkin Elmer®). The standard curve was prepared with GSH 5-150 µM. The results are presented as µM of GSH per mg of skin (28,29).

*Assay to quantitate sample ability to reduce iron (ARI) and ABTS assay.* 500 µL KCl (1.15%) solution was used to suspend the samples to allow tissue homogenization using Tissue-Tearor (Biospec 985370). This homogenate was centrifuged during 10min under refrigeration (4°C) at 1000 xg allowing the separation of the supernatant. The reaction consisted in adding the supernatant (30 µL) to the ARI reagent prepared with 0.3 mM acetate buffer pH 3.6, 10 mM TPTZ in 40 mM hydrochloride acid and 20 mM ferric chloride hexahydrate. The ARI reagent was warmed up to 37°C for 30 min and absorbance was determined at 595 nm (EnSpire, Perkin Elmer). For the ABTS assay, a stock solution of ABTS (7mM in water) was mixed with 2.45 mM potassium persulfate (final concentration) to obtain ABTS+. Prior to the use, ABTS+ working solution was further diluted in phosphate buffer pH 7.4 to reach an absorbance of 0.8 ( $\pm 0.02$ ) at 730 nm. Briefly, the supernatant (7 µL) was added to 200 µL of the diluted ABTS+ solution; samples were vortex-mixed and allowed to stand for 6 min. The absorbance was determined at 730 nm (EnSpire, Perkin Elmer). A curve of Trolox (0.01 – 20 nmol) allowed calculation of sample results as equivalent nmol of Trolox/mg skin (30).

*Analyses of skin proteinase substrate-embedded enzymography.* The dorsal skin of hairless mice (1:4, w/w dilution) was homogenized using Tissue-Tearor (Biospec 985370) in 0.05 M

Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.01 M CaCl<sub>2</sub> and 1% protease inhibitor cocktail. The homogenates were centrifuged twice at 1200 xg for 10min at 4°C. Aliquots of 50 µL of samples were mixed with 10 µL of 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) containing 20% glycerol, 4% SDS and 0.005% xylene cyanol. Then, 25 µL of the mixture was used for electrophoresis in a gel containing 10% acrylamide and 0.025% gelatin. After electrophoresis, the gels were incubated for 1 h with 2.5% Triton X-100, incubated overnight in Tris-HCl/CaCl<sub>2</sub> buffer (pH 7.4) and 0.02% sodium azide at 37°C, and stained the following day with brilliant blue R. The gel was destaining in 20% acetic acid and zone of enzyme activity was analyzed by comparing the groups in the Image J software package (NIH, Bethesda, MD, USA) (21).

*Catalase (CATA) assay.* Skin sample was homogenized in 500 µL of 0.02 M EDTA using Tissue-Tearor (Biospec 985370) and centrifuged twice during 10 min at 4°C at 2700 xg. The reaction mixture contained 10 µL sample, 160 µL buffer Tris-HCl 1 M with EDTA 5 mM pH 8.0, 20 µL of deionized water and 20 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM. Catalase activity was calculated by the difference between the reading at 240 nm (EnSpire, Perkin Elmer) before and 30 seconds after the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The CATA values were expressed as unit of CATA/mg of skin (3).

*Superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) quantitation assay.* Skin samples were homogenized in 0.02 M EDTA and centrifuged at 2.000 xg, for 20 seconds at 4°C. For the reaction, 50 µL of the supernatant was incubated for 1 h. The non-precipitated/non-adherent supernatant was removed, followed by adding 100 µL of NBT (1 mg/mL) and incubating for 15 min. The NBT reagent was then carefully removed and followed by the addition of 20 µL methanol 100%. Formazan particles were dissolved by adding 120 µL of KOH 2 M and 140 µL of dimethylsulphoxide. Reading at 620 nm was used to detect the reduction of NBT to formazan (EnSpire, Perkin Elmer) with data shown as optical density (OD) per 10 mg of skin (31).

*Lipid hydroperoxides (LOOH) assay.* These assay was performed based on the measure of the QL initiated by the tert-butyl hydroperoxide (32). Skin samples were homogenized in 800  $\mu$ L of Phosphate Buffered Saline (PBS) containing NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM pH 7.4 and centrifuged at 2.000 xg, for 2 minutes. The supernatant (70  $\mu$ L) was mixture with 420  $\mu$ L reaction buffer (20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> with 0.9% NaCl pH 7.4), added 10  $\mu$ L tert-butyl and 10  $\mu$ L luminol. Each sample was analyzed for 3600 seconds resulting the same quantity of points of chemiluminescence. Analysis of the reaction buffer without the sample was performed to check if there was interference in the chemiluminescence reading using the Glomax 20/20 (Madison, Wisconsin, USA). Results were expressed in relative light unit per mg of skin.

*Immunofluorescence assay.* LysM-eGFP mice were shaved 48 hours before irradiation and treated according to the protocol outlined in figure 1. Skin samples were prepared following the method described previously (18). The samples were fixed in 4% PFA for 24h, transferred to a 30% sucrose solution for 24 h and to 30% sucrose solution with O.C.T. (1:1), before being included in O.C.T. The tissue was sectioned (10  $\mu$ m) and the sections were processed for immunofluorescence. The image was captured using a confocal microscope (Leica TCS SP8, Leica, Wetzlar, Germany) with a 5x objective. Images were processed using Leica EL6000 software (Leica, Wetzlar, Germany). One field per sample with indication of neutrophil recruitment to the skin tissue was chosen. The results are expressed in eGFP fluorescence intensity.

*Statistical analysis.* GraphPad Prism® software package version 4.00 was applied to analyze data by One-way ANOVA and the comparison test of Tukey considering  $p < 0.05$ . Data are means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Results were presented of 6 mice per group per experiment and are representative of two separated experiments.

### 3. Results

#### *PDX reduced edema, MMP-9 activity and collagen fiber degradation triggered upon UVB stimulation*

To evaluate the effects of PDX against UVB irradiation, we examined the production of skin edema. The irradiated control group increased the weight of skin compared with sham (Figure 2A). However, the group of PDX 1 ng significantly reduced the edema induced by UVB irradiation. There was no significant difference between sham and PDX-1 ng group. In addition, the MMP-9 activity (Figure 2B) was evidenced by accentuated degradation of the polyacrylamide gel in the bands corresponding to the groups irradiated and treated with PDX 0.01 ng and 0.1 ng/mouse. The MMP-9 activity/secretion was lower in the PDX 1 ng/mouse group. Figure 3B highlights the collagen fibers degradation triggered upon UVB irradiation corroborating the MMP-9 activity data. PDX 1ng/mouse group inhibited the collagen fiber degradation (Figure 3E), this activity was not observed in any other irradiated groups (Figure 3B, C and D).

#### *PDX reduces the recruitment of macrophage, number of mast cells and recruitment of LysM-eGFP+ cells triggered by UVB irradiation*

To assess the inflammatory process and the action of PDX against photooxidative damage, we analyzed the recruitment of macrophages through the secretion of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) and presence of mast cells. Figure 4A shows that NAG activity increased in the irradiated control groups, 0.01 and 0.1 ng/mouse. In addition, mast cell recruitment (Figure 5) also increased in the irradiated control groups, 0.01 and 0.1 ng/mouse.

However, at the concentration of 1 ng/mouse there was a significant reduction in NAG activity and number of mast cells.

Based on the results of the best dose-response in other assays, we also investigated the recruitment of immune cells by immunofluorescence assay using tagged mice (LysM-eGFP<sup>+</sup>). The results showed that PDX 1 ng/mouse per treatment decreased such recruitment reducing the deleterious inflammatory effects caused by UVB irradiation (Figure 4B - E).

#### ***PDX prevents keratinocyte apoptosis process and inhibits epidermal thickening in skin after UVB stimulation***

UVB-irradiation induces sunburn cells (apoptotic keratinocytes) compared to sham. Only PDX 1 ng/mouse group was able to prevent the induction of sunburn cells (Figure 6E). Moreover, UVB-irradiation was able to increase the cells of the epidermal layer leading to an increase in skin thickness (Figure 7B). As shown in graphics 6F and 7F, only PDX 1ng/mouse group prevented such cellular changes after radiation exposure.

#### ***PDX maintains antioxidant levels even after UVB irradiation***

Next, we examined the effect of PDX in maintaining antioxidant levels analyzing 4 parameters: ability to reduce iron (ARI; Figure 8A), ability to sequester the ABTS<sup>+</sup> (Figure 8B), maintain reduced glutathione levels (GSH; Figure 8C) and catalase enzyme activity (Figure 8D). Of the PDX lower concentrations (0.01 and 0.1 ng/animal) could not prevent the depletion of antioxidant levels after UVB stimulation. Only the 1 ng/animal PDX dose maintained these levels similar to sham. As expected, antioxidant levels in the irradiated control group were

lower than in the sham, whereas PDX 1 ng/mouse group guaranteed the levels of ARI, ability to sequester ABTS, GSH, catalase and NAG activity not verified in other groups (Table 1).

To complete the study of antioxidant activity, we evaluated the production of hydroperoxide (LOOH; Figure 9A) and superoxide anion ( $O_2^-$ ; Figure 9B). Although, the operational cost reasons and to reduce the use of many animals, we used only 3 groups for these assays (sham, irradiated control and PDX 1 ng/mouse), following the protocol described in Figure 1. In both assays, UVB irradiation increased the production of LOOH and  $O_2^-$  in the irradiated control group, as verified in previous studies (3,21). However, the group treated with 1 ng/animal was able to reduce the production those radicals (Figure 9 and table 1).

#### 4. Discussion

Recently, a series of studies have suggested that maresin(18) and resolvin(33) which are endogenously generated from  $\omega$ -3 fatty acid and other pro-resolution mediator denominated lipoxin(24) derivate by  $\omega$ -6, are capable of reducing inflammation and oxidative stress in UVB-irradiation model. Until now, particularly, protectin has not been evaluated in this type of UVB-irradiation model. The protectin D1 (PD1) stereoisomer has a potent anti-inflammatory action and has several studies on its antioxidant potential(34,35). However, as an isomer of PD1, little is known about the action of PDX. PDX, 10(S),17(S)-dihydroxy-docosa-hexa-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-enoic acid, is produced by the double lipoxygenase-mediated reaction in murine peritonitis exudates, human leukocyte suspension, or from the 15-lipoxygenation of DHA by the soybean enzyme(36).

In this study, we standardized treatment time and concentration with pro-resolution. We did not verify antioxidant and anti-inflammatory results at concentrations of 3, 10, and 100 ng of PDX (unpublished data) and at different treatment times using this experimental protocol. Our data demonstrated that treatment of PDX 1 ng/mouse, administered before and after UVB-irradiation, ameliorates photooxidative and photo-inflammatory damages. Although PDX 0.01 and 0.1 ng/mouse treatment were not able to reduce those damages. Therefore, PDX 1 ng/mouse was used for the following experiments. Acutely, UVB-irradiation causes cellular, and molecular alterations. The first signs of this type of injury are skin edema due to vasodilation and fluid leakage into the third space. Mono and polymorphonuclear cells (neutrophils, macrophages, and mast cells) are recruited into the injured tissue and release enzymes and cytokines which worsen the oxidative state and recruit more immune system cells. Findings from other studies support our interpretation of the PDX data. Consistent with the study that

shows PDX suppresses neutrophils influx in the postoperative ileus model(37) and prevents neutrophil infiltration in a mouse model of peritonitis after administration 1 ng of PDX(38).

As described in a previous study, LysM-EGFP mice have a green fluorescent protein (EGFP) located in the promoter region of the enzyme lysozyme M, which is mainly expressed in neutrophils(39). The assay with these labeled mice is more specific and provides a way to quantify neutrophil emigration in a non-invasive and longitudinal manner in the injured skin. Here, our study showed that PDX is dose-dependent and protects the skin by inhibiting neutrophil recruitment.

The neutrophils can release the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) enzyme, which activates vascular endothelial cells through the extracellular pathway that regulates p38-MAPK phosphorylation, causing cutaneous vasodilation and hyperpermeability, as verified in a previous study(40). Furthermore, MMP-9 degrades collagen fibers causing skin photoaging. Our study showed that PDX is dose-dependent and protects the skin by decreasing MMP-9 secretion/activity as shown in the zymographic and histological assay with Masson's trichrome staining, keeping the number of collagen fibers similar to the non-irradiated group. These results corroborate with decreasing neutrophil recruitment (shown in the LysM-eGFP+ assay).

Mast cells are also activated after acute exposure to UVB radiation. These cells release histamine which is implicated in skin erythema, stimulating the production of prostaglandins(41). Histamine affects keratinocytes and directly influences the migration of immune cells to the UVB-irradiated site and regulates the proliferation of lymphocytes and cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-10)(42). Therefore, preventing the presence of mast cells and degranulation is a way to prevent skin inflammatory injury. In this work, we show that PDX inhibited such recruitment.

On the other hand, macrophages are also involved in pro and anti-inflammatory development. Phagocytosis by macrophages is suppressed when stimulated by UVB radiation(43) decreasing the clearance of cell debris. Macrophages release IL-6, TNF- $\alpha$ , and MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) implicated in the M1 macrophage phenotype, but phenotypically M2 macrophages release anti-inflammatory cytokines (IL-10) and produce pro-resolution lipids allowing the resolution of the inflammatory process(44). In this study, we only showed that the levels of NAG, in the group treated with PDX 1 ng/mouse, decreased tissue macrophage accumulation/activation. Possibly this result refers to M1 macrophages due to other results of anti-inflammatory assays. However, PDX activates GPR37 triggering macrophage phagocytosis via calcium signaling decreasing inflammatory pain and cytokine(45). In another study, PDX treatment increased the phagocytic activity of peritoneal macrophages *in vivo* model, indicated by the increase in the number of fluorescent beads engulfed per cell and the number of macrophages containing fluorescent beads(46).

As a result of UVB-irradiation, the nucleus of keratinocyte cells absorb energy, forming chromophores causing mutations in the molecular structure of DNA(47). To avoid the replication of this mutated molecule, other components are activated initializing the cell repair process, such as the p53 protein, which inhibits the mitotic cycle in the G1 phase and activates the transcription of DNA repair genes(48). When the DNA damage is beyond repair, the apoptosis process occurs activating proteins that are members of the Bcl family, caspases, among others(49). Keratinocytes undergoing apoptosis have a specific morphology, with a more abundant condensed nucleus in the basal layer and lower third, denominated sunburn cells(6,50). In response to UVB irradiation, there is increased proliferation and hyperplasia of epidermal cells to protect the deeper layers, a mechanism regulated by the activation of STAT3 with a consequent increase in transcriptional factors involved in inflammatory genes(51). In our model of UVB-irradiation, PDX dose-response plays a significant role in decreasing numbers

of sunburns cells and epidermal thickness not verified at lower PDX doses and in the irradiated control group. This result is possibly related to the action of PDX in acting on the STAT3 pathway as shown in a previous study on insulin resistance(15).

ROS are formed by the partial reduction of molecular oxygen, hydrogen peroxide, or through lipid peroxides (LOOH). Specifically, LOOH exerts its effect by two mechanisms: first, it refers to the alteration of the architecture and structure of lipid membranes, activating phospholipase A2 and COX-2, and second, through the propagation of new ROS, which can react with DNA and proteins(32). A strategy to prevent the formation of LOOH is reducing peroxide into a less reactive compound, exerted by the class of enzymes glutathione peroxidase (GPx) present in cells(52). Another strategy is to use exogenous substances with antioxidant effects preventing the formation of hydroperoxides and their reactive intermediates(3,4). In our work, we showed that the production of hydroperoxides was lower with the use of PDX 1 ng/mouse but unidentified in other irradiated groups.

It is common knowledge that the generation of ROS by UVB irradiation is consumed by endogenous antioxidant substances (GSH, catalase, and superoxide dismutase), but the excess of ROS is not fully cleared, setting up skin oxidative stress (3). Oxidative stress interferes with cell homeostasis by interacting with DNA, RNA, and other molecular structures. Remarkably, in this study, we showed that the PDX 1 ng/mouse maintained catalase and GSH levels similar to sham. These results were consistent with a previous study in which PDX increased the level of AMPK phosphorylation activating the expression and activity of catalase and superoxide dismutase(53). In addition, PDX decreases ROS production, inhibits NADPH oxidase activation, and inhibits cyclooxygenase-1 and 2 evaluated in human neutrophils (14). Resolvin D1, another pro-resolution lipid derived from docosahexaenoic acid, also showed antioxidant effects and did not consume skin GSH levels after irradiation (33). So far, there is no description

in the literature about GSH and protectin or its stereoisomers. This is the first work that has shown the beneficial effect of PDX in maintaining glutathione levels after UVB-irradiation damage to the skin.

To complement the study of the skin's antioxidant power, we analyzed the ability to reduce iron ion and the ability to reduce ABTS radical. These assays have already been tested in other studies involving pro-resolution lipids and the results showed anti-inflammatory and antioxidant effects (18,24,33). PDX was able to maintain the antioxidant power close to the non-irradiated control. The results of the ABTS assay were similar to the results of GSH levels, showing a correlation between them.

Thereby, PDX was shown to be effective in a model of UVB-irradiation *in vivo*, at a dosage of 1 ng/mouse per treatment before and after exposure to irradiation. The deleterious effects of inflammation and oxidative stress were dose-dependently attenuated by PDX. More studies are needed to understand the mechanism of action of PDX concerning the types of cytokines released and whether there is an activation of transcription factors involved in the production of antioxidant substances. This study shows that PDX is a promising substance for the prevention of skin diseases exacerbated by exposure to UVB radiation.

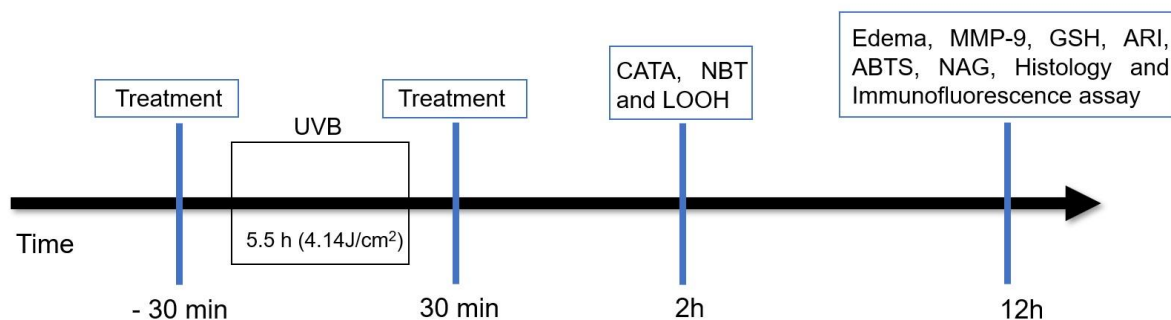
### **Acknowledgements**

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

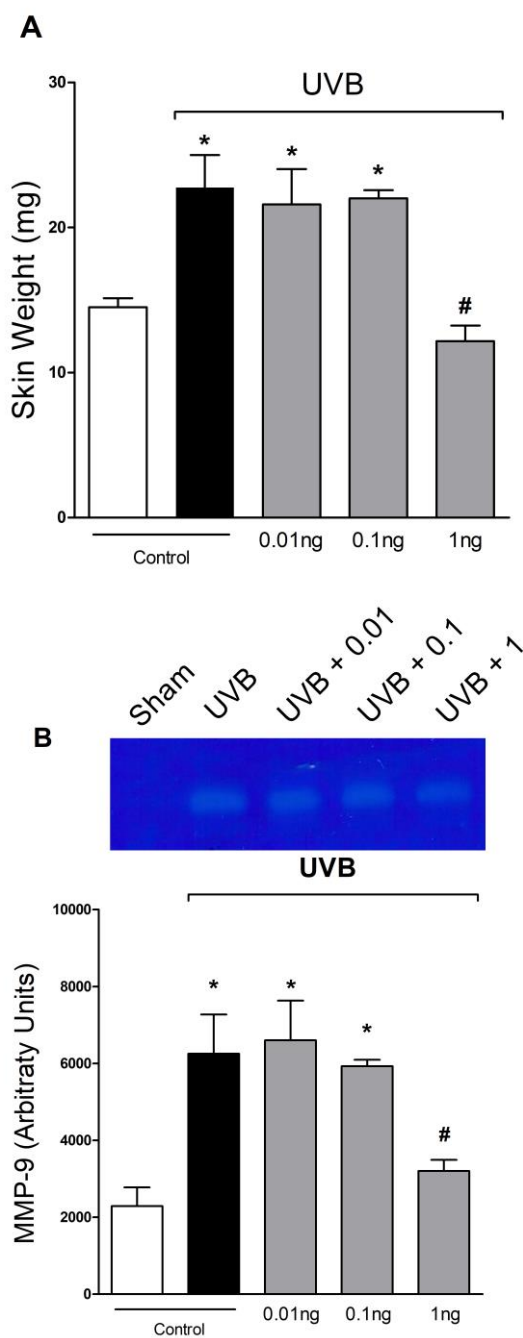
### **Additional Information**

The authors declare that they have no competing interests.

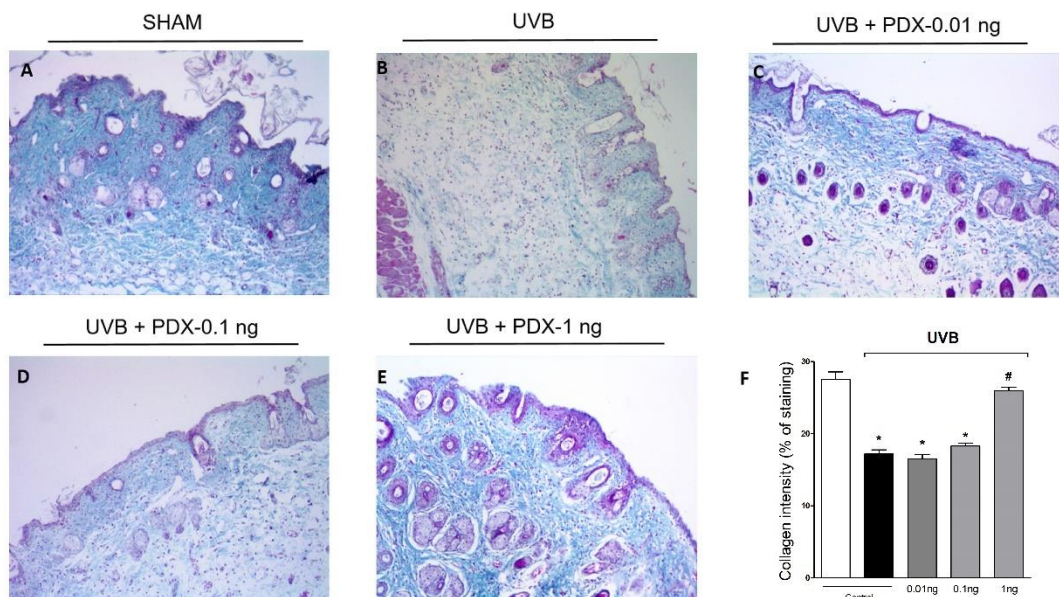
## Figures



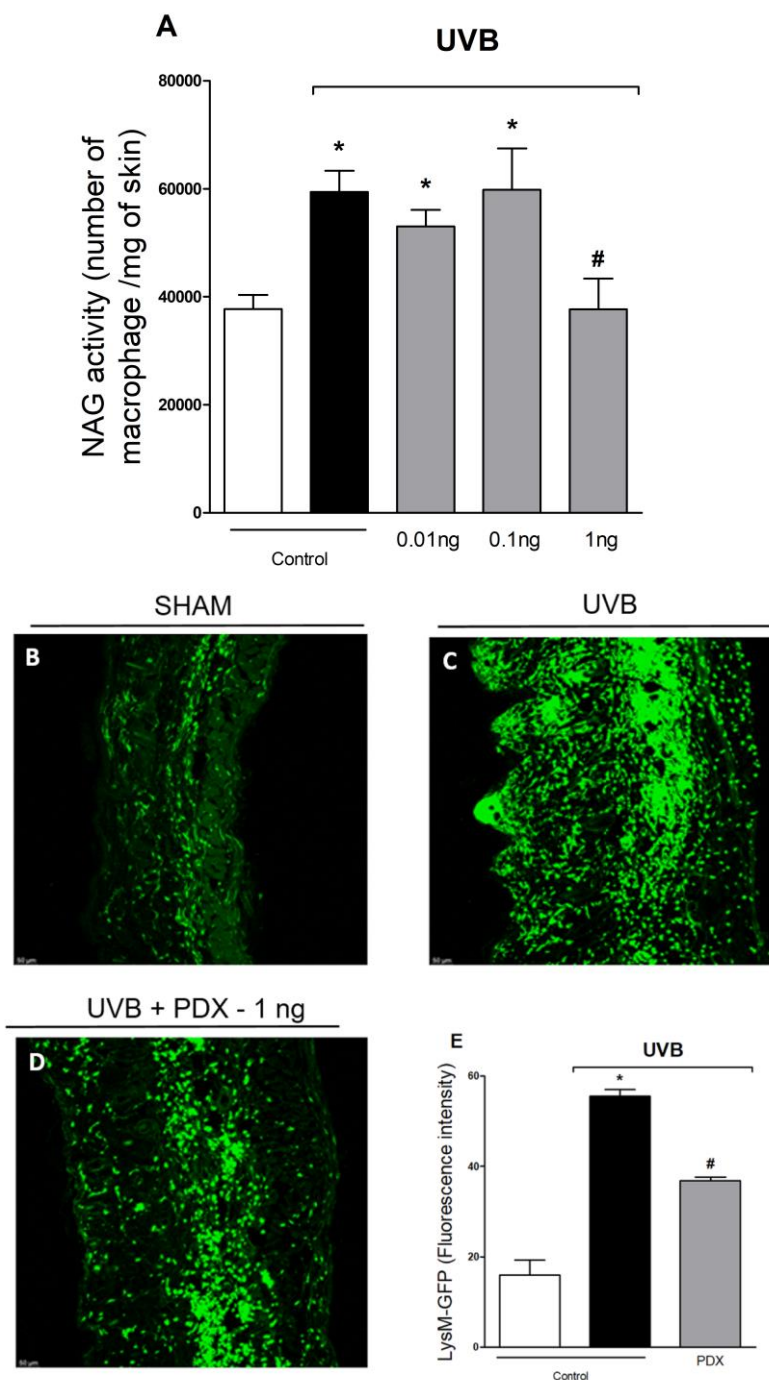
**Figure 1.** Schematic protocol of treatment times for evaluating the antioxidant and anti-inflammatory effect of PDX administered intraperitoneally. The animals were irradiated with UVB radiation for 5 hours and 30 min ( $4.14 \text{ J/cm}^2$ ). Thirty minutes before and thirty minutes after irradiation, the animals were treated with  $200 \mu\text{L}$  of solution containing PDX at different concentrations for each group (0.01, 0.1 and  $1 \text{ ng/mouse}$ ). The mice were euthanized, and skin samples were collected 2 hours (for the superoxide anion production tests [NBT], catalase activity [CATA], hydroperoxide production [LOOH]) and 12 hours (for the edema tests, activity of metalloproteinase-9 [MMP-9], N-acetyl glucosamine activity [NAG], reduced glutathione levels [GSH], evaluation of ability to reduce iron [ARI], activity of scavenging ABTS radical assays, histology, and immunofluorescence assay), after the end of radiation UVB.



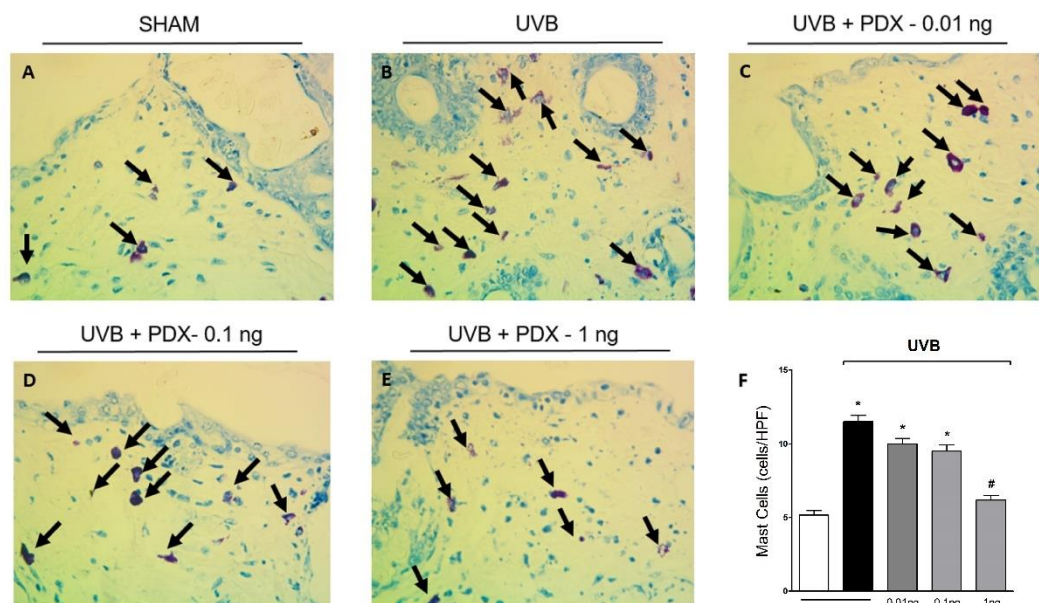
**Figure 2.** PDX dose-dependently prevents increase of edema and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity after UVB radiation-induced. The skin edema (A) and MMP-9 activity (B) were determined in samples collected 12 hours after end of UVB-exposure. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 6 mice per group and are representative of two separate assays. \*  $p < 0.05$  compared to sham and #  $p < 0.05$  compared to irradiated control group, treatment with PDX 0.01 and 0.1ng/mouse groups.



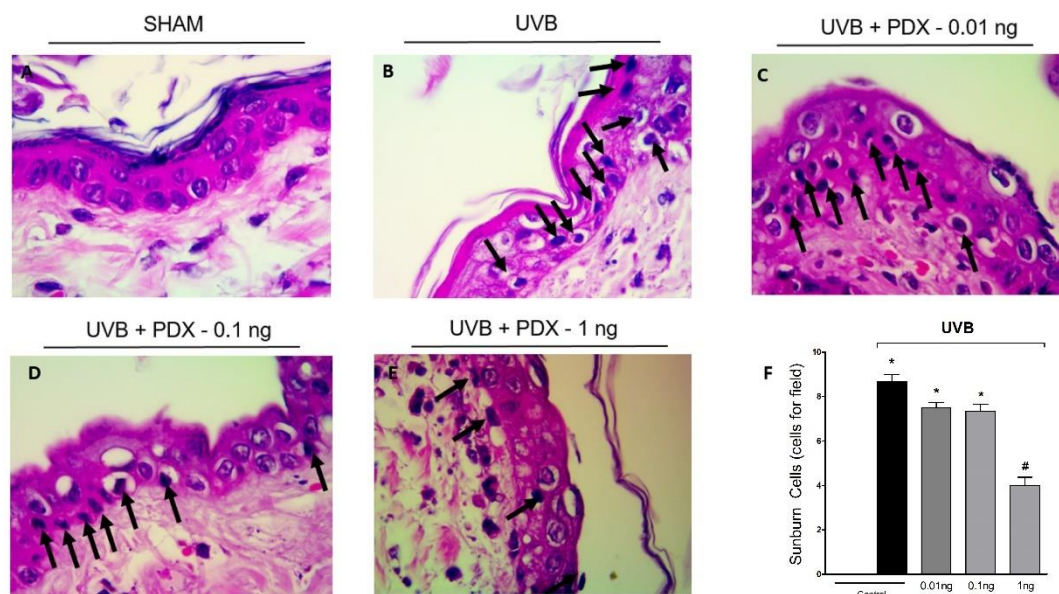
**Figure 3.** PDX dose-dependently inhibits UVB radiation-induced collagen fiber damage. Collagen fiber was evaluated by Masson's trichrome staining in skin samples collect 12 hours after end of UVB-exposure. Collagen fiber intensity and bundles shown in blue were examined by the ImageJ® program. \*  $p < 0.05$  compared to sham and #  $p < 0.05$  compared to irradiated control group, treatment with PDX 0.01 and 0.1/mouse groups.



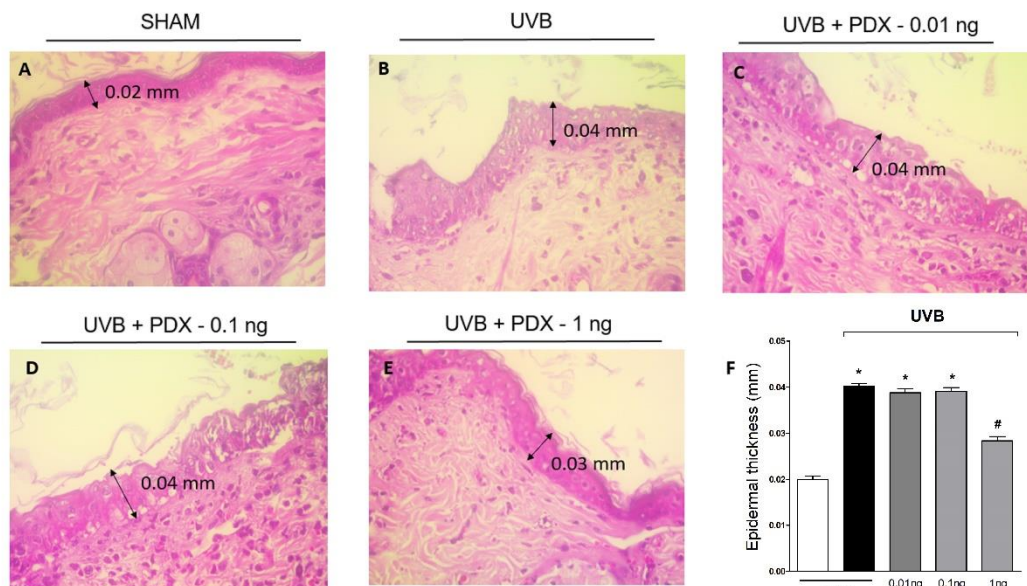
**Figure 4.** PDX reduces NAG activity and the recruitment of LysM-eGFP<sup>+</sup> cells triggered by UVB irradiation. The NAG activity (A) and LysM-eGFP<sup>+</sup> cells recruitment (B–E) were determined in samples collected 12 h after UVB exposure. Only PDX-1 ng/mouse was performed by LysM-eGFP<sup>+</sup> assay. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 6 mice per group and are representative of two separate assays. Original magnification 5x (images B–D); 10  $\mu$ m. \*  $p < 0.05$  compared to sham and #  $p < 0.05$  compared to irradiated control group.



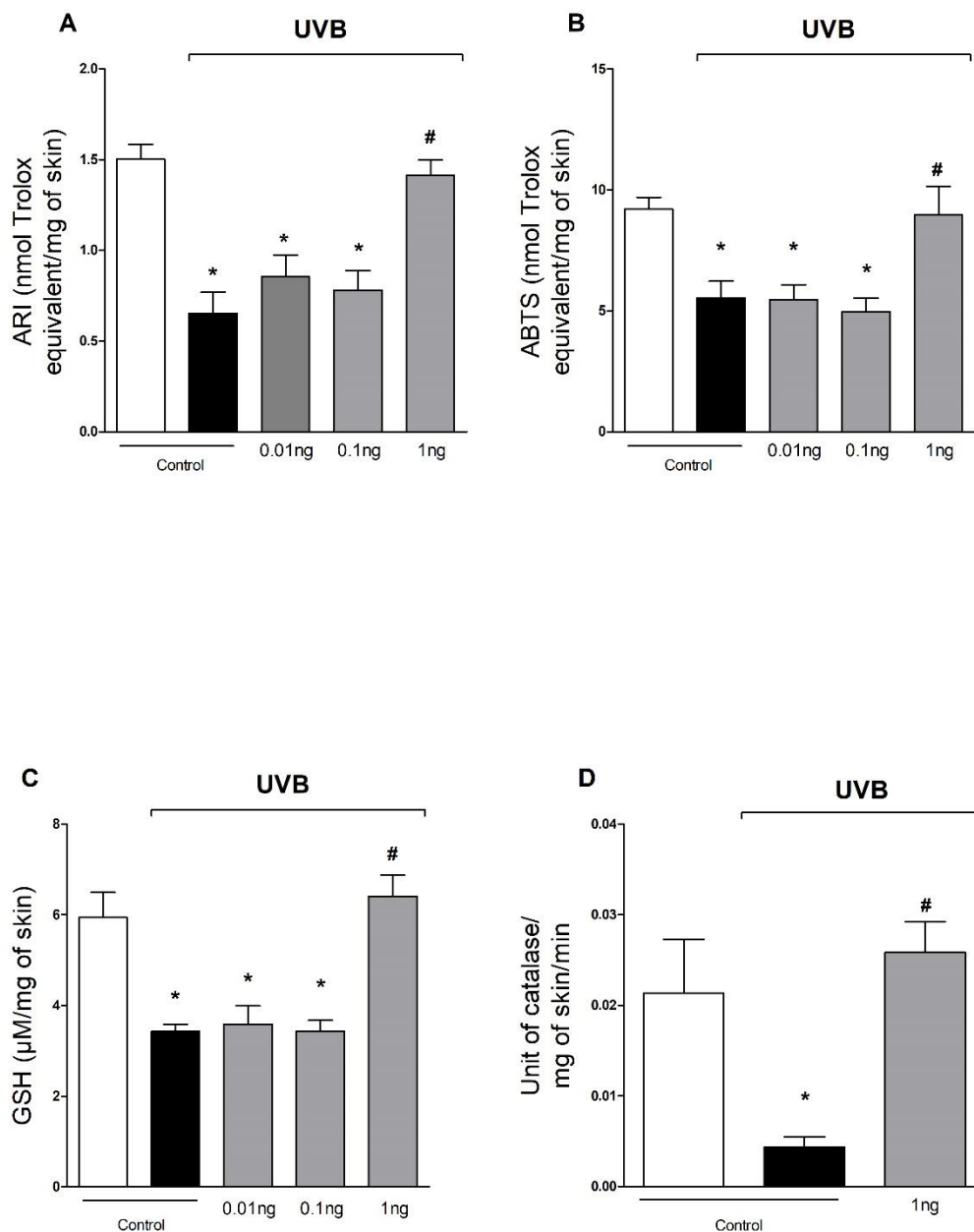
**Figure 5.** PDX dose-dependently diminishes the mast cells counts in the skin after UVB exposure. Mast cells were evaluated by toluidine blue (x40 magnification). Arrows indicate mast cells. (F) Number of mast cells per field. Bars are means  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$  compared to sham and #  $p < 0.05$  compared to irradiated control group, treatment with PDX 0.01 and 0.1 ng/mouse groups.



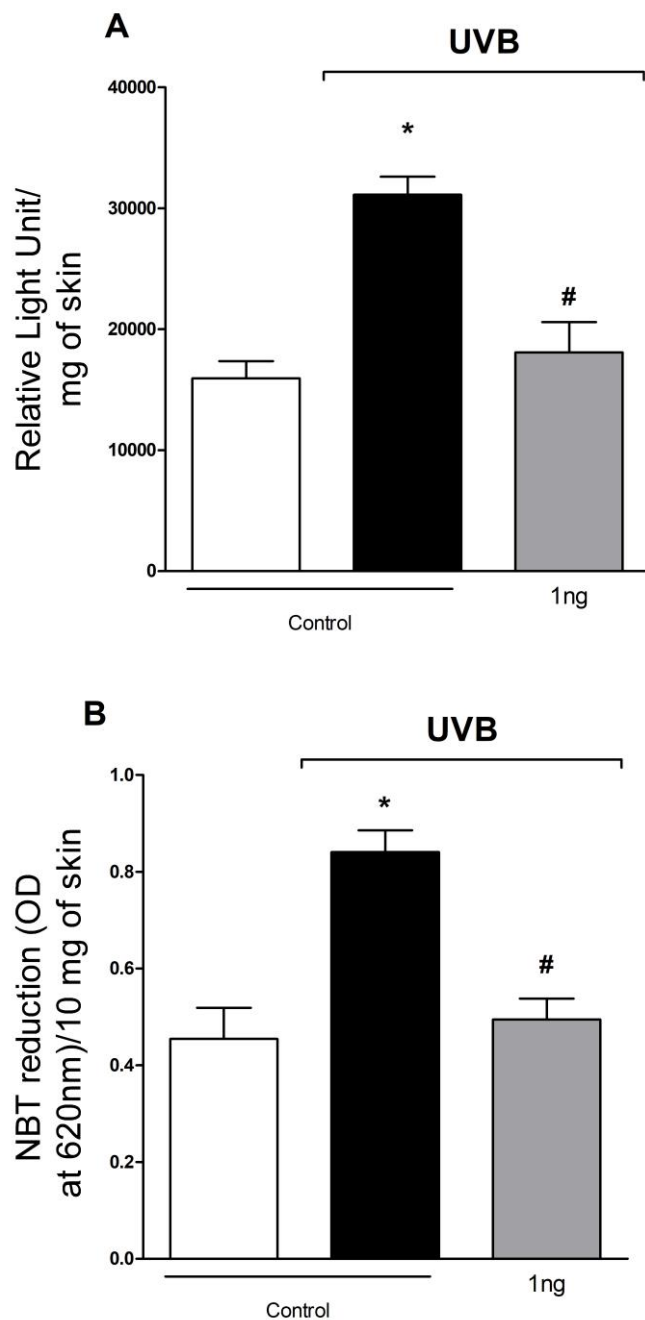
**Figure 6.** PDX dose-dependently diminishes UVB radiation-induced sunburn cell counts. Sunburn cell (black arrows) counts were evaluated using hematoxylin and eosin-stained slices of skin samples collected 12 h after the end of irradiation. Stained slices were examined using light microscopy at 100x magnification. (F) Bars are means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  compared to sham and #  $p < 0.05$  compared to irradiated control group, treatment with PDX 0.01 and 0.1 ng/mouse groups.



**Figure 7.** PDX diminishes UVB irradiation-induced epidermal thickening. The epidermal thickness was determined in samples dissected 12 h after the radiation and stained with hematoxylin and eosin (x40 magnification). Representative images of sham (A), irradiated control (B), irradiated treated with 0.01 ng of PDX (C), irradiated treated with 0.1 ng of PDX (D), and irradiated treated with 1 ng of PDX (E) groups are presented. (F) Bars are means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  compared to sham and # $p < 0.05$  compared to irradiated control group, treatment with PDX 0.01 and 0.1 ng/mouse groups.



**Figure 8.** PDX maintains the skin's antioxidant capacity after UVB radiation-induced. The antioxidant capacity was determined by ARI (A), ABTS<sup>+</sup> (B) and GSH (C) assays in samples collect 12 h after end of UVB exposure. Catalase assay (D) was evaluated only with PDX 1 ng/mouse group and samples were collected after 2 h the end of irradiation. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 6 mice per group and are representative of two separate assays. \*  $p < 0.05$  compared to sham and #  $p < 0.05$  compared to irradiated control group, treatment with PDX 0.01 and 0.1ng/mouse groups (A, B and C).



**Figure 9.** Effect of PDX on UVB radiation-induced lipid peroxidation (LOOH) and superoxide anion production. The t-butyl LOOH-initiated chemiluminescence (QL) (A) and *nitroblue tetrazolium* (NBT) reduction (B) were determined in samples collect 2 h after UVB exposure. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 6 mice per group and are representative of two separate assays. \*  $p < 0.05$  compared to sham and #  $p < 0.05$  compared to irradiated control group.

## Tables

	Effect of PDX against inflammatory and oxidative stress caused by UVB				
	Sham	Irradiated Control	PDX 0.01ng/mouse	PDX 0.1ng/mouse	PDX 1ng/mouse
ARI	1.502 ± 0.202	0.653 ± 0.284*	0.854 ± 0.267*	0.779 ± 0.244*	1.414 ± 0.166#
ABTS	9.203 ± 1.196	5.537 ± 1.535*	5.464 ± 1.361*	4.957 ± 1.396*	8.964 ± 2.650#
GSH	5.942 ± 1.360	3.430 ± 0.381*	3.593 ± 0.974*	3.430 ± 0.592*	6.411 ± 1.150#
NAG	37750 ± 5829	59430 ± 8756*	53050 ± 6082*	59870 ± 1711*	37730 ± 1261#
NBT	0.454 ± 0.157	0.840 ± 0.101*	-	-	0.494 ± 0.097**
CATA	0.021 ± 0.013	0.004 ± 0.002*	-	-	0.026 ± 0.006**
LOOH	15900 ± 2816	31130 ± 1490*	-	-	18090 ± 5570**

Inflammatory and oxidative stress parameters were analyzed as mean ± standard error of the mean (SEM) of measurements made with 6 animals in each group per experiment.

ARI ability to reduce iron (nanomole-trolox equivalent/ milligram of skin); ABTS 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (nanomole-trolox equivalent/ milligram of skin); GSH reduced glutathione (micromolar per milligram protein); NAG-acetyl-glucosaminidase activity (macrophages per milligram of skin), NBT – *nitroblue tetrazolium* reduction (OD at 620 nm per 10 milligram of skin); CATA – catalase activity (unit per milligram of skin per minute); LOOH – lipid hydroperoxides (relative light unit per milligram of skin) .

\*  $p < 0.05$  compared to sham;

\*\*  $p < 0.05$  compared to irradiated control group.

#  $p < 0.05$  compared to irradiated control group, treatment with PDX 0.01 and 0.1ng/mouse groups

## References

1. Shetty PK, Venuvanka V, Jagani HV, Chethan GH, Ligade VS, Musmade PB, et al. Development and evaluation of sunscreen creams containing morin-encapsulated nanoparticles for enhanced UV radiation protection and antioxidant activity. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:6477–91.
2. Tewari A, Grage MML, Harrison GI, Sarkany R, Young AR. UVA1 is skin deep: molecular and clinical implications. *Photochem Photobiol Sci [Internet]*. 2013;12:95–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23192740>
3. Vale DL, Martinez RM, Medeiros DC, da Rocha C, Sfeir N, Lopez RFV, et al. A topical formulation containing quercetin-loaded microcapsules protects against oxidative and inflammatory skin alterations triggered by UVB irradiation: enhancement of activity by microencapsulation. *J Drug Target [Internet]*. 2021;29(9):983–97. Available from: <https://doi.org/10.1080/1061186X.2021.1898621>
4. Melo CPB, Saito P, Vale DL, Rodrigues CCA, Pinto IC, Martinez RM, et al. Protective effect of oral treatment with *Cordia verbenacea* extract against UVB irradiation deleterious effects in the skin of hairless mouse. *J Photochem Photobiol B Biol [Internet]*. 2021;216(February):112151. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112151>
5. Vitale N, Kisslinger A, Paladino S, Procaccini C, Matarese G, Pierantoni GM, et al. Resveratrol couples apoptosis with autophagy in UVB-irradiated HaCaT cells. *PLoS One*. 2013;8(11).
6. Lopes DM, McMahon SB. Ultraviolet Radiation on the Skin: A Painful Experience? *CNS Neurosci Ther*. 2016;22(2):118–26.
7. Verri WA, Vicentini FTMC, Baracat MM, Georgetti SR, Cardoso RDR, Cunha TM, et al. Flavonoids as anti-inflammatory and analgesic drugs: Mechanisms of action and perspectives in the development of pharmaceutical forms. Vol. 36, *Studies in Natural Products Chemistry*. 2012. 297–330 p.
8. Huber LC, Gay S, Distler O, Pisetsky DS. The effect of UVB on lupus skin: New light on the role of apoptosis in the pathogenesis of autoimmunity. *Rheumatology*.

- 2006;45(5):500–1.
9. Dourmishev LA, Meffert H, Piazena H. Dermatomyositis: Comparative studies of cutaneous photosensitivity in lupus erythematosus and normal subjects. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2004;20(5):230–4.
  10. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014;510(7503):92–101.
  11. Charles N. Serhan, Jesmond Dalli, Romain A. Colas, Jeremy W. Winkler and NC. Protectins and Maresins: New Pro-Resolving Families of Mediators in Acute Inflammation and Resolution Bioactive Metabolome. *Biochim Biophys Acta*. 2015;4(1851):397–413.
  12. Kohli P, Levy BD. Resolvins and protectins: Mediating solutions to inflammation. *Br J Pharmacol*. 2009;158(4):960–71.
  13. Balas L, Guichardant M, Durand T, Lagarde M. Confusion between protectin D1 (PD1) and its isomer protectin DX (PDX). An overview on the dihydroxy-docosatrienes described to date. *Biochimie* [Internet]. 2014;99(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.11.006>
  14. Liu M, Boussetta T, Makni-Maalej K, Fay M, Driss F, El-Benna J, et al. Protectin DX, a double lipoxygenase product of DHA, inhibits both ros production in human neutrophils and cyclooxygenase activities. *Lipids*. 2014;49(1):49–57.
  15. White PJ, St-Pierre P, Charbonneau A, Mitchell PL, St-Amand E, Marcotte B, et al. Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-liver glucoregulatory axis. *Nat Med*. 2014;20(6):664–9.
  16. Zhuo XJ, Hao Y, Cao F, Yan SF, Li H, Wang Q, et al. Protectin DX increases alveolar fluid clearance in rats with lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Exp Mol Med* [Internet]. 2018;50(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0075-4>
  17. Imai Y. Role of omega-3 PUFA-derived mediators, the protectins, in influenza virus infection. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2015;1851(4):496–502. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.01.006>

18. Cezar TLC, Martinez RM, Rocha C da, Melo CPB, Vale DL, Borghi SM, et al. Treatment with maresin 1, a docosahexaenoic acid-derived pro-resolution lipid, protects skin from inflammation and oxidative stress caused by UVB irradiation. *Sci Rep.* 2019;9(1).
19. Tan W, Chen L, Wang YX, Hu LS, Xiong W, Shang Y, et al. Protectin DX exhibits protective effects in mouse model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Chin Med J (Engl).* 2018;131(10):1167–73.
20. Melo CPB, Saito P, Vale DL, Rodrigues CCA, Pinto IC, Martinez RM, et al. Protective effect of oral treatment with *Cordia verbenacea* extract against UVB irradiation deleterious effects in the skin of hairless mouse. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2021 Mar;216:112151. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134421000294>
21. Martinez RM, Ivan ALM, Vale DL, Campanini MZ, Ferreira VS, Steffen VS, et al. Topical emulsion containing pyrrolidine dithiocarbamate: effectiveness against ultraviolet B irradiation-induced injury of hairless mouse skin. *J Pharm Pharmacol.* 2018;
22. Martinez RM, Pinho-Ribeiro FA, Vale DL, Steffen VS, Vicentini FTMC, Vignoli JA, et al. Trans-chalcone added in topical formulation inhibits skin inflammation and oxidative stress in a model of ultraviolet B radiation skin damage in hairless mice. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2017;171.
23. Xia H, Ge Y, Wang F, Ming Y, Wu Z, Wang J, et al. Protectin DX ameliorates inflammation in sepsis-induced acute lung injury through mediating PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B pathway. *Immunol Res.* 2020;68(5):280–8.
24. Martinez RM, Fattori V, Saito P, Pinto IC, Rodrigues CCA, Melo CPB, et al. The Lipoxin Receptor/FPR2 Agonist BML-111 Protects Mouse Skin Against Ultraviolet B Radiation. *Molecules* [Internet]. 2020 Jun 26;25(12):2953. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/12/2953>
25. Martinez RM, Pinho-Ribeiro FA, Steffen VS, Caviglione C V., Fattori V, Bussmann AJC, et al. Trans -Chalcone, a flavonoid precursor, inhibits UV-induced skin inflammation and oxidative stress in mice by targeting NADPH oxidase and cytokine production. *Photochem Photobiol Sci.* 2017;

26. Bourbouze R, Raffi F, Dameron G, Hali-Miraftab H, Loko F, Vilde JL. N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG) isoenzymes release from human monocyte-derived macrophages in response to zymosan and human recombinant interferon- $\gamma$ . *Clin Chim Acta*. 1991;199(2):185–94.
27. Belebecha V, Casagrande R, Urbano MR, Crespigio J, Martinez RM, Vale DL, et al. Effect of the platelet-rich plasma covering of polypropylene mesh on oxidative stress, inflammation, and adhesions. *Int Urogynecol J*. 2020;31(1).
28. Georgetti SR, Casagrande R, Moura-de-Carvalho Vicentini FT, Verri WA, Fonseca MJV. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different in vitro methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006;64(1):99–106.
29. Shindo Y, Witt E, Packer L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J Invest Dermatol*. 1993;100(3):260–5.
30. Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol*. 2005;140(1):47–52.
31. Campanini MZ, Custodio DL, Ivan AL, Martins SM, Paranzini MJ, Martinez RM, et al. Topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract: In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy against UV-B-induced oxidative stress. *AAPS PharmSciTech*. 2014;15(1):86–95.
32. Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med*. 1991;10(2):93–100.
33. Saito P, Melo CPB, Martinez RM, Fattori V, Cezar TLC, Pinto IC, et al. The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018 Oct 31;9(October):1–15. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.01242/full>
34. Serhan CN, Chiang N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators:

- a new pharmacologic genus. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2008 Mar;153(S1):S200–15. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/sj.bjp.0707489>
35. Bazan NG. Neuroprotectin D1 (NPD1): A DHA-Derived Mediator that Protects Brain and Retina Against Cell Injury-Induced Oxidative Stress. *Brain Pathol* [Internet]. 2006 Apr 5;15(2):159–66. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3639.2005.tb00513.x>
36. Chen P, Fenet B, Michaud S, Tomczyk N, Véricel E, Lagarde M, et al. Full characterization of PDX, a neuroprotectin/protectin D1 isomer, which inhibits blood platelet aggregation. *FEBS Lett* [Internet]. 2009 Nov 3;583(21):3478–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.004>
37. Stein K, Stoffels M, Lysson M, Schneiker B, Dewald O, Krönke G, et al. A role for 12/15-lipoxygenase-derived proresolving mediators in postoperative ileus: protectin DX-regulated neutrophil extravasation. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2016 Feb;99(2):231–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.3HI0515-189R>
38. Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Lu Y, Siegelman J, Baer T, et al. Anti-Inflammatory Actions of Neuroprotectin D1/Protectin D1 and Its Natural Stereoisomers: Assignments of Dihydroxy-Containing Docosatrienes. *J Immunol* [Internet]. 2006 Feb 1;176(3):1848–59. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.176.3.1848>
39. Anderson LS, Reynolds MB, Rivara KR, Miller LS, Simon SI. A Mouse Model to Assess Innate Immune Response to *Staphylococcus aureus* Infection. Prince A, editor. *J Vis Exp* [Internet]. 2019 Feb 28;14(144):e1007112. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1007112>
40. Chen J, Zhu Z, Li Q, Lin Y, Dang E, Meng H, et al. Neutrophils Enhance Cutaneous Vascular Dilation and Permeability to Aggravate Psoriasis by Releasing Matrix Metalloproteinase 9. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2021 Apr;141(4):787–99. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.07.028>
41. Siiskonen H, Smorodchenko A, Krause K, Maurer M. Ultraviolet radiation and skin mast cells: Effects, mechanisms and relevance for skin diseases. *Exp Dermatol*. 2018;27(1):3–8.

42. Hart PH, Grimbaldston MA, Finlay-Jones JJ. Sunlight, Immunosuppression And Skin Cancer: Role Of Histamine And Mast Cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. 2001 Jan;28(1–2):1–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1440-1681.2001.03392.x>
43. Kasahara S, Aizawa K, Okamiya M, Kazuno N, Mutoh S, Fugo H, et al. UVB IRRADIATION SUPPRESSES CYTOKINE PRODUCTION AND INNATE CELLULAR IMMUNE FUNCTIONS IN MICE. *Cytokine* [Internet]. 2001 Apr;14(2):104–11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104346660190849X>
44. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS–) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol* [Internet]. 2019 May 24;10(MAY):1–14. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01084/full>
45. Hansen TV, Vik A, Serhan CN. The Protectin Family of Specialized Pro-resolving Mediators: Potent Immunoresolvents Enabling Innovative Approaches to Target Obesity and Diabetes. *Front Pharmacol* [Internet]. 2019 Jan 17;9(JAN):1–17. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.01582/full>
46. Xia H, Chen L, Liu H, Sun Z, Yang W, Yang Y, et al. Protectin DX increases survival in a mouse model of sepsis by ameliorating inflammation and modulating macrophage phenotype. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 7;7(1):99. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-00103-0>
47. Laethem A Van, Claerhout S, Garmyn M, Agostinis P. The sunburn cell: Regulation of death and survival of the keratinocyte. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2005 Aug;37(8):1547–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272505000671>
48. Page A, Navarro M, Suarez-Cabrera C, Alameda JP, Casanova ML, Paramio JM, et al. Protective role of p53 in skin cancer: Carcinogenesis studies in mice lacking epidermal p53. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Apr 12;7(15):20902–18. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.7897>
49. Lee C-H, Wu S-B, Hong C-H, Yu H-S, Wei Y-H. Molecular Mechanisms of UV-Induced

- Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2013 Mar 20;14(3):6414–35. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/3/6414>
50. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*. 1994;
  51. Kim DJ, Angel JM, Sano S, DiGiovanni J. Constitutive activation and targeted disruption of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in mouse epidermis reveal its critical role in UVB-induced skin carcinogenesis. *Oncogene* [Internet]. 2009 Feb 12;28(7):950–60. Available from: <http://www.nature.com/articles/onc2008453>
  52. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017 Jan;482(3):419–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X16317715>
  53. Hwang H-J, Jung TW, Kim JW, Kim JA, Lee Y Bin, Hong SH, et al. Protectin DX prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress in vascular endothelial cells via an AMPK-dependent mechanism. *Cell Signal* [Internet]. 2019 Jan;53:14–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.09.011>

## 4.2 USE OF EMULSION CONTAINING PROTECTIN DX (PDX) AGAINST PHOTOOXIDATIVE AND INFLAMMATORY DAMAGE CAUSED BY UVB-IRRADIATION IN HAIRLESS MICE

### MEDIATORS OF INFLAMMATION

David L. Vale,<sup>a</sup> Camilla C. A. Rodrigues,<sup>a</sup> Renzo Ortolan Thadei,<sup>a</sup> Priscila Saito<sup>a</sup>, Ingrid Caroline Pinto<sup>a</sup>, Waldiceu A. Verri Jr.,<sup>b</sup> Sandra R. Georgetti,<sup>a</sup> Rúbia Casagrande\*<sup>a</sup>

*<sup>a</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Avenida Robert Koch, 60, Hospital Universitário, 86039-440, Londrina, Paraná, Brazil.*

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

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

**Running Head:** Topical formulation containing protectin DX (PDX) prevents the oxidizing and inflammatory action UVB irradiation on the skin hairless mice.

## **Use of topical formulation containing protectin DX against photooxidative and inflammatory damage caused by UVB-irradiation in hairless mice**

### **ABSTRACT**

A new substance derived from docosahexaenoic acid, denominated Protectin DX (PDX), is involved in the clearance and regulation of pro-inflammatory mediators and attenuates the production of reactive oxygen species (ROS). It is already widely known that excessive exposure to UVB-irradiation causes local inflammation associated with migration of immune system cells, tissue vasodilation, cytokine release and absorption of irradiation by molecular structures producing ROS, which interact with lipids, proteins, DNA and RNA causing cutaneous photoaging and skin cancer. In this context, the use of PDX can reduce oxidative stress and inflammation, contributing to cell homeostasis. We demonstrated in a previous study that PDX administered intraperitoneally is associated with a global resolution capacity of the harmful effects of UVB-irradiation. These findings prompted a study of the therapeutic potential of PDX administered in a topical formulation by UVB-irradiation model. We found that PDX incorporated in a topical formulation applied twice before and once after irradiation (0.7 ng in three treatments), on the hairless mice dorsal, was able to reduce skin edema, mast cell recruitment, sunburn cell formation, epidermal thickness, lipid hydroperoxide production, metalloproteinase-9 activity, and degradation of collagen fibers. Moreover, we showed the treatment of topical formulation containing PDX maintained the endogenous antioxidant system similar to the non-irradiated control group. Our results, therefore, support the development of a new drug administered topically to reduce UVB-sensitive diseases.

### **Keywords**

Protectin DX, UVB-irradiation, inflammation, oxidative stress, pro-resolution.

## 1. Introduction

While UVB-irradiation is essential for some physiological processes (vitamin D3 synthesis) [1], excessive exposure prompts pathological changes in the skin, culminating in acute inflammation (edema, erythema and pain) and chronic processes (photoaging and photocarcinogenesis)[2]. The skin damage caused by radiation can essentially modify the keratinocytes in the epidermis and, consequently, molecular changes with the development of reactive oxygen species (ROS)[3], which are highly reactive. Endogenous mechanisms (reduced glutathione, catalase, superoxide dismutase, ascorbic acid and ubiquinone) are used to react with ROS making them less reactive[4]. However, the amount of endogenous antioxidants is not enough to prevent cutaneous oxidative stress[5].

In addition, UVB induces tyrosine kinase phosphorylation, which induces the activation of NF- $\kappa$ B (transcriptional factor) increasing the production of inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6)[6]. Therefore, skin exposure to UVB radiation induces the production of ROS and initiates an inflammatory response. Besides, erythroid nuclear factor-2 (Nrf-2) is the main transcriptional regulator of the expression of genes encoding antioxidant enzymes, including heme oxygenase-1 (HO-1), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), catalase, NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO1) among others[7]. In general, Nrf2 negatively regulates the transcription of pro-inflammatory cytokines and chemokines, metalloproteinases, inflammatory mediators, such as COX-2, which directly or indirectly affect the activation of NF- $\kappa$ B and other pathways that control inflammation[8]. The Nrf2 and NF- $\kappa$ B signaling pathways interact in a complementary and specialized way for the maintenance of cellular homeostasis. The two pathophysiological mechanisms have a synergistic relationship [9,10]. Hence, it is important to study new substances with potential anti-inflammatory and antioxidant effects and that are used in a lower concentration with minor adverse effects.

Recently, a new substance derived from  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid denominated protectin DX has been reported to exert anti-inflammatory effects in several disorders, including acute lung injury, osteoarthritis progression and hepatic steatosis[11–13]. Previous studies suggest PDX attenuates inflammatory action by inhibiting COX-1 and COX-2 (enzymes responsible for prostaglandin production) not only in acute inflammation[14] but also chronic inflammation[15,16]. Studies have shown that PDX acts on AMPK signaling decreasing NF- $\kappa$ B (consequently reducing cytokines inflammatory) and activating FOXO (Forkhead Box O) for maintaining the redox balance through enhanced endogenous antioxidant production [12,15,17].

A study developed by our laboratory demonstrated the anti-inflammatory and antioxidant effect of PDX when administered intraperitoneally at a dose of 1 ng/mouse per treatment (before and after irradiation session) in a model of skin injury induced by exposure to UVB-irradiation (unpublished data). However, there is no knowledge about the use of this molecule added in a topical formulation as a treatment in the model of skin damage induced by UVB-irradiation, which contributes to the development of new medicines. Since the topical route has the advantage of avoiding the first-pass effect in the liver and improving patient adherence to treatment, it is a way of treating skin lesions with fewer adverse effects. Here, we compared topical formulation containing PDX against inflammation and oxidative stress *in vivo* model, across three groups (non-irradiated control, irradiated control, and topical formulation without PDX).

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Materials

The excipients used for the preparation of the formulation (Polawax<sup>®</sup>, caprylic/capric triglyceride, Phenonip<sup>®</sup>) were obtained from Galena (Campinas, SP, Brazil). PDX with purity 95% (Cayman Chemical, MI, USA). *Tert*-butyl hydroperoxide, Acrós Organics (Geel, Antwerp, Belgium). Brilliant blue R, reduced glutathione (GSH), DMSO (dimethylsulfoxide), *N*-ethylmaleimide, phenylmethanesulfonyl fluoride, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), nitroblue tetrazolium (NBT), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), trolox, and bisacrylamide were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Isoflurane from Abbott (Chicago, IL, USA). Xylene cyanol and hydroxymethyl aminomethane (Tris) were obtained from Amresco (Solon, OH, USA). Acrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS) from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Glycerol, propylene glycol from Biotec (Pinhais, PR, Brazil) and Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer (Aristoflex AVC<sup>®</sup>) from Pharmaspecial (São Paulo, SP, Brazil). All other reagents used were of pharmaceutical grade.

### 2.2 Topical formulation containing PDX (TFcPDX)

Formulation was prepared using: i) Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer 5% (Aristoflex<sup>®</sup>) (20%); ii) the self-emulsifying wax Polawax<sup>®</sup> (cetostearyl alcohol and polyoxyethylene derived of a fatty acid ester of sorbitan 20 0E) (2%); iii) the solubilizing agent and moisturizer propylene glycol (6%); iv) the emollient caprylic/capric triglyceride (5%); v) the preservative phenonip (0.4%); v) deionized water to complete 100% of formulation. After 24 hours of preparation, the topical formulation was divided into two groups named: topical formulation control (TFC) and topical formulation containing PDX (TFcPDX) An aliquot of PDX was added to topical formulation whose emulsion dosage (0.5 g) contained 0.7 ng of PDX.

## **2.3 Therapeutic action of TFcPDX against inflammatory and photooxidative damage caused by UVB irradiation.**

### 2.3.1 Animals

The experiments were performed with female hairless mice (HRS/J), weighing 30 g and aged 60 days. The animals were obtained by the Animal House of the University Hospital of Londrina State University. Mice had free access to water and food, and were housed at a temperature of  $23^{\circ}\text{C} \pm 2$  with a 12 h light and 12 h dark cycles. The Animal Ethics Committee (Of. Circ. CEUA n° 148/2016, process CEUA n° 11146.2016.97) of the Londrina State University approved all procedures. All efforts were made to minimize animal use and their suffering.

### 2.3.2 Guideline for experimental design

HRS/J mice (a hairless strain) were randomly designed to different groups with 6 mice each: non-irradiated control group, irradiated control group, irradiated group and treated with TFC, irradiated group and treated with TFcPDX. Mice were treated topically in dorsum with 0.5 g of formulation at 1 h, 5 min before the beginning of UVB irradiation and 5 min after the ending of this session (Figure 1). HRS/J mice were anesthetized with 1.5% isoflurane and euthanized 12 h after UVB exposure to test for histology, edema, ARI, ABTS radical, GSH levels and metalloproteinase-9. Other assay, they were anesthetized with 1.5% isoflurane and decapitated 2 h after UVB exposure to test for lipid hydroperoxide (LHP), superoxide anion production (NBT) catalase activity (CATA). A previous study of our group showed that treatment with 1 ng of PDX intraperitoneal per treatment (two sessions of treatment) was able to protect skin against damage caused by UVB-irradiation.

### 2.3.3 Irradiation

The required dose of UVB lamp irradiation to cause changes between the exposed and unexposed groups was  $4.14 \text{ J/cm}^2$  [3,18]. This lamp emits a continuous spectrum between 270 to 400 nm, but the emission peak is 313 nm. In the device, the lamp was mounted 20 cm above the place where the mice were located, whose irradiation was  $0.209 \text{ mW/cm}^2$  measured by an IL 1700 radiometer (Newburyport, MA, USA) equipped with a UV sensor (SED005) and UVB (SED240).

### 2.3.4 Skin Edema

Skin samples were collected in a mold with a fixed diameter (5 mm) and weighed. Results were expressed in mg of skin [19].

### 2.3.5 Metalloproteinase analysis by zymography

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) substrate-embedded zymography was used to detect metalloproteinase (MMP-9), according to previous studies [20,21]. After electrophoresis, the gels were incubated for 1 h with 2.5% Triton X-100 under constant shaking, incubated overnight in 0.05 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.01 M  $\text{CaCl}_2$  and 0.02% sodium azide at  $37^\circ\text{C}$ , and stained the following day with brilliant blue R. After destaining in 20% acetic acid, zone of enzyme activity was analyzed by comparing the groups in the ImageJ software package (NIH, Bethesda, MD, USA).

### 2.3.6 Evaluation of endogenous antioxidant levels: reduced glutathione (GSH)

GSH levels were determined as described previously [3]. Skin sample was homogenized in 0.02 M EDTA with 1:4 w/w dilution. A solution with 50% trichloroacetic acid was added to the homogenate and centrifuged twice at  $4^\circ\text{C}$  for 10 min at  $2700 \text{ xg}$ . Then,  $50 \mu\text{L}$  of sample was

added to 100  $\mu$ l of 0.4 M Tris with 5  $\mu$ l of DTNB (1.9 mg/ml in methanol) and this mixture was incubated for 5 minutes. After this period, the absorbance reading was performed at 405 nm (EnSpire, Perkin Elmer®). The standard curve was prepared with 5-150  $\mu$ M GSH. Results are presented as  $\mu$ M GSH per mg of skin [10,22].

### 2.3.7 Sample ability to reduce iron (ARI) and ABTS radical

Skin samples were homogenized with 400  $\mu$ L KCl (1.15%) using Tissue-Tearor (Biospec 985370), centrifuged (1000 xg at 4°C for 10 min), and antioxidant ability was determined as describe previously [20,23]. The absorbance was determined at 595 nm for ARI assay and 730 nm for ABTS radical (EnSpire, Perkin Elmer). A curve of Trolox (0.01 – 20 nmol) allowed calculation of sample results as equivalent nmol of Trolox/mg skin[9,21].

### 2.3.8 Catalase (CATA) assay.

A solution with 500  $\mu$ L of 0.02 M EDTA was used for homogenizing samples skin using Tissue-Tearor (Biospec 985370) and centrifuged twice (2700 xg at 4°C during 10 min). Then, 10  $\mu$ L sample was mixture with 160  $\mu$ L buffer Tris-HCl 1 M EDTA 5mM pH 8.0, 20  $\mu$ L of deionized water and 20  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM. CATA was calculated by the difference of two reading at 240 nm (EnSpire, Perkin Elmer) at 25°C in which the first reading was before the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the second reading after 30 seconds. The CATA values were expressed as unit of CATA/mg of skin min[24].

### 2.3.9 Superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) quantitation assay.

Production in the skin was measured using the nitroblue tetrazolium (NBT) assay as described previously[25]. Reduction of NBT to formazan was determined in spectrophotometer reader (EnSpire, Perkin Elmer) at 620 nm with data shown as optical density (OD) per 10 mg of skin

### 2.3.10 Lipid hydroperoxides (LHP) assay

Skin samples were homogenized using Tissue-Tearor (Biospec 985370) in 800  $\mu\text{L}$  of Phosphate Buffered Saline (PBS) and centrifuged at 2000  $\times g$  for 2 minutes. Then, 70  $\mu\text{L}$  of the supernatant was mixture with 420  $\mu\text{L}$  reaction buffer (20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 0.9% NaCl pH 7.4), added 10  $\mu\text{L}$  tert-butyl and 10  $\mu\text{L}$  luminol. Each sample was analyzed for 3600 seconds using the Glomax 20/20 (Madison, Wisconsin, USA) and chemiluminescence values were calculated by the area under the curve and multiplied by the skin weight for each sample. The reading of the buffer without sample was also performed. The results were expressed in relative light unit per mg of skin [26].

### 2.3.11 Histology

Skin samples were collected in formaldehyde 10%, embedded in paraffin and sectioned. Hematoxylin and eosin staining was applied for epidermal thickness (x40 magnification) and for counting sunburn cells present in the epidermis (x100 magnification). Masson's trichrome staining was used to evidence collagen fibers (x10 magnification) and also histological sections were made and stained with toluidine for mast cell quantification (x40 magnification). Experiments were performed two times and in each time the number of mice was 6 summing up 12 mice per group. Both analyses were done with the software Infinity Analyze (Lumenera® Software) using light microscopy and the digital images were processed using of the Image J program[9].

### 2.3.12 Statistical analysis.

GraphPad Prism® software package version 4.00 was applied to analyze data by One-way ANOVA and the comparison test of Tukey considering  $p < 0.05$ . Data are means  $\pm$  standard

error of the mean (SEM). *In vivo* results are presented of 6 mice per group per experiment and are representative of two separated experiments.

### 3. Results

#### 3.1 TFcPDX treatment ameliorates UVB-irradiation skin inflammation by reduce skin edema

UVB-irradiation causes local inflammation, altering vessel permeability, resulting in hyperemia and edema[27]. This information was consistent with our result that shows irradiated control group increased the skin's weight (Figure 2). Thereby, we evaluated the role of TFcPDX in reducing the action of this inflammation. Edema was remarkably decreased in mice treated with TFcPDX compared to the irradiated control group and TFC group.

#### 3.2 TFcPDX decreases mast cell recruitment, development of sunburn cells and epidermal thickness triggered upon UVB-irradiation

UVB-irradiation increased mast cell counts in the dermis in irradiated control group and TFC (Figure 3B and C). TFcPDX suppressed the increase of dermal mast cells (Figure 3D). Keratinocytes in process of apoptosis are known as sunburn cells and present condensed nucleus and eosinophilic cytoplasm[28] as indicated by arrows in Figure 4B. TFcPDX inhibited sunburn cell formation (Figure 4D). Moreover, UVB-irradiation caused increase of epidermal thickness in irradiated control group and TFC not evident in TFcPDX (Figure 5).

#### 3.3 TFcPDX treatment attenuates UVB irradiation-induced decrease of skin antioxidants

UVB-irradiation is predominantly absorbed in the epidermis and generates alterations in the skin's molecular structures, forming reactive oxygen species (ROS)[29][30]. ROS are attenuated by endogenous cutaneous antioxidants[30]. To investigate whether TFcPDX was able to maintain the skin's endogenous antioxidant role, we analyzed the samples through ARI and ABTS radical studies. Both trials showed that the formulation prevented antioxidant depletion by keeping close to baseline compared to the non-irradiated control group (Figure 6A and B). Differently of the irradiated control group and TFC, which showed the skin's

antioxidant power was depleted. We further evaluated the antioxidant effect of TFcPDX by investigating GSH levels and CATA enzyme activity. The results showed that the formulation containing PDX was also able to maintain the levels of GSH and CATA activity (Figure 6C and D) similar to non-irradiated control group. Irradiated control group and TFC showed decreased in GSH levels and CATA activity.

3.4 TFcPDX reduces UVB irradiation-induced lipid hydroperoxides (LHP) and superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) production.

UVB-irradiation generates ROS and react with lipids from keratinotics progressing to a more oxidizing environment[20]. Furthermore, another endogenous antioxidant enzyme (superoxide dismutase) is stimulated in order to maintain the homeostasis of this oxidative environment converting superoxide anion to hydrogen peroxide[3]. Then, we investigated the production of LHP and superoxide anion. In both assays, TFcPDX inhibited the production of those products (Figure 7A and B) compared to irradiated control group and TFC group.

3.5 TFcPDX decreases MMP-9 degradation and collagen fibers.

Metalloproteinases are enzymes that degrade extracellular matrices such as collagen and are capable of developing skin photoaging [31]. Considering the role of MMP-9 in skin, we also investigated the effects of TFcPDX after UVB exposition. As observed in Figure 8, UVB-irradiation induced MMP-9 activity in hairless mice compared to the group that was not exposed to radiation, nonetheless this marked activity was not seen in treatment with TFcPDX. The result of the MMP-9 assay was coherent with the result we found with the histopathological study in which TFcPDX showed less degradation of collagen fibers when compared to the irradiated control group and the TFC group (Figure 9).

#### 4. Discussion

Due to previous results showing the therapeutic potential of intraperitoneally applied PDX (1 ng/mouse per treatment) in a UVB irradiation model (unpublished study), we decided to verify if these effects would be shown when we added the pro-resolution lipid in an emulsion for topical application. From the dose with the best therapeutic response (two treatments with 1 ng each), we used PDX in a polymer-based emulsion (Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer), which has better spreadability and less risk of interaction with the drug. We standardize the treatment times and by exposing hairless mice to UVB radiation, we showed that when treated with TFCPDX the photooxidative and inflammatory damage was attenuated when compared to the irradiated control group. We used a topical formulation without PDX as control group which showed the efficacy of TFCPDX is depending, specifically, on protectin DX. To date, the use of PDX in a topical emulsion has not been investigated in any model. The therapeutic potential was characterized by decreased edema, the thickness of the epidermal layer, metalloproteinase-9 activity, and a reduction in the formation of sunburn cells, maintenance of the amount of collagen in the dermis, and by assay that assesses the antioxidant effects.

Using an emulsion allows the drug to be topically administered to directly treat that injured area or release the drug to other tissues[32]. Therefore, knowledge of skin physiology is important. It is known that the skin is a multifunctional organ with multiple compartments, presenting a lipophilic stratum corneum composed of proteins and lipids that can bind reversibly or irreversibly to drugs[33]. So, this stratum limits the diffusion of compounds to the viable epidermis. However, other epidermal structures may be pathways for absorbing substances such as hair follicles and sweat glands[34]. Then, some variables allow adequate skin permeation: molecular mass below 600 Da, solubility in water and oil, high partition coefficient and high skin hydration[35,36]. In this context, protectin DX (10(S),17(S)-dihydroxy-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid) is a substance that can be added to a

formulation because it has a molecular weight of 360 Da, it is miscible in dimethyl sulfoxide, ethanol and phosphate-buffered saline and has pKa 4.82[37]. The low pKa of this drug compared to the pH of the skin is suitable for good skin permeation [3,38] combined with other excipients such as the moisturizer propylene glycol [39].

In a lipopolysaccharide-induced lung injury model, PDX treatment was able to reduce pulmonary edema through upregulation of the sodium channel and Na, K-ATPase protein expression verified *in vivo* and *in vitro* models[40]. Increased active Na<sup>+</sup> transport leads to a greater ability to clear pulmonary edema. In another model of sepsis-induced acute lung injury, it was shown that PDX regulates PPAR $\gamma$ [16] (receptors activated by gamma-type peroxisome proliferators), which has an anti-inflammatory action and interferes with the activation of other transcription factors such as the transcription factor nuclear kappa B (NF-kB)[41]. In addition, PDX also inhibits the phosphorylation and activation of NF-kB p65 with a reduction in inflammatory cytokines and pulmonary edema[16]. In our work, we found that TFcPDX reduced skin edema and the migration of cells responsible for the inflammatory process (mast cells).

One of the consequences of UVB-irradiation is the recruitment of neutrophils with the release of enzymes from the metalloproteinase family that degrade collagen, also stimulated by the inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ [3]. In this study, we analyzed metalloproteinase-9 and the results showed that the enzyme activity was attenuated in the group treated with TFcPDX. PDX inhibited the increase in MMP-13 activity induced by IL-1 $\beta$  in a mouse osteoarthritis model, interfering with the AMPK/NF-kB signaling pathway, also responsible for increasing the production of pro-inflammatory cytokines and stimulating increased activity of metalloproteinases[12].

About endogenous antioxidants, reduced glutathione (GSH) is an antioxidant peptide that reduces ROS and inhibits lipid peroxidation, donating a hydrogen atom, as well as participating in the oxidation-reduction mechanism of glutathione peroxidase (GPX)[42]. The largest store of endogenous antioxidants present in the skin, including GSH, is located in the epidermis[43]. However, the epidermis is the layer of the skin most affected by UVB radiation, which results in a decrease in its antioxidant reserves[3]. Thus, GSH depletion is a previous marker of oxidative stress in the epidermis. Omega-3 polyunsaturated fatty acids ( $\omega$ -3 PUFAs) were analyzed in a previous study regarding protection against traumatic brain injury and showed an increase in the production of endogenous GSH and the production of the PDX isomer neuroprotectin D1 (NPD1). Both phenomena were responsible for reducing oxidative stress[44]. In our research, the results showed the maintenance of GSH concentration in the FTcPDX group when compared to the untreated and TFC-treated irradiated control group.

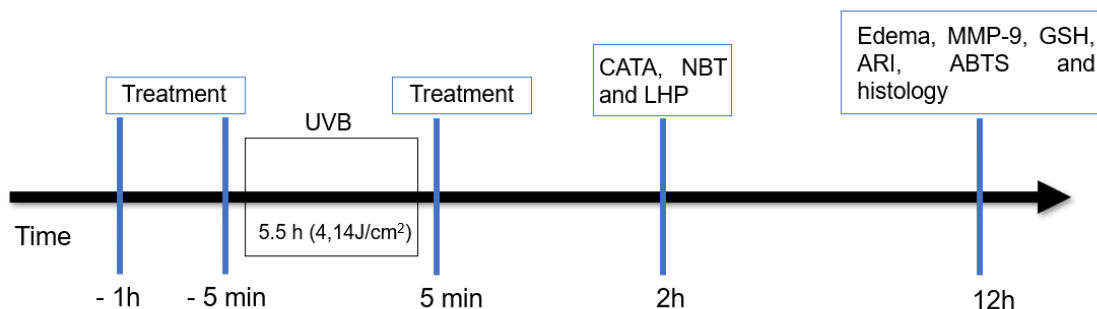
The antioxidant enzymes, CATA and SOD, play a fundamental role in the control of ROS in our bodies[3,24]. Treatment with PDX increased the phosphorylation and activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and increased the expression and activity of antioxidant enzymes in human vascular epithelial cells[17]. AMPK is activated in response to stress and promotes metabolic reprogramming by directly regulating the phosphorylation of the forkhead transcription factor (FOXO) through the Thr649 receptor, with translocation to the nucleus, activating the transcription of genes responsible for the expression of catalase, superoxide dismutase and sestrin[45]. In our work, we showed that TFCPDX treatment-maintained catalase and superoxide dismutase, evaluated by an indirect assay, levels similar to the non-irradiated group. Furthermore, another study demonstrated that PDX inhibited the production of ROS by neutrophils through the inhibition of the enzyme NADPH-oxidase (NOX-2)[14]. NOX-2 is found in neutrophils and increases the production of superoxide anion in episodes of inflammation[46]. PDX also inhibited tert-butyl-induced

oxidative stress in retinal pigment epithelium cells, increasing SOD activity by reducing the superoxide anion to hydrogen peroxide[47]. Therefore, the mechanism of action of PDX in inhibiting the production of superoxide anion may be linked to inhibition of NOX-2 activity and an increase in SOD activity.

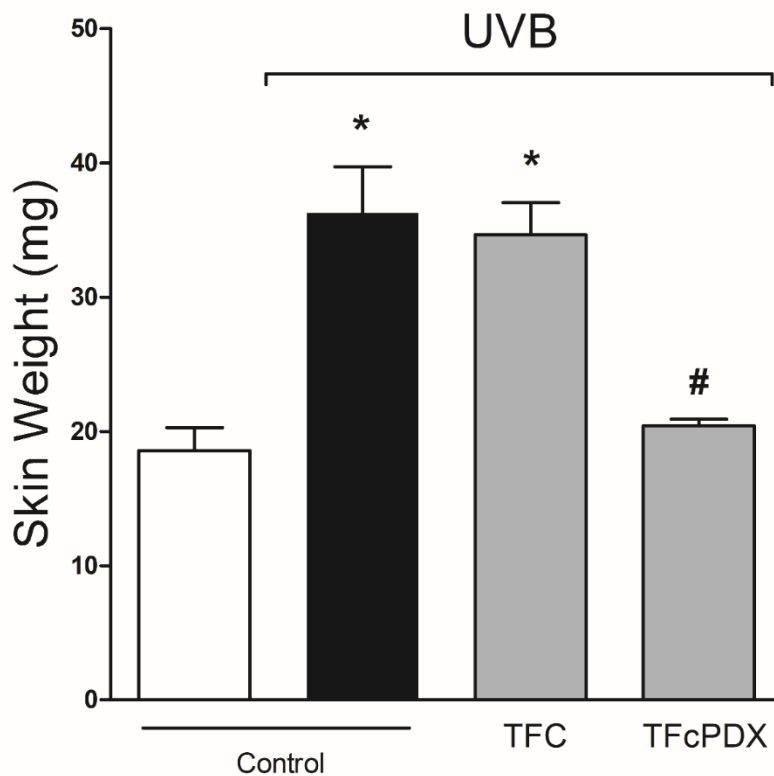
Oxidative stress can also affect lipids through damage to biological membranes prompted to lipid peroxidation causing damage to DNA and proteins in ultimate circumstances. The main ROS responsible for initiating lipid peroxidation are the hydroxyl and peroxy radicals formed during Fenton reactions[48]. Furthermore, lipid peroxidation produces aldehydes such as 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) capable of conjugating with to GSH, resulting in increased recruitment of immune cells, increased production of superoxide anion and pro-inflammatory cytokines[49]. RvD1, another lipid mediator from DHA, has been shown to reduce inflammation induced by the GSHNE conjugate[9]. In this work we found that lipid peroxidation was reduced when mice were treated with TFcPDX. Thus, the inhibition of hydroperoxide formation may be related to a decrease in the concentration of ROS and the maintenance of the endogenous antioxidant system because of PDX activity. Further, ARI and ABTS assays proved that the skin maintained its overall antioxidant capacity, demonstrating the antioxidant potential that topical formulation containing PDX caused after the skin being exposed to radiation.

In conclusion, further studies are needed to elucidate the anti-inflammatory and antioxidant role of TFcPDX in this radiation model. However, we proved the concept that PDX, a pro-resolution lipid, plays an antioxidant role when administered in a topical emulsion against UVB-induced damage.

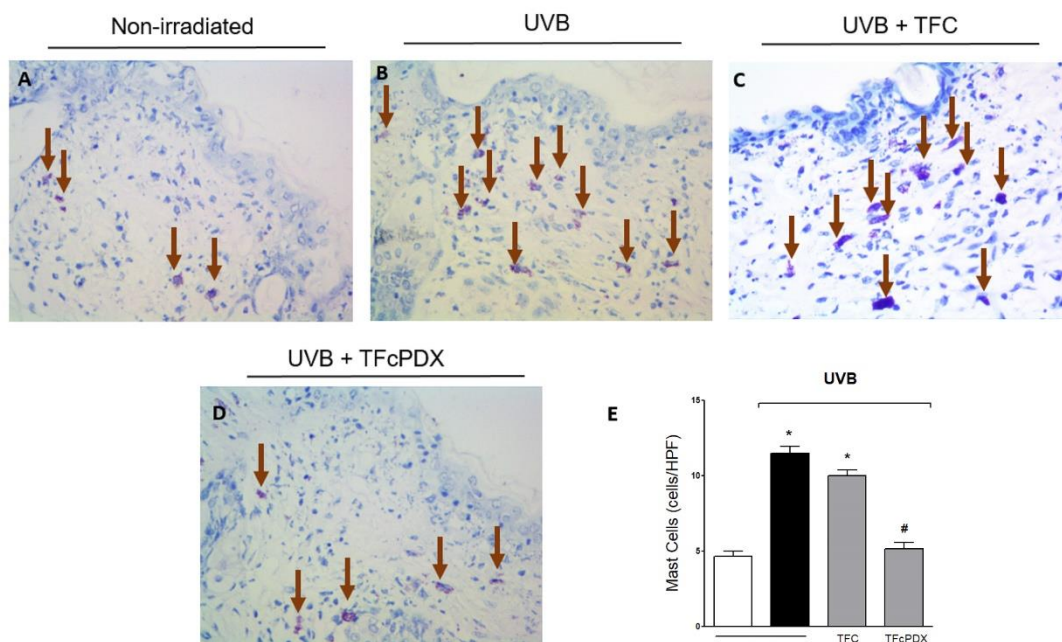
## Figures



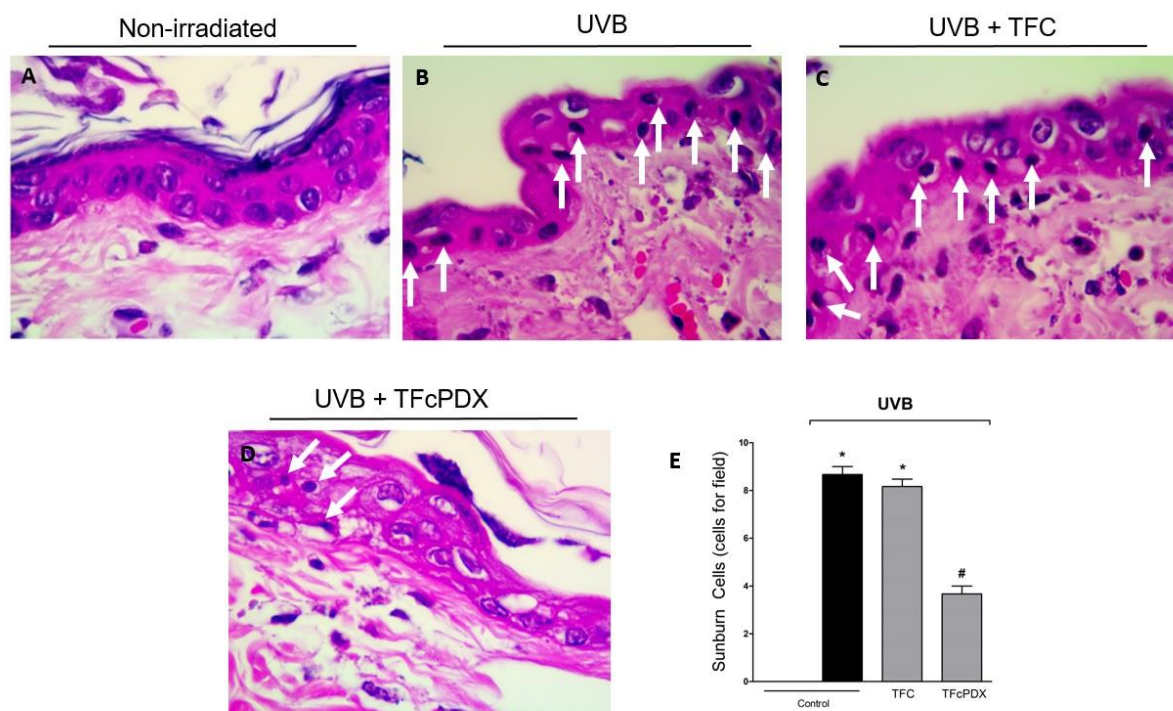
**Figure 1.** Guideline protocol approaching the treatment with topical formulation containing PDX (TFcPDX), time points of sample collection, and parameters analyzed at each time point. Mice were treated with TFcPDX or topical formulation control (TFC) 1 h and 5 min before the beginning of irradiation and 5 min after the irradiation. Dorsal skin samples were collected 12 h after the exposure to UVB irradiation for skin edema, MMP-9 activity, ARI, ABTS radical, GSH levels and histology. Samples were collected after 2 hours of exposure to UVB for the tests of CATA, superoxide anion production (NBT reduction) and LHP.



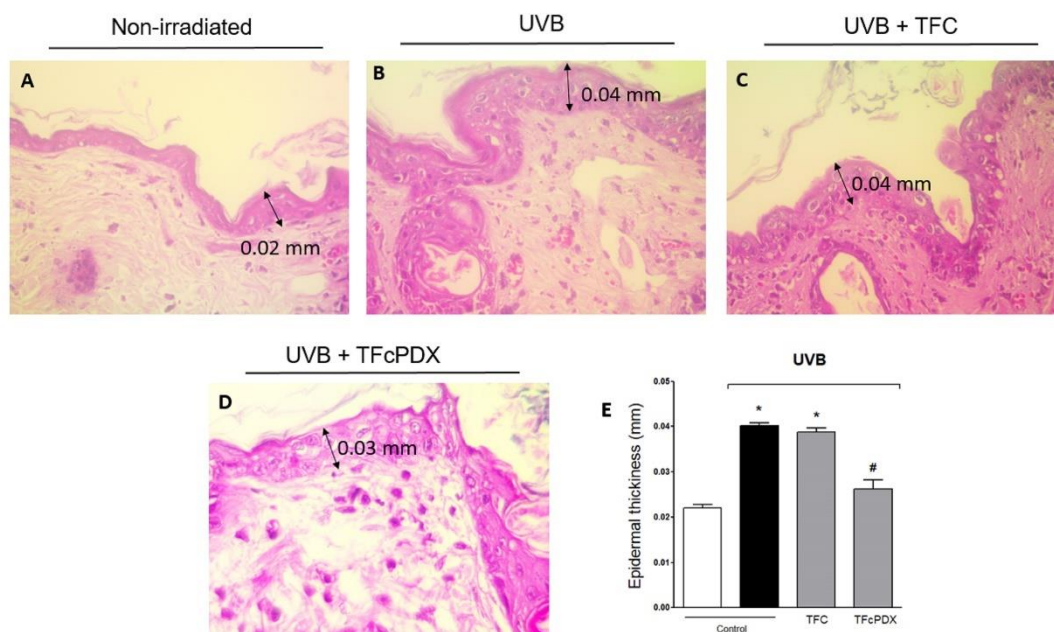
**Figure 2.** TFCPDX reduces UVB irradiation-induced skin edema in hairless mice. Skin edema was determined in samples collected 12 h after the end of irradiation. Bars represent means  $\pm$  SEM of 6 mice per group and are representative of two separated experiments. One-way ANOVA followed by the Tukey's test [ $*p < 0.05$  compared to the non-irradiated control group;  $\#p < 0.05$  compared irradiated control and TFC group].



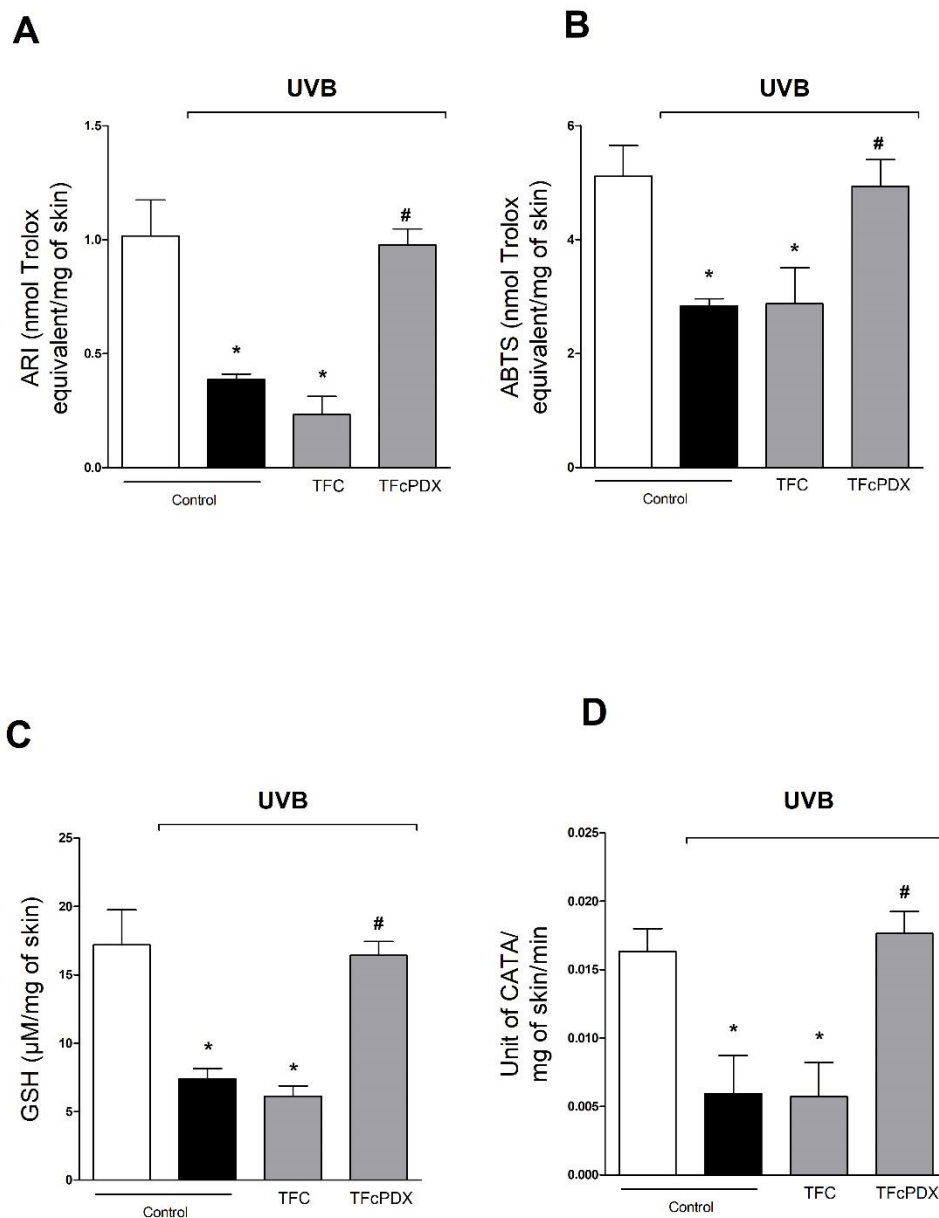
**Figure 3.** TFcPDX inhibits UVB irradiation-induced mast cell counts. Mast cell (brown arrows) counts were evaluated using toluidine blue in skin samples collected 12 h after the end of irradiation (40x magnification). (E) Bars are means  $\pm$  SEM. \* $p$ <0.05 compared to non-irradiated and # $p$ <0.05 compared to irradiated control group and treatment with TFC.



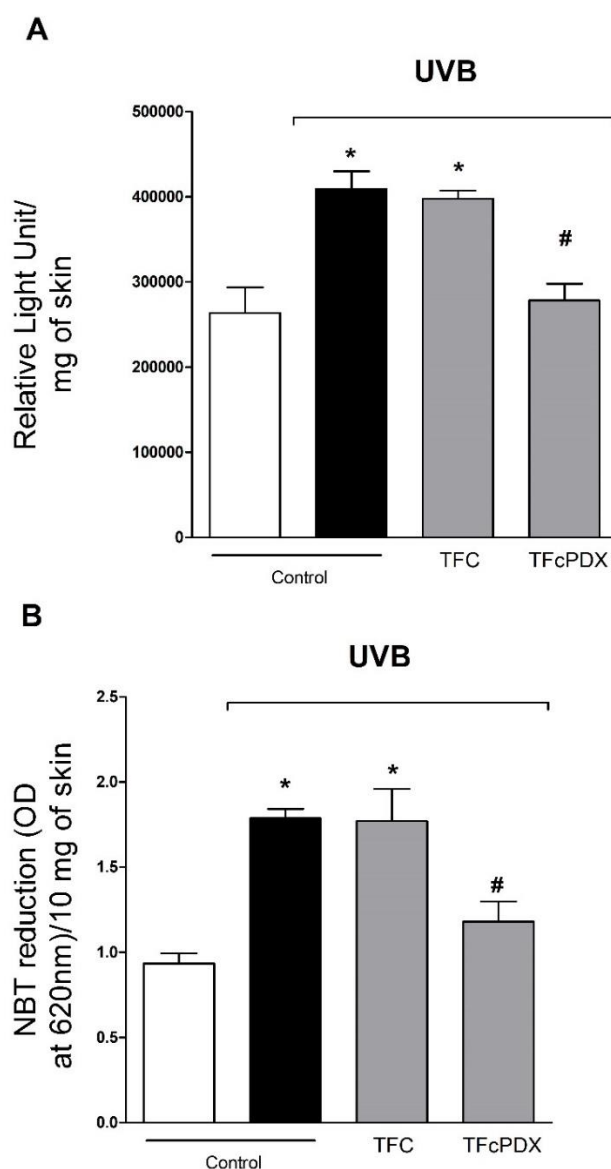
**Figure 4.** TFcPDX diminishes UVB radiation-induced sunburn cell counts. Sunburn cell (white arrows) counts were evaluated using hematoxylin and eosin-stained (100x magnification) slices of skin samples collected 12 h after the end of irradiation. (E) Bars are means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  compared to non-irradiated and #  $p < 0.05$  compared to irradiated control group and treatment with TFC group.



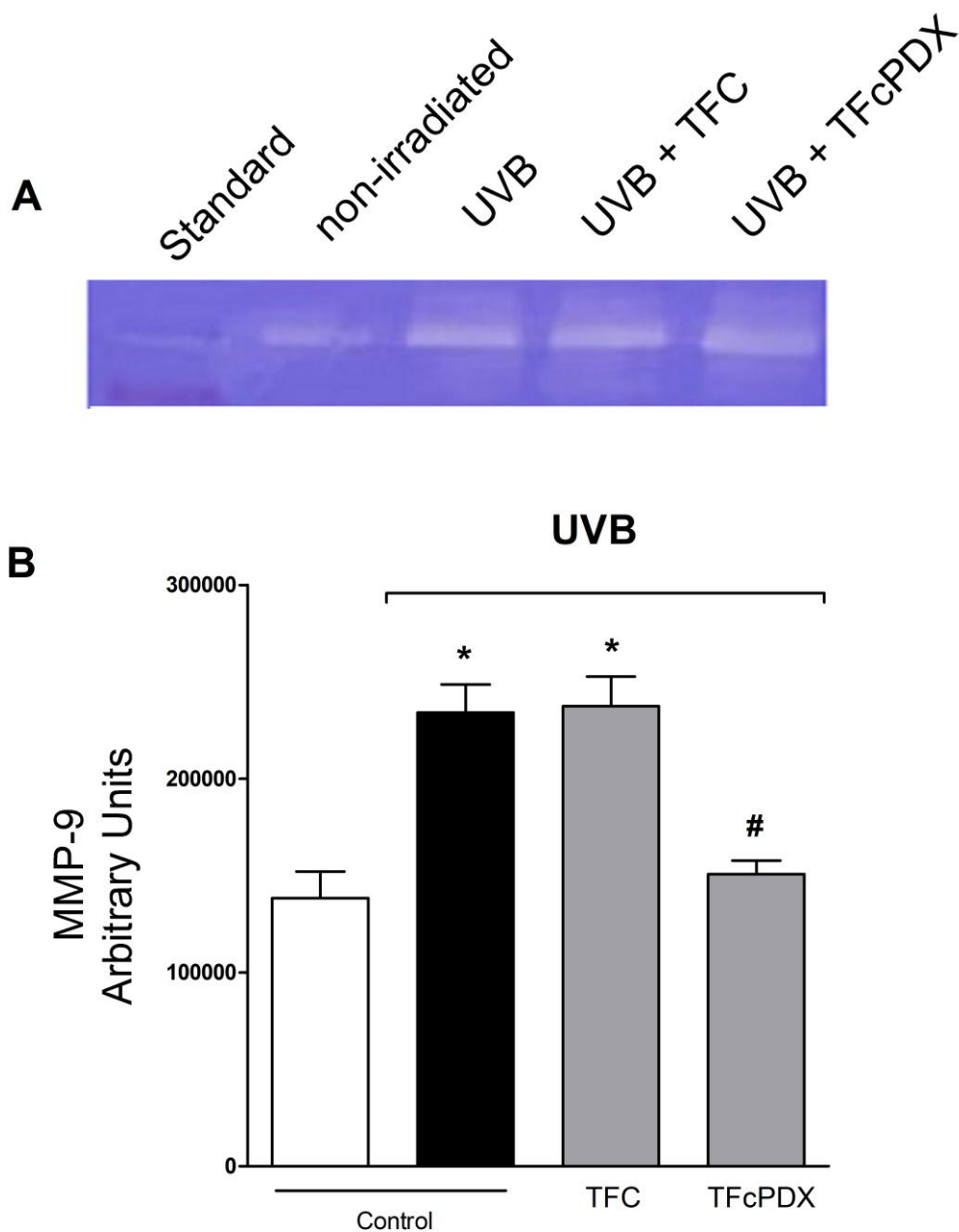
**Figure 5.** TFC-PDX ameliorates UVB irradiation-induced epidermal thickening. Epidermal thickness (double-edge black arrows) was evaluated using hematoxylin and eosin-stained slices of skin samples collected 12 h after the end of irradiation (40x magnification). (E) Bars are means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  compared to non-irradiated control group and # $p < 0.05$  compared to irradiated control group and treatment with TFC.



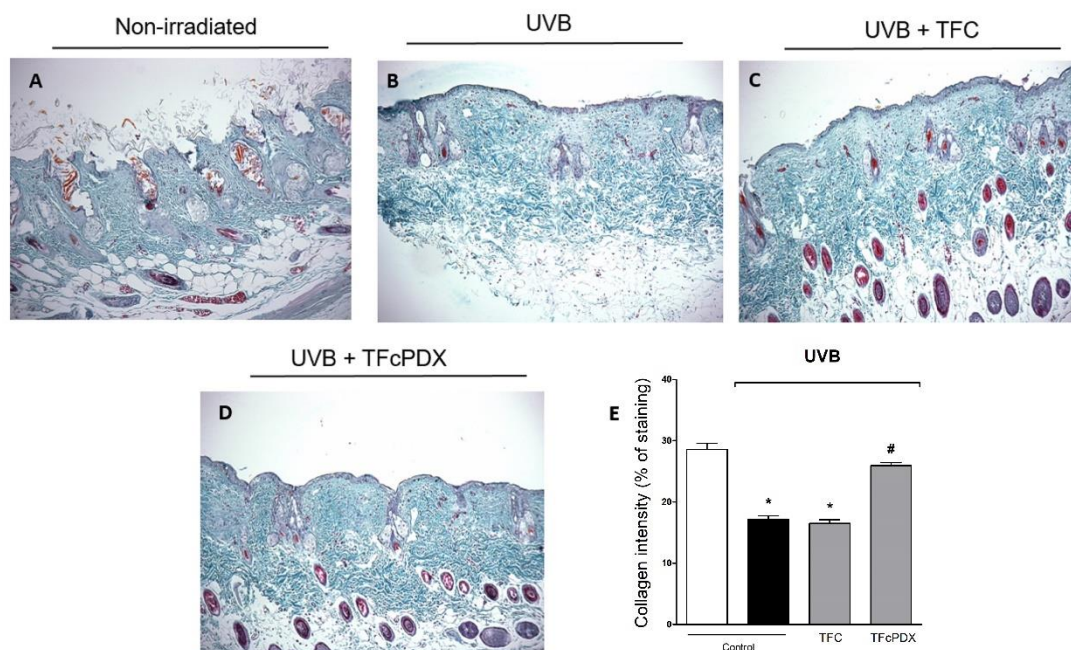
**Figure 6.** TFcPDX inhibits UVB irradiation-induced ARI reduction and ABTS scavenging in hairless mice. The ARI activity (A) and ABTS levels (B) were determined in samples collected 12 h after the end of irradiation. The GSH levels (C) and CATA activity (D) were determined in samples collected 12 h and 2 h after the end of irradiation, respectively. Bars represent means  $\pm$  SEM of 6 mice per group and are representative of two separated experiments. One-way ANOVA followed by the Tukey's test [ $*p < 0.05$  compared to the non-irradiated control group;  $\#p < 0.05$  compared to the respective control and treatment with TFC].



**Figure 7.** TFcPDX inhibits the enhanced production of lipid peroxides (A) and superoxide anion (B). The production of lipid peroxides and nitroblue tetrazolium reduction test were determined in samples collected 2 h after the end of irradiation. Bars represent means  $\pm$  SEM of 6 mice per group and are representative of two separated experiments. One-way ANOVA followed by the Tukey's test [ $*p < 0.05$  compared to the non-irradiated control group;  $\#p < 0.05$  compared to the respective control and treatment with TFC].



**Figure 8.** Effect of TFcPDX on UVB irradiation-induced increase of MMP-9 activity in hairless mice. The MMP-9 activity was determined in samples collected 12 h after the end of irradiation. Image of gelatin zymography and bars represent means  $\pm$  SEM of 6 mice per group and are representative of two separated experiments. Standard features 86kDa. One-way ANOVA followed by the Tukey's test [ $*p < 0.05$  compared to the non-irradiated control group;  $\#p < 0.05$  compared to the respective control and treatment with TFC].



**Figure 9.** Topical formulation containing PDX inhibits UVB irradiation-induced collagen fiber damage. Collagen fiber degradation was evaluated with Masson's trichrome staining in skin samples collected 12 h after the end of irradiation. Collagen fiber intensity and bundles shown in blue were examined by the ImageJ program (10x magnification). \* $p < 0.05$  compared to non-irradiated and # $p < 0.05$  compared to irradiated control group and treatment with TFC.

## References

1. Bikle DD. Protective actions of vitamin D in UVB induced skin cancer. *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2012; 11: 1808. doi: 10.1039/c2pp25251a.
2. Streilein JW, Taylor JR, Vincek V, Kurimoto I, Richardson J, Tie C, Medema J-P, Golomb C. Relationship Between Ultraviolet Radiation-Induced Immunosuppression and Carcinogenesis. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1994; 103: S107–11. doi: 10.1038/jid.1994.19.
3. Vale DL, Martinez RM, Medeiros DC, da Rocha C, Sfeir N, Lopez RFV, Vicentini FTMC, Verri WA, Georgetti SR, Baracat MM, Casagrande R. A topical formulation containing quercetin-loaded microcapsules protects against oxidative and inflammatory skin alterations triggered by UVB irradiation: enhancement of activity by microencapsulation. *J Drug Target* [Internet]. Taylor & Francis; 2021; 29: 983–97. doi: 10.1080/1061186X.2021.1898621.
4. Podda M, Traber MG, Weber C, Yan LJ, Packer L. UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. *Free Radic Biol Med*. 1998; 24: 55–65. doi: 10.1016/S0891-5849(97)00142-1.
5. Vitale N, Kisslinger A, Paladino S, Procaccini C, Matarese G, Pierantoni GM, Mancini FP, Tramontano D. Resveratrol couples apoptosis with autophagy in UVB-irradiated HaCaT cells. *PLoS One*. 2013; 8. doi: 10.1371/journal.pone.0080728.
6. Decean H, Fischer-Fodor E, Tatomir C, Perde-Schrepler M, Somfelean L, Burz C, Hodor T, Orasan R, Virag P. Vitis vinifera seeds extract for the modulation of cytosolic factors Bax- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B involved in UVB-induced oxidative stress and apoptosis of human skin cells. *Med Pharm Reports* [Internet]. 2016; 89: 72–81. doi: 10.15386/cjmed-508.
7. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009; 47: 1304–9. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.035.
8. Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- $\kappa$ B response pathways. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2015; 43: 621–6. doi: 10.1042/BST20150014.
9. Saito P, Melo CPB, Martinez RM, Fattori V, Cezar TLC, Pinto IC, Busmann AJC, Vignoli JA, Georgetti SR, Baracat MM, Verri WA, Casagrande R. The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018; 9: 1–15. doi: 10.3389/fphar.2018.01242.
10. Martinez RM, Pinho-Ribeiro FA, Steffen VS, Caviglione C V., Vignoli JA, Baracat MM, Georgetti SR, Verri WA, Casagrande R. Hesperidin methyl chalcone inhibits oxidative stress and inflammation in a mouse model of ultraviolet B irradiation-induced skin damage. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2015; 148: 145–53. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.03.030.
11. Tan W, Chen L, Wang YX, Hu LS, Xiong W, Shang Y, Yao SL. Protectin DX exhibits protective effects in mouse model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Chin Med J (Engl)*. 2018; 131: 1167–73. doi: 10.4103/0366-6999.227618.

12. Piao S, Du W, Wei Y, Yang Y, Feng X, Bai L. Protectin DX attenuates IL-1 $\beta$ -induced inflammation via the AMPK/NF- $\kappa$ B pathway in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis progression in a rat model. *Int Immunopharmacol* [Internet]. Elsevier; 2020; 78: 106043. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106043.
13. Jung TW, Kyung EJ, Kim H-C, Shin YK, Lee SH, Park ES, Hacımüftüoğlu A, Abd El-Aty AM, Jeong JH. Protectin DX Ameliorates Hepatic Steatosis by Suppression of Endoplasmic Reticulum Stress via AMPK-Induced ORP150 Expression. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2018; 365: 485–93. doi: 10.1124/jpet.117.246686.
14. Liu M, Boussetta T, Makni-Maalej K, Fay M, Driss F, El-Benna J, Lagarde M, Guichardant M. Protectin DX, a double lipoxygenase product of DHA, inhibits both ros production in human neutrophils and cyclooxygenase activities. *Lipids*. 2014; 49: 49–57. doi: 10.1007/s11745-013-3863-6.
15. White PJ, St-Pierre P, Charbonneau A, Mitchell PL, St-Amand E, Marcotte B, Marette A. Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-liver glucoregulatory axis. *Nat Med*. 2014; 20: 664–9. doi: 10.1038/nm.3549.
16. Xia H, Chen L, Liu H, Sun Z, Yang W, Yang Y, Cui S, Li S, Wang Y, Song L, Abdelgawad AF, Shang Y, Yao S. Protectin DX increases survival in a mouse model of sepsis by ameliorating inflammation and modulating macrophage phenotype. *Sci Rep* [Internet]. 2017; 7: 99. doi: 10.1038/s41598-017-00103-0.
17. Hwang H-J, Jung TW, Kim JW, Kim JA, Lee Y Bin, Hong SH, Roh E, Choi KM, Baik SH, Yoo HJ. Protectin DX prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress in vascular endothelial cells via an AMPK-dependent mechanism. *Cell Signal* [Internet]. Elsevier Inc; 2019; 53: 14–21. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.09.011.
18. Melo CPB, Saito P, Vale DL, Rodrigues CCA, Pinto IC, Martinez RM, Bezerra JR, Baracat MM, Verri WA, Fonseca-Bazzo YM, Georgetti SR, Casagrande R. Protective effect of oral treatment with *Cordia verbenacea* extract against UVB irradiation deleterious effects in the skin of hairless mouse. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2021; 216: 112151. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112151.
19. Boller S, Soldi C, Marques MCA, Santos EP, Cabrini DA, Pizzolatti MG, Zampronio AR, Otuki MF. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. *J Ethnopharmacol*. 2010; 130: 262–6. doi: 10.1016/j.jep.2010.05.001.
20. Melo CPB, Saito P, Vale DL, Rodrigues CCA, Pinto IC, Martinez RM, Bezerra JR, Baracat MM, Verri WA, Fonseca-Bazzo YM, Georgetti SR, Casagrande R. Protective effect of oral treatment with *Cordia verbenacea* extract against UVB irradiation deleterious effects in the skin of hairless mouse. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2021; 216: 112151. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112151.
21. Martinez RM, Fattori V, Saito P, Pinto IC, Rodrigues CCA, Melo CPB, Bussmann AJC, Staurengo-Ferrari L, Bezerra JR, Vignoli JA, Baracat MM, Georgetti SR, Verri Jr. WA, et al. The Lipoxin Receptor/FPR2 Agonist BML-111 Protects Mouse Skin Against Ultraviolet B Radiation. *Molecules* [Internet]. 2020; 25: 2953. doi: 10.3390/molecules25122953.
22. Srinivasan P, Sabitha KE, Shyamaladevi CS. Attenuation of 4-Nitroquinoline 1-oxide

- induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols. *Life Sci.* 2007; 80: 1080–6. doi: 10.1016/j.lfs.2006.11.051.
23. Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol.* 2005; 140: 47–52. doi: 10.1016/j.cca.2005.01.005.
  24. Shetty PK, Venuvanka V, Jagani HV, Chethan GH, Ligade VS, Musmade PB, Nayak UY, Reddy MS, Kalthur G, Udupa N, Rao CM, Mutalik S. Development and evaluation of sunscreen creams containing morin-encapsulated nanoparticles for enhanced UV radiation protection and antioxidant activity. *Int J Nanomedicine.* 2015; 10: 6477–91. doi: 10.2147/IJN.S90964.
  25. Cha JW, Piao MJ, Kim KC, Yao CW, Zheng J, Kim SM, Hyun CL, Ahn YS, Hyun JW. The polyphenol chlorogenic acid attenuates UVB-mediated oxidative stress in human HaCaT keratinocytes. *Biomol Ther.* 2014; 22: 136–42. doi: 10.4062/biomolther.2014.006.
  26. Martinez RM, Pinho-Ribeiro FA, Steffen VS, Caviglione C V., Pala D, Baracat MM, Georgetti SR, Verri WA, Casagrande R. Topical formulation containing hesperidin methyl chalcone inhibits skin oxidative stress and inflammation induced by ultraviolet B irradiation. *Photochem Photobiol Sci.* 2016; . doi: 10.1039/c5pp00467e.
  27. Son M, Park J, Oh S, Choi J, Shim M, Kang D, Byun K. Radiofrequency irradiation attenuates angiogenesis and inflammation in UVB-induced rosacea in mouse skin. *Exp Dermatol.* 2020; 29: 659–66. doi: 10.1111/exd.14115.
  28. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature.* 1994; . doi: 10.1038/372773a0.
  29. Perluigi M, Di Domenico F, Blarzino C, Foppoli C, Cini C, Giorgi A, Grillo C, De Marco F, Butterfield DA, Schininà ME, Coccia R. Effects of UVB-induced oxidative stress on protein expression and specific protein oxidation in normal human epithelial keratinocytes: A proteomic approach. *Proteome Sci.* 2010; 8: 1–14. doi: 10.1186/1477-5956-8-13.
  30. Pence BC, Naylor MF. Effects of Single-Dose.Pdf. *Journal of Investigative Dermatology.* 1990.
  31. Bae MJ, Karadeniz F, Ahn BN, Kong CS. Evaluation of effective MMP inhibitors from eight different brown algae in human fibrosarcoma HT1080 cells. *Prev Nutr Food Sci.* 2015; 20: 153–61. doi: 10.3746/pnf.2015.20.3.153.
  32. Singh Malik D, Mital N, Kaur G. Topical drug delivery systems: a patent review. *Expert Opin Ther Pat [Internet].* 2016; 26: 213–28. doi: 10.1517/13543776.2016.1131267.
  33. van Smeden J, Janssens M, Gooris GS, Bouwstra JA. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids [Internet]. Elsevier B.V.;* 2014; 1841: 295–313. doi: 10.1016/j.bbalip.2013.11.006.
  34. Alkilani A, McCrudden MTC, Donnelly R. Transdermal Drug Delivery: Innovative

- Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum. *Pharmaceutics* [Internet]. 2015; 7: 438–70. doi: 10.3390/pharmaceutics7040438.
35. Barry BW. Breaching the skin's barrier to drugs. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2004; 22: 165–7. doi: 10.1038/nbt0204-165.
  36. Marwah H, Garg T, Goyal AK, Rath G. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Deliv* [Internet]. 2016; 23: 564–78. doi: 10.3109/10717544.2014.935532.
  37. Balas L, Guichardant M, Durand T, Lagarde M. Confusion between protectin D1 (PD1) and its isomer protectin DX (PDX). An overview on the dihydroxy-docosatrienes described to date. *Biochimie* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2014; 99: 1–7. doi: 10.1016/j.biochi.2013.11.006.
  38. Saija A, Tomaino A, Trombetta D, Giacchi M, De Pasquale A, Bonina F. Influence of different penetration enhancers on in vitro skin permeation and in vivo photoprotective effect of flavonoids. *Int J Pharm*. 1998; 175: 85–94. doi: 10.1016/S0378-5173(98)00259-2.
  39. Saar BG, Contreras-Rojas LR, Xie XS, Guy RH. Imaging drug delivery to skin with stimulated raman scattering microscopy. *Mol Pharm*. 2011; 8: 969–75. doi: 10.1021/mp200122w.
  40. Zhuo XJ, Hao Y, Cao F, Yan SF, Li H, Wang Q, Cheng BH, Ying BY, Smith FG, Jin SW. Protectin DX increases alveolar fluid clearance in rats with lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Exp Mol Med* [Internet]. Springer US; 2018; 50. doi: 10.1038/s12276-018-0075-4.
  41. Vanden Berghe W, Vermeulen L, Delerive P, De Bosscher K, Staels B, Haegeman G. A Paradigm for Gene Regulation: Inflammation, NF- $\kappa$ B and PPAR. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. 2003. p. 181–96. doi: 10.1007/978-1-4419-9072-3\_22.
  42. Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel M, Trost A, Richter K. Oxidative Stress in Aging Human Skin. *Biomolecules* [Internet]. 2015; 5: 545–89. doi: 10.3390/biom5020545.
  43. Spriggs S, Sheffield D, Olayanju A, Kitteringham NR, Naisbitt DJ, Aleksic M. Effect of Repeated Daily Dosing with 2,4-Dinitrochlorobenzene on Glutathione Biosynthesis and Nrf2 Activation in Reconstructed Human Epidermis. *Toxicol Sci* [Internet]. 2016; 154: 5–15. doi: 10.1093/toxsci/kfw140.
  44. Luo C, Ren H, Wan JB, Yao X, Zhang X, He C, So KF, Kang JX, Pei Z, Su H. Enriched endogenous omega-3 fatty acids in mice protect against global ischemia injury. *J Lipid Res* [Internet]. © 2014 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology.; 2014; 55: 1288–97. doi: 10.1194/jlr.M046466.
  45. Zhao Y, Hu X, Liu Y, Dong S, Wen Z, He W, Zhang S, Huang Q, Shi M. ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. *Mol Cancer* [Internet]. *Molecular Cancer*; 2017; 16: 79. doi: 10.1186/s12943-017-0648-1.
  46. Heidari Y, Shah AM, Gove C. NOX-2S is a new member of the NOX family of NADPH

- oxidases. *Gene* [Internet]. 2004; 335: 133–40. doi: 10.1016/j.gene.2004.03.019.
47. Dai Y, Zhao C, Liang X, Dai R, Dong F. Protectin DX, a double lipoxygenase product from DHA, inhibits the production of both inflammatory cytokines and reactive oxygen species in human retinal pigment epithelium cells. *Eur J Lipid Sci Technol* [Internet]. 2015; 117: 1138–45. doi: 10.1002/ejlt.201400423.
  48. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017; 482: 419–25. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086.
  49. Spite M, Summers L, Porter T, Srivastava S, Bhatnagar A, Serhan C. Resolvin D1 controls inflammation initiated by glutathione-lipid conjugates formed during oxidative stress. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2009; 158: 1062–73. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00234.x.

## 5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Uma fração da radiação ultravioleta chamada de radiação UVB atinge a pele e leva a modificações patológicas. Esta irradiação causa danos ao DNA, proteínas e lipídios e modula a sinalização celular e a expressão gênica. A energia absorvida forma os cromóforos, os quais são altamente reativos e reagem com as estruturas celulares que contenham duplas e triplas ligações entre carbonos. A radiação também ativa a liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativa os receptores de membrana, os quais levam a expressão de genes responsáveis pela produção de fatores transcricionais como NF-kB, Nrf-2, AP-1 e entre outros.

As respostas adaptativas celulares aos danos da radiação UVB incluem interrupção do crescimento, reparo e, quando o dano está além do reparo, apoptose. Somado a isso, a exposição prolongada também induz a formação de espécies reativas de oxigênio e os mecanismos antioxidantes endógenos são consumidos com objetivo de retorno à homeostasia celular. Assim, novas substâncias são estudadas para avaliar seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes e futuramente desenvolver novos medicamentos que atuem em doenças cutâneas relacionadas à radiação ultravioleta. Pesquisas anteriores, descritas neste trabalho, evidenciaram tais efeitos da protectina DX (lipídeo pró-resolução produzido a partir de reações de lipoxigenação a partir do ômega-3) na diminuição do estresse oxidativo e da inflamação em diferentes modelos de estudo. Por isso, neste trabalho foi realizada a investigação do potencial deste lipídio administrado intraperitonealmente e incorporado em formulação tópica em modelo de inflamação e estresse oxidativo estimulado pela radiação UVB.

Foram testadas diferentes concentrações da PDX via intraperitoneal para avaliar a melhor dose-resposta. Os resultados mostraram que 1 ng administrado pela via intraperitoneal antes e após a sessão de irradiação protegeu a pele contra os danos fotooxidativos e inflamatórios. Estes efeitos não foram evidenciados em concentrações menores e no grupo controle não tratado e irradiado. A partir da melhor dose, a PDX foi veiculada em uma emulsão não-iônica e administrada no dorso dos camundongos sem pelo. Os resultados mostraram que este lipídio administrado tanto pela via intraperitoneal como pela via tópica foi capaz de manter os níveis de GSH, a atividade de catalase, além de melhorar a capacidade antioxidante da pele mantendo o poder redutor do ferro e a capacidade em reduzir o radical ABTS. Além disso, a PDX também inibiu a formação de queratinócitos apoptóticos, a degradação de fibras

colágenas, o recrutamento de mastócitos, a atividade de metaloproteinase-9, a produção de hidroperóxidos lipídicos, ânios superóxidos e o edema cutâneo.

Dessa forma, os resultados mostraram que a PDX pode ser usada como novo fármaco na concentração de 2 ng para inibir os danos cutâneos causados pela radiação UVB.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. et al. **Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 8a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

AHN, B. N. et al. Photoprotective effect of libanoridin isolated from *Corydalis heterocarpa* on UVB stressed human keratinocyte cells. **Experimental Dermatology**, v. 22, n. 2, p. 155-157, February 2013.

ANSEL, J. et al. Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. **J Invest Dermatol**, Jun 1990. ISSN 94(6 Suppl):101S-107S.

ARITA, M. et al. Stereochemical assignment, anti-inflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. **J. Exp. Med**, p. 201:713–722, 2005.

AZULAY, R. D. . A. D. R. . A.-A. L. **Dermatologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guabanabara Koogan, 2017. 2-9 p. ISBN 978-85-277-2320-6.

BAE, M. J. et al. Evaluation of Effective MMP Inhibitors from Eight Different Brown Algae in Human Fibrosarcoma HT1080 Cells. **Preventive nutrition and food science**, v. 20, n. 3, p. 153-161, September 2015.

BALAS, L. et al. Confusion between protectin D1 (PD1) and its isomer protectin DX (PDX). An overview on the dihydroxy-docosatrienes described to date. **Biochimie**, p. 99:1-7, Apr 2014.

BALAS, L. et al. Confusion between protectin D1 (PD1) and its isomer protectin DX (PDX). An overview on the dihydroxy-docosatrienes described to date. **Biochimie**, p. 99:1-7, Apr 2014.

BANG, B. et al. In vivo UVB irradiation induces clustering of Fas (CD95) on human epidermal cells. **Exp Dermatol**, p. 12(6):791-8, Dec 2003.

BAZAN, N. G. Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, p. 81(2-3):205-11, Aug-Sep 2009.

BELLEZZA, I.; MIERLA, A. L.; MINELLI, A. Nrf2 and nf-kb and their concerted modulation in cancer pathogenesis and progression. **Cancers (Basel)**, p. 13;2(2):483-97., Apr 2010.

BEYER, T. A. et al. Roles and mechanisms of action of the Nrf2 transcription factor in skin morphogenesis, wound repair and skin cancer. **Cell death and differentiation**, v. 14, n. 7, p. 1250-1254, July 2007.

BLACK, J. O. Xeroderma Pigmentosum. **Head Neck Pathol**, p. 10(2):139-44, Jun 2016.

BRAUN, S. et al. Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. **Mol Cell Biol**, p. 22(15):5492-505, Aug 2002.

CAMPANINI, M. Z. et al. Efficacy of topical formulations containing Pimenta pseudocaryophyllus extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 127, p. 153-160, 2013.

CARINI, M. et al. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **Il Farmaco**, v. 55, n. 8, p. 526-534, August 2000.

CASAGRANDE, R. et al. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 85, p. 21-27, 2006a.

CAYMAN CHEMICAL. **Cayman Chemical**, 2019. Disponível em: <<https://www.caymanchem.com/product/10008128>>. Acesso em: 31 Dec 2021.

CEZAR, T. L. C. et al. Treatment with maresin 1, a docosahexaenoic acid-derived pro-resolution lipid, protects skin from inflammation and oxidative stress caused by UVB irradiation. **Sci Rep**, p. 28;9(1):3062., Feb 2019.

CHA, J. W. et al. The Polyphenol Chlorogenic Acid Attenuates UVB-mediated Oxidative Stress in Human HaCaT Keratinocytes. **Biomolecules & therapeutics**, v. 22, n. 2, p. 136-142, February 2014.

CHANG, H.-R. et al. Expression of nitric oxide synthases in keratinocytes after UVB irradiation. **Arch Dermatol Res**, p. 295(7):293-6, Dec 2003.

CHEN, P. et al. Poxyrins, a class of oxygenated products from polyunsaturated fatty acids, potently inhibit blood platelet aggregation. **FASEB J**, p. 25(1):382-8, Jan 2011.

DAVIS, M. J. et al. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. **mBio**, p. 18;4(3):e00264-13, Jun 2013.

EL-DEIRY, W. S. P21(waf1) mediates cell cycle inhibition, relevant to cancer suppression and therapy. **Cancer research**, p. 76(18):5189-5191, 2016.

FEEHAN, R. P.; SHANTZ, L. M. Molecular signaling cascades involved in nonmelanoma skin carcinogenesis. **Biochem J**, p. 1;473(19):2973-94, Oct 2016.

FERNANDEZ, T. L. et al. In Vitro Investigations on the Effect of Dermal Fibroblasts on Keratinocyte Responses to Ultraviolet B Radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 90, p. 1332-1339, 2014.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **research focus - reviews**, v. 3, n. 12, p. 417-425, December 2000.

FONSECA, F. C. et al. Comparative effects of the  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acid derivatives resolvins E1 and D1 and protectin DX in models of inflammation and pain. **J Inflamm Res**, p. 29;10:119-133, Aug 2017.

FONSECA, Y. M. et al. Evaluation of the Potential of Brazilian Propolis against UV-Induced Oxidative Stress. **Evid Based Complement Alternat Med**, p. 2011:863917, 2011.

GRÖNE, A. Keratinocytes and cytokines. **Vet Immunol Immunopathol**, p. 6;88(1-2):1-12, Sep 2002.

HAINAUT, P.; HOLLSTEIN, M. p53 and Human Cancer: The first ten Thousand mutations. **Advances in Cancer Research**, p. 77:81-86,86a, 87-137., 1999.

HARRIS, C. C. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. **J Natl Cancer Inst**, Oct 1996.

HIRAMOTO, K. et al. Intercellular pathway through hyaluronic acid in UVB-induced inflammation. **Experimental Dermatology**, v. 21, n. 12, p. 911–914, December 2012.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutaciona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, Abril 2008.

HWANG, H.-J. et al. Protectin DX prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress in vascular endothelial cells via an AMPK-dependent mechanism. **Cell Signal.**, p. 53:14-21, Jan 2019.

IRURETAGOYENA, M. et al. Immune Response Modulation by Vitamin D: Role in Systemic Lupus Erythematosus. **Frontiers in immunology.**, v. 6, p. 1-7, October 2015.

ISOBE, Y. et al. Identification and structure determination of novel anti-inflammatory mediator resolvin E3, 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid. **J Biol Chem**, p. 23;287(13):10525-10534, Mar 2012.

IVAN, A. L. M. et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. v. 138C, p. 124-133, 2014.

JUNG, T. W. et al. Protectin DX ameliorates palmitate- or high-fat diet-induced insulin resistance and inflammation through an AMPK-PPAR $\alpha$ -dependent pathway in mice. **Sci Rep**, p. 3;7(1):1397, May 2017.

JUNIOR, W. B.; CHIACCHIO, N. D.; CRIADO, P. R. **Tratado de Dermatologia**. 3a. ed. [S.I.]: Atheneu, 2018.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KATALINIC, V. . M. D. . M. I. . B. M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2V-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and

ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comp Biochem Physiol C**, v. 140, n. 1, p. 47-52, January 2005.

KIM, J. et al. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. **Exp Mol Med**, p. 1;48(4):e224, Apr 2016.

KUMAGAI, C. M. et al. Topical Administration of 15-Deoxy-  $\Delta$  12,14-Prostaglandin J 2 Using a Nonionic Cream: Effect on UVB-Induced Skin Oxidative, Inflammatory, and Histopathological Modifications in Mice. **Mediators Inflamm**, p. 2;2021:9330596, Nov 2021.

KWON, H. et al. Inhibition of UV-induced Matrix Metabolism by a Myristoyl Tetrapeptide. **Cell biology international.**, p. 1-12, October 2015.

LAETHEM, A. V. et al. The sunburn cell: regulation of death and survival of the keratinocyte. **Int J Biochem Cell Biol**, p. 37(8):1547-53, Aug 2005.

LAGARDE, M.; GUICHARDANT, M.; BERNOUD-HUBAC, N. Anti-inflammatory and anti-virus potential of poxytrins, especially protectin DX. **Biochimie**, p. 179:281-284, Dec 2020.

LI, H. et al. Posttreatment with Protectin DX ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and lung dysfunction in mice. **Sci Rep**, p. 3;7:46754, May 2017.

LIM, H. W.; HÖNIGSMANN, H.; HAWK, J. L. M. **Photodermatology**. 1<sup>a</sup>. ed. New York: CRC Press, 2007. 15-27 p. ISBN 978-0849374968.

LIMA, A. I. G. et al. Legum seeds and colorectal cancer revisited: protease inhibitors reduce MMP-9 activity and colon cancer cell migration. **Food Chemistry**, v. 197, p. 30-38, October 2015.

LIU, M. et al. Protectin DX, a double lipoxygenase product of DHA, inhibits both ROS production in human neutrophils and cyclooxygenase activities. **Lipids**, p. 49(1):49-57, Jan 2014.

LORCA, V. A. B.; WU, S. Role of constitutive nitric oxide synthases in the dynamic regulation of the autophagy response of keratinocytes upon UVB exposure. **Photochem Photobiol Sci**, p. 11;19(11):1559-1568, Nov 2020.

MAGNONI, C. et al. Ultraviolet B radiation induces activation of neutral and acidic sphingomyelinases and ceramide generation in cultured normal human keratinocytes. **Toxicol In Vitro**, p. 16(4):349-55, Aug 2002.

MARTINEZ, R. M. et al. Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 7, p. 1647-1655, July 2015.

MELO, C. P. B. et al. Protection against UVB deleterious skin effects in a mouse model: effect of a topical emulsion containing *Cordia verbenacea* extract. **Photochem Photobiol Sci**, p. 20(8):1033-1051, Aug 2021.

MOTOYAMA, A.; KIHARA, K. Mass Spectrometry in Cosmetic Science: Advanced Ionization Techniques for Detecting Trace Molecules in or on Human Skin. **Mass Spectrom**, Tokyo, n. 6(Spec Iss 2):S0071, Sep 2017.

MUKHERJEE, P. K. et al. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. **Proc Natl Acad Sci U S A**, p. 1;101(22):8491-6, Jun 2004.

ONOUE, S. et al. Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. **Journal of Dermatological Science**, v. 33, n. 2, p. 105-111, November 2003.

SHETTY, P. K. et al. Development and evaluation of sunscreen creams containing morin-encapsulated nanoparticles for enhanced UV radiation protection and antioxidant activity. **Int J Nanomedicine**, p. 13;10:6477-91, Oct 2015.

PEDIĆ, L.; PONDELJAK, N.; ŠITUM, M. Recent information on photoaging mechanisms and the preventive role of topical sunscreen products. **Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat**, v. 29(4):201-207, Dec 2020.

PODDA, M. et al. UV-Irradiation Depletes Antioxidants and Causes Oxidative Damage in a Model of Human Skin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 1, p. 55-65, January 1998.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, p. 31(5):986-1000, May 2011.

RYU, Y. S. et al. Particulate matter induces inflammatory cytokine production via activation of NF $\kappa$ B by TLR5-NOX4-ROS signaling in human skin keratinocyte and mouse skin. **Redox Biol**, p. 21:101080, Feb 2019.

SAITO, P. et al. The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice. **Front Pharmacol**, p. 31;9:1242., Oct 2018.

SCHUCH, A. P. et al. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 107, p. 110-124, Jun 2017.

SERHAN, C. N. Novel Pro-Resolving Lipid Mediators in Inflammation Are Leads for Resolution Physiology, p. 5;510(7503):92-101, Jun 2014.

SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature** , p. 5;510(7503):92-101, Jun 2014.

SERHAN, C. N. et al. Novel proresolving aspirin-triggered DHA pathway. **Chem Biol**, p. 26;18(8):976-87, Aug 2011.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; DALLI, J. New Pro-Resolving n-3 Mediators Bridge Resolution of Infectious Inflammation to Tissue Regeneration. **Mol Aspects Med**, v. 64:1-17, Dec 2018.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; DYKE, T. E. V. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nat Rev Immunol**, p. 8(5):349-61, May 2008.

SERHAN, C. N.; PETASIS, N. A. Resolvins and protectins in inflammation resolution. **Chem Rev**, p. 12;111(10):5922-43, Oct 2011.

SHEETS, K. G. et al. Microglial ramification and redistribution concomitant with the attenuation of choroidal neovascularization by neuroprotectin D1. **Mol Vis**, p. 19:1747-59, Aug 2013.

SHETTY, P. et al. Development and evaluation of sunscreen creams containing morin-encapsulated nanoparticles for enhanced UV radiation protection and antioxidant activity. **International Journal of Nanomedicine**, p. 6477 - 6491, outubro 2015.

SHINDO, Y. et al. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. **J Invest Dermatol**, p. 102(4):470-5, Apr 1994.

SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 100, n. 3, p. 260-265, March 1993.

SKOTARCZAK, K. et al. Photoprotection: facts and controversies. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 19(1):98-112., Jan 2015.

SOLIMAN, E.; DROSS, R. V. Anandamide-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis are mediated by oxidative stress in non-melanoma skin cancer: Receptor-independent endocannabinoid signaling. **Mol Carcinog**, p. 55(11):1807-1821, Nov 2016.

SRINIVASAN, P.; SABITHA, K. E.; SHYAMALADEVI, C. S. Attenuation of 4-nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols. **Life Sciences**, v. 80, n. 12, p. 1080-1086, February 2007.

TAN, W. et al. Protectin DX Exhibits Protective Effects in Mouse Model of Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury. **Chin Med J (Engl)**, p. 20;131(10):1167-1173, May 2018.

TERUI, T.; OKUYAMA, T.; TAGAMI, H. Molecular events occurring behind ultraviolet-induced skin inflammation. **Current opinion in allergy and clinical immunology.**, v. 1, n. 5, p. 461-467, October 2001.

TEWARI, A. et al. UVA1 is skin deep: molecular and clinical implications. **Photochem Photobiol Sci**, p. 12(1):95-103, Jan 2013.

TOKUNAGA, E. et al. Understanding the Thalidomide Chirality in Biological Processes by the Self-disproportionation of Enantiomers. **Sci Rep**, p. 20;8(1):17131, Nov 2018.

TRAUTINGER, F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. **Clin Exp Dermatol**, p. 26(7):573-7, Oct 2001.

VENZA, M. et al. Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Action in Melanoma. **Oxid Med Cell Longev**, p. 2015:481782, 2015.

VERRI, W. A. J. et al. Flavonoids as anti-inflammatory and analgesic drugs: mechanisms of action and perspectives in the development of pharmaceutical forms. In: \_\_\_\_\_ **Studies in natural products chemistry**. 1st edn. ed. Amsterdam: Elsevier, 2012. p. 297-330.

VITALE, N. et al. Resveratrol couples apoptosis with autophagy in UVB-irradiated HaCaT cells. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. 1-13, November 2013.

WHITE, P. J. et al. Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-liver glucoregulatory axis. **Nat Med**, p. 20(6):664-9, Jun 2014.

WOLFF, K. et al. **Fitzpatrick Tratado de Dermatologia**. 7<sup>o</sup>. ed. Rio de Janeiro: Revinter LTDA., v. 1, 2011. 60-62 p. ISBN 978-85-372-0342-2.

WRIGHT, H. L. et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology (Oxford)**, p. 49(9):1618-31, Sep 2010.

XIA, H. et al. Protectin DX increases survival in a mouse model of sepsis by ameliorating inflammation and modulating macrophage phenotype. **Sci Rep**, p. 7;7(1):99, Mar 2017.

XU, Y.; FISHER, G. J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **J Dermato Sci Suppl**, v. 1, p. S1-S8, 2005.

YOUNG, A. R. The sunburn cell. **Photodermatol**, p. 4(3):127-34., Jun 1987.

YOUNG, A. R. Chromophores in human skin. **Phys Med Biol**, p. 42(5):789-802, May 1997.

ZHUO, X.-J. et al. Protectin DX increases alveolar fluid clearance in rats with lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Exp Mol Med.**, p. 27;50(4):1-13, Apr 2018.

ZIEGLER, A. et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. **Nature**, p. 22-29;372(6508):773-6, Dec 1994.

ZUL, K. et al. Anticholinesterase and antioxidant investigations of crude extracts, subsequent fractions, saponins and flavonoids of atriplex laciniata L.: potential

effectiveness in Alzheimer's and other neurological disorders. **Biological Research**, v. 48, n. 1, p. 1-11, April 2015.