



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PRISCILA SAITO

RESOLVINA D5 PROTEGE A PELE CONTRA DANOS
INFLAMATÓRIOS E OXIDATIVOS CAUSADOS PELA RADIAÇÃO UVB
EM CAMUNDONGOS SEM PELO

LONDRINA - PR

2021

PRISCILA SAITO

RESOLVINA D5 PROTEGE A PELE CONTRA DANOS
INFLAMATÓRIOS E OXIDATIVOS CAUSADOS PELA RADIAÇÃO UVB
EM CAMUNDONGOS SEM PELO

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rúbia Casagrande

LONDRINA - PR

2021

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

S158r SAITO, PRISCILA.
RESOLVINA D5 PROTEGE A PELE CONTRA DANOS INFLAMATÓRIOS E OXIDATIVOS CAUSADOS PELA RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS SEM PELO / PRISCILA SAITO. - Londrina, 2021.
140 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, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Resolvina D5 - Tese. 2. Inflamação - Tese. 3. Estresse oxidativo - Tese. 4. Mediador lipídico - 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 615

PRISCILA SAITO

**RESOLVINA D5 PROTEGE A PELE CONTRA DANOS
INFLAMATÓRIOS E OXIDATIVOS CAUSADOS PELA
RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS SEM PELO**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Cristina de Paula Barros de Melo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Doumit Camilios Neto
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Profa. Dra. Graziela Scianti Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 22 de dezembro de 2021.

Dedico este trabalho:

A minha família que sempre me apoiou e esteve ao meu lado nesta trajetória, principalmente a minha mãe, Maria Eliza, que me deu todo suporte para que eu pudesse concluir esse doutorado.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Rúbia Casagrande pela sua disponibilidade, orientação, dedicação e paciência. Muito obrigada pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Waldiceu Verri que disponibilizou seu laboratório para término desta obra.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Clóvis, Ingrid e Cris que me auxiliaram em muitos experimentos e sempre tiveram muita alegria e disposição.

Aos colegas de laboratório Camilla, David, Claudia e Isadora agradeço a ajuda e disponibilidade.

Aos companheiros de laboratório Thiago, Camila, Victor e Thacyana que auxiliaram nos experimentos realizados no LAMM.

Ao meu primo, Leandro, por ter me ajudado muito durante todo o doutorado.

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Araucária pela bolsa de estudos.

SAITO, Priscila. Resolvina D5 protege a pele contra danos inflamatórios e oxidativos causados pela radiação UVB em camundongos sem pelo. 2021. p 140. (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

RESUMO

A pele é o maior órgão do corpo humano e a principal barreira de proteção do organismo contra agressores externos. Entre os fatores externos destaca-se a exposição à radiação UVB que é uma das principais causas de danos na pele. A exposição aguda à radiação UVB acarreta uma série de efeitos adversos na pele como edema, queimaduras solares, eritema, inflamação e imunossupressão. Além disso, a exposição crônica pode levar ao envelhecimento precoce e ao desenvolvimento do câncer de pele. Neste contexto, a utilização de mediadores lipídicos anti-inflamatórios/pró-resolução como a resolvina D5 (RvD5) para enriquecer o sistema de proteção endógeno e controlar os processos lesivos induzidos pela radiação UVB tornam-se uma alternativa promissora. As RvD5 de maneira geral inibem a produção de citocinas, o recrutamento de células pró-inflamatórias e induzem o aumento de moléculas antioxidantes. No presente trabalho foram avaliados os efeitos terapêuticos e mecanismos de ação da RvD5, administrada por via intraperitoneal (ip) ou em formulação tópica, nos danos cutâneos inflamatórios e oxidativos induzidos pela radiação UVB em camundongos sem pelo. Os resultados *in vivo* demonstraram que os tratamentos sistêmico (ip) e tópico com RvD5 reduziram a inflamação cutânea e protegeram a pele do estresse oxidativo induzidos pela radiação UVB. A melhora no processo inflamatório foi constatada pela diminuição do edema de pele, do recrutamento de neutrófilos, da atividade/secreção da metaloproteinase-9 e da produção de diferentes citocinas induzidas pela radiação UVB. Houve a diminuição do número de queratinócitos apoptóticos, de mastócitos, do espessamento da epiderme e da degradação das fibras de colágeno. O tratamento com RvD5 também protegeu a pele do estresse oxidativo, por manter a glutatona reduzida e a atividade da catalase em níveis basais, e ainda diminuiu a produção de hidroperóxidos lipídicos e de ânions superóxidos. A RvD5 também foi capaz de aumentar a expressão de RNAm para NADPH: quinona oxidoreductase 1 (NQO1), fator nuclear [derivado eritróide-2] tipo 2 (Nrf2) e heme-oxigenase 1 (OH-1). Esses resultados sugerem o uso do mediador lipídico RvD5 como estratégia promissora para controlar doenças cutâneas causadas pela exposição à radiação UVB.

Palavras chaves: citocinas, pró-resolução, mediador lipídico, catalase

SAITO, Priscila. Resolvin D5 protects to skin against inflammatory and oxidative damage induced by ultraviolet B irradiation in hairless mice. 2021. p 140 (Health Science Thesis) - Londrina State University, Londrina, Parana.

ABSTRACT

The skin is the largest organ of the human body and the organism's main protection barrier against external aggressors. Among the external factors, UVB irradiation is one of the main causes of skin damage. Acute exposure leads to a number of adverse effects, such as edema, sunburn, erythema, inflammation, and immunosuppression. Chronic exposure can lead to premature aging and the development of skin cancer. In this context, the use of anti-inflammatory/pro-resolution lipid mediators such as resolving D5 (RvD5) to enrich the endogenous protection system and thus control the harmful processes induced by UVB irradiation becomes a promising alternative. RvD5, induces the expression of antioxidant molecules and inhibits cytokine production along with the recruitment of pro-inflammatory cells. In the present study, the therapeutic effects and mechanisms of action of intraperitoneal (ip) or topical administration of RvD5 on inflammatory and oxidative skin damage induced by UVB irradiation in hairless mice were evaluated. *In vivo* results demonstrated that both systemic ip treatment and topical treatment reduced skin inflammation and protected the skin from oxidative stress induced by UVB irradiation. Reduction of inflammatory process was evidenced by the decrease of skin edema, neutrophil recruitment, metalloproteinase-9 activity/secretion, and the production of different cytokines induced by UVB irradiation. There was also a decrease in the number of sunburn cells, mast cells, epidermal thickness, and degradation of collagen fibers. Treatment of mice with RvD5 also protected the skin from oxidative stress by maintaining the levels of reduced glutathione (GSH) and catalase activity to basal levels, and even decreased the production of lipid hydroperoxides and superoxide anions. RvD5 was also able to increase mRNA expression for NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1), nuclear factor [2 erythroid-derived] type 2 (Nrf2) and heme oxygenase 1 (OH-1). These results suggest the use of the lipid mediator RvD5 as a promising strategy to control UVB-induced cutaneous diseases.

Keywords: cytokines, pro-resolution, lipid mediator, catalase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Histologia normal da pele.....	17
Figura 2: Espectro eletromagnético de radiação UV e seus efeitos biológicos na pele.....	19
Figura 3: Peroxidação dos lipídeos de membrana.....	30
Figura 4: Resposta inflamatória aguda e seu resultado ideal.....	33
Figura 5: Ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) estão disponíveis nos locais de inflamação aguda.....	34
Figura 6: Estrutura molecular da Resolvína (RvD5).....	35
Figura 7: Fluxograma dos tempos de tratamentos intraperitoneal (ip) e tempos de coleta da pele dos animais de acordo com os protocolos experimentais pré-estabelecidos para avaliação da eficácia da RvD5 administrada via ip.....	43
Figura 8 Fluxograma dos tempos de tratamentos tópicos e tempos de coleta da pele dos animais de acordo com os protocolos experimentais pré-estabelecidos para avaliação da eficácia da formulação tópica contendo RvD5.....	43
Figure 9: Manifestações locais da inflamação aguda.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Componentes da formulação contendo RvD5.....	42
Tabela 2. Constituintes do gel de separação e do gel de concentração.....	46
Tabela 3: Primers utilizados para amplificação dos genes Nrf2, HO-1 e NQO1.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2' azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Ativador de proteína-1
ARE	Elemento de resposta antioxidante
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
DHA	Ácido docosahexaenoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FRAP	Poder antioxidante de redução férrica
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada
GST	Glutathione-S-transferase
H&E	Hematoxilina e eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HO-1	Hemeoxigenase-1
HOCl	Ácido hipocloroso
HTAB	Brometo de hexadecil trietil amônio
IL	Interleucina
Ip	Intraperitoneal
IκB	Fator inibidor de κB
JNK	Quinase c-Jun n-terminal
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico
KCl	Cloreto de potássio

KEAP1	Proteína Kelch 1 associada a ECH
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
KOH	Hidróxido de potássio
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
LPO	Peroxidação lipídica
MAPK	Proteína ativada por mitógeno
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
NF- κ B	Fator nuclear- κ B
NO	Óxido nítrico
NO^\bullet	Radical óxido nítrico
NQO1	NADPH: quinona oxidoreductase 1
Nrf2	Fator nuclear [derivado eritróide-2] tipo 2
O_2	Oxigênio molecular
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Radical superóxido
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
O_3	Ozônio
OH-1	Heme-oxigenase 1
$\bullet\text{HO}$	Radical hidroxil
ONOO^\bullet	Peróxido nitrito
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RUV	Radiação ultravioleta
RvD5	Resolvina D5
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloro acético
TGF- β	Fator de transformação do crescimento
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TRIS	Hidroximetil aminometano
UVB	Radiação ultravioleta B

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. PELE.....	16
1.2. RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.....	17
1.3. RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA RADIAÇÃO UVB	19
1.4. RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO	24
1.5. MEDIADOR LIPÍDICO RVD5	30
2. OBJETIVOS DO TRABALHO	37
2.1. GERAL	37
2.2. ESPECÍFICOS.....	37
3. MATERIAIS.....	38
3.1. REAGENTES.....	38
3.2. EQUIPAMENTOS.....	39
4. MÉTODOS	39
4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	39
4.2. SISTEMA E FONTE DE RADIAÇÃO UVB	39
4.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA RVD5 EM CAMUNDONGOS	40
4.3.1. TRATAMENTO DOS CAMUNDONGOS VIA IP	40
4.3.2. TRATAMENTO DOS ANIMAIS COM FORMULAÇÃO TÓPICA.....	41
4.4. PREPARO DA FORMULAÇÃO TÓPICA	41
4.5. COLETA DAS AMOSTRAS DE PELE.....	42
4.6. AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PELE.....	44
4.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO) ..	45
4.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE/SECREÇÃO DE METALOPROTEINASE-9 (MMP-9)	45

4.9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE GLOBAL DA AMOSTRA PELOS ENSAIOS DE FRAP E ABTS	47
4.10. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DO ANTIOXIDANTE ENDÓGENO GSH....	48
4.11. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CAT	48
4.12. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROPERÓXIDO (LOOH)	49
4.13. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO (O₂^{•-}).....	50
4.14. DOSAGENS DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS: IL-1β E TNF-A E CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS: TGF-β E IL-10.....	50
4.15. EXPRESSÃO DE RNAM PARA NRF2, NQO1 E OH-1 POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) QUANTITATIVA.....	51
4.16. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA POR MICROSCOPIA ÓPTICA	52
4.17. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1. SPECIALIZED PRO-RESOLVING MEDIATOR RESOLVIN D5, PROTECTS SKIN FROM INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS INDUCED BY UVB IRRADIATION	54
5.2 EFFICACY OF TOPICAL FORMULATION CONTAINING RVD5 AGAINST ULTRAVIOLET B IRRADIATION-INDUCED SKIN INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS IN MICE.....	92
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	126
8. REFERÊNCIAS.....	127

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pele

O órgão mais extenso do corpo humano é pele que constitui cerca de 16% da nossa massa corporal (D'ORAZIO et al., 2013). Ela fornece uma barreira física protetora entre o corpo e o meio ambiente, evitando a perda de água e eletrólitos, reduzindo a penetração de produtos químicos e protegendo contra microrganismos patogênicos, além de fazer a manutenção da temperatura corporal e fornecer vigilância imunológica (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005; FONSECA et al., 2011a; KHAVKIN; ELLIS, 2011).

A pele é organizada em três diferentes camadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1). As duas camadas primárias, epiderme e derme, são constituídas por componentes epiteliais, mesenquimais, glandulares e neurovasculares (D'ORAZIO et al., 2013; KHAVKIN; ELLIS, 2011).

A epiderme é a camada mais externa e, portanto, a principal barreira de proteção do corpo contra os estressores ambientais, como patógenos infecciosos, agentes químicos e a radiação ultravioleta (RUV) (D'ORAZIO et al., 2013; KHAVKIN; ELLIS, 2011). As principais células presentes na epiderme são os queratinócitos que representam aproximadamente 95% da sua composição (KHAVKIN; ELLIS, 2011).

Os queratinócitos criam uma barreira física altamente eficaz de proteção da pele, além de acumularem pigmentos de melanina que são eficazes no bloqueio da penetração da RUV na pele. A melanina também está relacionada com funções importantes na pele como a eliminação de radicais livres (D'ORAZIO et al., 2013).

A derme é a camada intermediária da pele, localizada entre a epiderme e a hipoderme. O principal constituinte da derme é o colágeno, uma proteína estrutural fibrilar, que proporciona resistência mecânica a pele (KHAVKIN; ELLIS, 2011). Além disso, a derme abriga estruturas cutâneas, incluindo folículos capilares, nervos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. A derme também é rica em células imunes e fibroblastos, que participam ativamente de muitas respostas fisiológicas da pele (HART et al., 1998).

A hipoderme é a camada mais profunda da pele e fica abaixo da derme. Ela isola o corpo e o protege de lesões mecânicas, além de servir como reserva de fornecimento de energia. As principais células da hipoderme são os adipócitos (KHAVKIN; ELLIS, 2011).

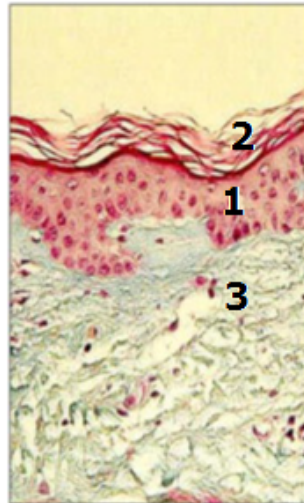


Figura 1: Histologia normal da pele. Camada 1: Epiderme (50 – 150 μm); Camada 2: Estrato córneo (10-15 μm); Camada 3: Derme. Modificado. (MENON; CLEARY; LANE, 2015).

1.2. Radiação ultravioleta

O espectro óptico completo da luz solar abrange: infravermelho, luz visível e radiação ultravioleta (RUV) (DUPONT; GOMEZ; BILODEAU, 2013).

Os fótons UV situam-se entre os comprimentos de onda da luz visível e da radiação gama e podem ser divididos em UVA, UVB e UVC com base nas suas propriedades eletrofísicas. Os fótons UVC têm os comprimentos de onda mais curtos (100-280 nm) e mais alta energia, o UVA o comprimento mais longo (320- 400 nm), mas com fótons menos energéticos e o UVB está entre eles (320-280 nm).

A UVC é a mais energética e lesiva para as células, porém é totalmente filtrada pela camada de ozônio, já a UVA e a UVB são capazes de atravessar a camada de ozônio e causar uma série de efeitos lesivos na pele (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005).

Os raios ultravioletas penetram na pele de maneira dependente do comprimento de onda. O UVA de comprimento de onda mais longo alcança as

camadas mais profundas da pele, principalmente a derme. Em contraste, o UVB é predominantemente absorvido nas camadas mais superficiais da pele, a epiderme, principalmente pelos queratinócitos (FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2014; SAMPLE; HE, 2017; TEWARI et al., 2013).

O espectro da radiação UVB é considerado o mais prejudicial e lesivo da RUV para pele humana (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005; FIGUEIREDO et al., 2014; HUPEL; POUPART; AR GALL, 2011). Diferentemente da radiação UVA que não é absorvida pelo ácido desoxirribonucleico (DNA), a radiação UVB tem como principal consequência os danos diretos no DNA, além dos danos indiretos ocasionados pela produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) e desta forma é mais relevante para a fotocarcinogênese (EMRI; HORKAY; REMENYIK, 2006).

A longo prazo a superexposição à luz solar está associada ao fotoenvelhecimento, imunossupressão e desenvolvimento de câncer de pele e, tanto o fotoenvelhecimento quanto os efeitos indutores do câncer pela RUV, são mediados pela toxicidade direta e indireta da RUV ao DNA (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; PANICH et al., 2016).

A exposição da população à RUV ocorria principalmente por meio da exposição ocupacional à luz solar. Porém, nos últimos anos a exposição recreativa aos raios ultravioleta teve um aumento drástico devido às atividades de lazer ao ar livre e ao bronzamento artificial para fins estéticos (DORÉ; CHIGNOL, 2012; GODAR, 2005).

A RUV é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de câncer de pele. A RUV é um agente mutagênico que atua tanto como iniciador como promotor de tumor (D'ORAZIO et al., 2013) e está epidemiologicamente e molecularmente ligada aos três tipos mais comuns de câncer de pele, carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular e melanoma maligno (D'ORAZIO et al., 2013). Ressalta-se que a forma mais mortal de câncer de pele é o melanoma I (D'ORAZIO et al., 2013).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de pele é o mais prevalente no Brasil e no mundo, e corresponde a 30% de todos os tumores malignos do País (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2022).

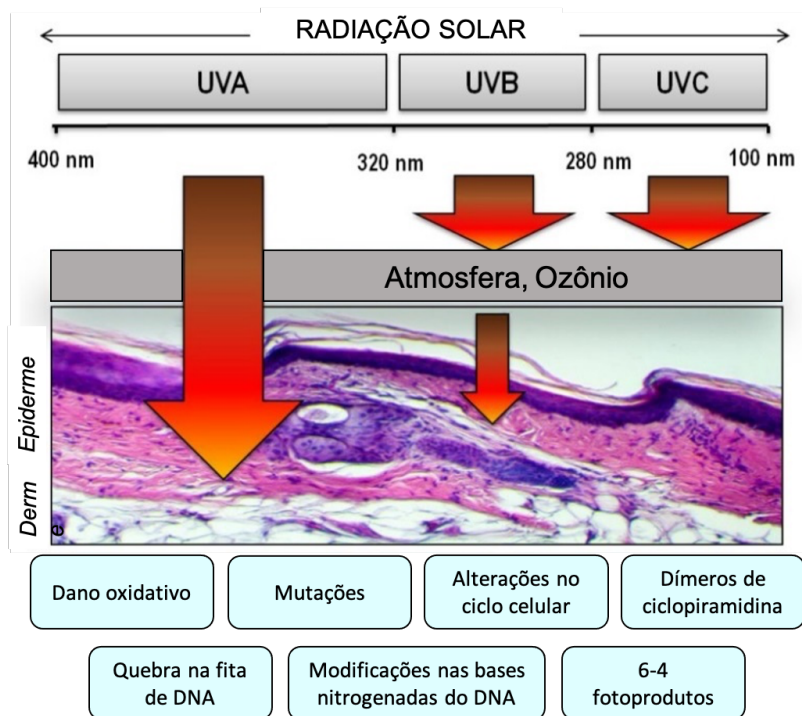


Figura 2: Espectro eletromagnético de radiação UV e efeitos biológicos na pele. Adaptado (D’ORAZIO et al., 2013).

1.3. Resposta inflamatória induzida pela radiação UVB

Abundante no meio ambiente, a radiação ultravioleta contribui para uma variedade de doenças da pele, incluindo inflamação, envelhecimento precoce e câncer (D’ORAZIO et al., 2013).

Dentre os muitos efeitos na fisiologia da pele, a exposição constante a RUV pode acarretar consequências agudas e/ou crônicas. Um dos efeitos agudos causados pela RUV na pele é a indução do processo inflamatório (CLYDESDALE; DANDIE; MULLER, 2001; D’ORAZIO et al., 2013). Eritema e mudanças histológicas como o espessamento da epiderme, edema e infiltração perivascular são sinais que indicam inflamação induzida por UVB (BALUPILLAI et al., 2015).

Os queratinócitos são os primeiros alvos da RUV. Eles desempenham um papel fundamental na resposta inflamatória da pele, sendo responsáveis pela liberação de vários mediadores inflamatórios (FERNANDO et al., 2016; REUTER et al., 2010). A radiação UVB induz uma cascata de citocinas, mediadores

vasoativos e neuroativos na pele que, juntos resultam em uma resposta inflamatória que leva a ocorrência de queimaduras solares (CLYDESDALE; DANDIE; MULLER, 2001; D’ORAZIO et al., 2013).

Ao lesionar as células, a RUV induz vias de respostas aos danos nos queratinócitos. Sinais de danos, ativam a p53, um gene supressor tumoral, que altera a fisiologia dos queratinócitos, mediando a parada do ciclo celular, ativando o reparo de DNA e induzindo a apoptose se o dano for suficientemente grande (COELHO et al., 2009). Os queratinócitos ativam as vias apoptóticas e morrem, quando a dose de UV excede o limiar de resposta ao dano da célula. Esses queratinócitos apoptóticos podem ser identificados por seus núcleos picnóticos e são conhecidos como *sunburn cells* do termo em inglês que pode ser traduzido como “células queimadas pelo sol” (D’ORAZIO et al., 2013). A célula queimada pelo sol é uma marca morfológica da pele superexposta à luz solar. O papel funcional da célula queimada de sol é a remoção rápida de células com danos irreparáveis ao DNA para prevenir sua possível transformação neoplásica (SVOBODOVÁ et al., 2012).

A liberação de citocinas induzida pela radiação UVB é essencial para o recrutamento de células inflamatórias na pele, as quais estimulam a proliferação dos queratinócitos levando ao aumento da espessura epidérmica, processo denominado de hiperqueratose (SCOTT et al., 2012).

Horas após a exposição a RUV, os sinais de resposta ao dano diminuem e os queratinócitos epidérmicos começam a se proliferar de forma intensa mediados por uma variedade de fatores de crescimento epidérmicos. O aumento da divisão celular dos queratinócitos após a exposição aos raios ultravioleta leva ao acúmulo de queratinócitos na epiderme. Essa hiperplasia epidérmica protege melhor a pele contra a penetração de RUV (SCOTT et al., 2012).

No início do processo inflamatório, além dos queratinócitos, células do sistema imunológico também são ativadas e passam a produzir grandes quantidades de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios (DURÁN-ANIOTZ et al., 2013). Esses mediadores inflamatórios promovem a atração de diferentes tipos celulares para epiderme, como os neutrófilos e macrófagos (WITKO-SARSAT et al., 2000).

Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa imunológica e são os primeiros a migrarem para o local da lesão (SEKI et al., 2010). Esses fagócitos

são responsáveis pela produção adicional de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) via ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase 2, chamado de *burst respiratório*. Concomitantemente, ocorre a produção de H_2O_2 , ambos fazem parte do sistema antimicrobiano dependente de oxigênio dos leucócitos fagocíticos (GARCIA et al., 1999; ROBINSON; OHIRA; BADWEY, 2004).

Uma das subunidades da NADPH oxidase é a gp91^{phox}, que catalisa a transferência de elétrons do NADPH para o O_2 e está diretamente envolvida na produção de $O_2^{\cdot-}$ induzida pela radiação UVB. O $O_2^{\cdot-}$ é uma espécie reativa intermediária utilizada como substrato para geração de espécies mais reativas como o radical hidroxil ($\cdot OH$), H_2O_2 , oxigênio singlete (1O_2) e peróxido nitrito ($ONOO^-$) (ANRATHER; RACCHUMI; IADECOLA, 2006; GARCIA et al., 1999; ROBINSON; OHIRA; BADWEY, 2004).

O propósito do *burst* respiratório de fagócitos é gerar compostos microbicidas. Esses compostos fazem parte do mecanismo de defesa contra agentes infecciosos (ANRATHER; RACCHUMI; IADECOLA, 2006; WINROW et al., 1993). Na ausência de um processo infeccioso, como é o caso da inflamação induzida pela exposição a RUV, a presença de neutrófilos representa fonte adicional de EROS que tende a contribuir para a intensificação do dano tecidual e inflamação (CLYDESDALE; DANDIE; MULLER, 2001).

Além disso, a exposição à RUV leva a ativação do fator de transcrição nuclear κB (NF- κB). NF- κB regula a expressão de genes pró-inflamatórios, anti-apoptóticos e a resposta imune modulatória. A ativação desse fator induz a expressão de gp91^{phox} que, por sua vez leva a maior produção radical $O_2^{\cdot-}$ via NADPH oxidase aumentando a produção de EROS, existindo assim um ciclo de feedback positivo importante para o aumento da produção de EROS e ativação do NF- κB (ANRATHER; RACCHUMI; IADECOLA, 2006; WINROW et al., 1993).

A partir da ativação celular dos neutrófilos, ocorre também a liberação de enzimas microbicidas presentes em seus grânulos azurófilos, como a mieloperoxidase (MPO) (WITKO-SARSAT et al., 2000). A MPO utiliza o H_2O_2 formado durante o *burst* respiratório para produzir o ácido hipocloroso, um potente agente citotóxico (ANRATHER; RACCHUMI; IADECOLA, 2006).

Além disso, a MPO interage com outros substratos gerando uma grande variedade de subprodutos. Os oxidantes derivados da MPO também estão

implicados em processos não relacionados à defesa do hospedeiro, como a carcinogênese (LONDON; LEHMAN; TAYLOR, 1997; WITKO-SARSAT et al., 2000). Portanto, a exposição substancial à RUV pode levar a efeitos prejudiciais, como o dano tecidual devido em parte aos mecanismos de vigilância do organismo tentando eliminar as células danificadas através da apoptose e do processo inflamatório (CLYDESDALE; DANDIE; MULLER, 2001).

Neutrófilos, macrófagos, mastócitos, eosinófilos, queratinócitos e células endoteliais podem produzir metaloproteinasas de matriz (MMPs) (SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006), em resposta a múltiplos estímulos, como estresse oxidativo, radiação UV e citocinas (GRADY et al., 2007). As MMPs são enzimas proteolíticas dependentes de zinco responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular (MEC), como o colágeno, a fibronectina, a elastina e os proteoglicanos, contribuindo para o fotoenvelhecimento (KIM et al., 2011; QUAN et al., 2009). Além disso, as MMPs desempenham um papel crucial na fotocarcinogênese, regulando vários processos relacionados à progressão de tumores, incluindo a iniciação do tumor, o crescimento, a angiogênese e a metástase (PITTAYAPRUEK et al., 2016). A exposição cumulativa a radiação UVB induz a geração de EROS em excesso na pele, levando ao aumento da atividade da proteína ativadora (AP) -1 e consequente aumento da expressão de MMPs, especificamente MMP-1, MMP-3 e MMP-9, o que acarreta na degradação contínua das proteínas da matriz extracelular e em uma taxa reduzida de renovação/síntese de colágeno (PITTAYAPRUEK et al., 2016; SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006).

A MMP-9 é uma gelatinase, conhecida como gelatinase B ou colagenase tipo IV, dependente da ativação da AP-1 para ser expressa. É secretada predominantemente por neutrófilos, mastócitos e macrófagos e apresenta atividade proteolítica contra o principal componente da membrana basal, o colágeno tipo IV (BOYD et al., 2008; FORTINO et al., 2007; KIM et al., 2012; ONOUE et al., 2003). A MMP-9 derivada de células inflamatórias desempenha um papel importante no desenvolvimento, crescimento, angiogênese e metástase de tumores. Essa capacidade é atribuída principalmente à clivagem do colágeno tipo IV. Além disso, as gelatinases regulam a atividade de vários fatores de crescimento e citocinas, isso afeta a resposta imune e a angiogênese,

levando à proliferação e manutenção de tumores primários e metastáticos (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2012; PITTAYAPRUEK et al., 2016).

Um dos parâmetros associados ao processo inflamatório induzido pela radiação UVB é o edema de pele. O edema é causado pelo acúmulo de fluido extracelular na pele devido ao excesso de seu extravasamento dos vasos sanguíneos hiperpermeáveis durante o processo inflamatório (AHMAD et al., 2001). A exposição à radiação UV estimula a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) na pele. Sua produção ocorre pela liberação aumentada de ácido araquidônico das membranas celulares. A PGE₂ atua como um promotor no processo de carcinogênese contribuindo para a proliferação descontrolada de células danificadas que podem formar tumores de pele. Essa prostaglandina é responsável por causar edema, vasodilatação, febre e dor inflamatória.

Além dos eventos inflamatórios já descritos acima, a exposição aguda da pele humana a radiação UVB é caracterizada por eritema, hiperpigmentação seguida de bronzeamento tardio e espessamento da epiderme (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005). O bronzeamento tardio é uma reação de defesa da pele à exposição aos raios UVB envolvendo o estímulo da síntese de melanina e tem como principal objetivo reduzir as queimaduras solares. Porém, seu efeito protetor contra o câncer induzido pela RUV é limitado (PANICH et al., 2016).

A RUV é comprovadamente um potente indutor da produção de citocinas. Diferentes trabalhos mostram que a radiação UVB induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 e anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β em modelos *in vivo* (MARTINEZ et al., 2018; SAITO et al., 2018). A IL-1 β e TNF- α participam da indução de EROS, os quais, por sua vez, induzem a produção de mais citocinas. Esse ciclo de EROS e citocinas tende a retroalimentar a produção recíproca, perpetuando assim o processo inflamatório (FUCHS et al., 2001).

Durante o processo inflamatório, são produzidas citocinas pró e anti-inflamatórias e o equilíbrio entre elas determina a magnitude da resposta inflamatória. Para limitar as consequências deletérias no organismo da ação prolongada de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , sua liberação é seguida pela liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-13. Essas citocinas anti-inflamatórias modulam a produção de citocinas pró-inflamatórias e consequentemente a resposta inflamatória (VERRI et al., 2006).

As citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β estão ligadas a ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B (REUTER et al., 2010). O NF- κ B, um fator de transcrição sensível ao equilíbrio redox, é conhecido por desempenhar um papel crítico na patogênese da inflamação induzida por UVB e na carcinogênese. Em geral, o NF- κ B está localizado no citoplasma das células em um estado inativo, ligado à proteína inibitória κ B (I κ B). A radiação UVB ativa marcadores pró-inflamatórios que iniciam uma cascata de sinalização intracelular, resultando na fosforilação e subsequente degradação de I κ B. A degradação de I κ B libera o NF- κ B, permitindo que ele se transloque para o núcleo e promova a transcrição de vários genes inflamatórios (ADHAMI; AFAQ; AHMAD, 2003).

A exposição à RUV também leva a um aumento do recrutamento de mastócitos na pele. Ativados pela radiação UVB, os mastócitos degranulam e liberam histamina. A histamina é a principal amina biogênica dos mastócitos e está relacionada com a imunossupressão sistêmica induzida pela radiação UVB (HART et al., 1998).

1.4. Radicais livres e estresse oxidativo

Os radicais livres podem ser definidos como espécies químicas que possuem um elétron desemparelhado que está sozinho no orbital. A presença de elétrons desemparelhados geralmente confere um alto grau de reatividade a um radical livre. Os radicais livres, importantes para os organismos vivos, são o radical hidroxil (\cdot OH), ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical óxido nítrico (NO^{\cdot}), além do ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), do oxigênio singlete (1O_2), do peroxinitrito ($ONOO^-$) e do ozônio (O_3) que não são radicais livres, pois não possuem elétrons desemparelhados, mas podem facilmente levar a formação de radicais livres em organismos vivos (MACHADO ROCHA RIBEIRO et al., 2005; POLJŠAK; DAHMANE, 2012; VALKO et al., 2004).

As espécies radicalares geradas a partir do oxigênio são denominadas EROS que inclui não apenas os radicais livres, mas também os não radicais (1O_2 , $ONOO^-$, H_2O_2 e O_3). As EROS representam a classe mais importante de classe de radicais livres gerados em sistemas vivos (MACHADO ROCHA RIBEIRO et al., 2005; POLJŠAK; DAHMANE, 2012; VALKO et al., 2004).

Normalmente, as EROS são produzidas endogenamente na célula a partir de vários processos metabólicos, incluindo a respiração celular, que ocorre na mitocôndria, e é a fonte primária de EROS intracelulares. No entanto, estímulos exógenos, como a exposição a RUV, também podem levar ao aumento da produção de EROS. As EROS desempenham um papel duplo como moléculas necessárias e também prejudiciais a célula. Um nível apropriado de EROS é necessário para a função fisiológica normal das células de mamíferos e, portanto, é essencial à vida. EROS produzidos por fagocíticos, por exemplo, atuam como armas para que o sistema imunológico elimine microrganismos patogênicos (PANICH et al., 2016). Entretanto, EROS em quantidades excessivas, levam ao estresse oxidativo. Estresse oxidativo é o termo que se refere ao desequilíbrio entre a geração de EROS e a atividade de defesa antioxidante e que tem potencial capacidade de causar lesões em estruturas celulares (POLJŠAK; DAHMANE, 2012).

A pele contém defesas antioxidantes, que neutralizam as EROS, porém essas defesas ficarão sobrecarregadas se a dose recebida de RUV for muito alta, o que resulta em um desequilíbrio com consequente dano aos componentes celulares, como proteínas, lipídios e DNA (ARUOMA, 1994; KEHRER, 1993). As EROS em excesso desempenham um papel crítico no fotoenvelhecimento da pele humana, além de serem responsáveis por vários tipos de cânceres de pele e outros distúrbios inflamatórios cutâneos (KAWAGUCHI et al., 1996; RECORD et al., 1991).

A exposição constante a RUV leva a oxidação direta do DNA e/ou a geração de radicais livres. Os danos cutâneos diretos causados pela exposição à RUV estão relacionados à absorção dessa radiação por diferentes moléculas presentes na pele (BALOGH; PEDRIALI; KANEKO, 2011; MAVERAKIS et al., 2010).

As moléculas presentes na pele capazes de absorver a RUV são denominadas de cromóforos. A RUV é absorvida por diferentes cromóforos na pele, como melanina, DNA, RNA, proteínas, lipídios, água e aminoácidos aromáticos, como a tirosina e o triptofano. A absorção de fótons UV por esses cromóforos resulta em diferentes reações químicas e interações secundárias envolvendo EROS (BALOGH; PEDRIALI; KANEKO, 2011).

O efeito lesivo direto da RUV ocorre quando o DNA absorve fótons do UVB. Isso resulta em um rearranjo estrutural de nucleotídeos que, em seguida, leva a defeitos na fita de DNA. Dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPD) e pirimidina (6-4) pirimidona (6-4 fotoprodutos, 6-4 PPs) são os principais produtos de danos ao DNA induzidos por UVB (PANICH et al., 2016).

O dano ao DNA induzido pela RUV desempenha um papel fundamental na fase de iniciação do câncer de pele. Quando deixadas sem reparo ou quando as células danificadas não são eliminadas por apoptose, as lesões de DNA expressam suas propriedades mutagênicas, levando à ativação de proto-oncogenes ou à inativação de genes de supressão tumoral. O reparo eficiente do dano ao DNA antes da replicação é um requisito para evitar que a carcinogênese ocorra (CADET; DOUKI, 2018).

CPDs e 6-4 PPs são reparados por meio de um processo conhecido como reparo por excisão de nucleotídeos (NER), principal via no reparo de fotolesões induzidas por UV (SVOBODOVÁ et al., 2012). A falha do NER ou o excesso de sua capacidade de reparo resulta no acúmulo de mutações nas células da pele e é uma etapa importante no desenvolvimento do câncer de pele associado a RUV (PANICH et al., 2016).

A radiação UV também danifica indiretamente o DNA, pela formação de radicais livres. A radiação UVB ao penetrar nas camadas superficiais da pele, gera EROS e espécies reativas de nitrogênio (ERNS). A formação dessas espécies reativas danifica o DNA, causando inflamação e queimaduras solares que conseqüentemente acarretam no envelhecimento precoce da pele e até câncer de pele (PANICH et al., 2016).

A exposição à radiação UVB induz a apoptose de queratinócitos pela indução de vias de sinalização envolvendo a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) incluindo o JNK (quinase c-Jun n-terminal) e p38 quinase (RYU et al., 2010). Os membros da família MAPK são mediadores da transdução de sinal da superfície celular para o núcleo e desempenham um papel importante no desencadeamento e coordenação de respostas genéticas (VAYALIL; ELMENTS; KATIYAR, 2003). A fosforilação dessas proteínas controla as atividades de vários fatores de transcrição implicados na proliferação, diferenciação e promoção de tumores. A ativação do JNK regula a transcrição da AP-1 em resposta a estressores ambientais, como a RUV. O aumento da

atividade da AP-1 tem sido implicado na inflamação, metástase, angiogênese e também na promoção e progressão de vários tipos de cânceres (KATIYAR; MEERAN, 2007). Além disso, a AP-1 também participa da degradação da matriz extracelular dérmica na pele através da expressão da MMP responsáveis pela degradação do colágeno.

A apoptose dos queratinócitos desempenha um papel crítico na regulação do desenvolvimento epidérmico e na restrição da carcinogênese (RAJ; BRASH; GROSSMAN, 2006). Ela equilibra a proliferação de células, mantendo a espessura da epiderme e eliminando células pré-malignas. A apoptose de queratinócitos desencadeada pela exposição a RUV representa um importante mecanismo de defesa contra o câncer, pois elimina queratinócitos com mutações acumuladas ou com outros danos genéticos e/ou oxidativos causados pela exposição à RUV (RAJ; BRASH; GROSSMAN, 2006).

A produção de EROS induzida pela RUV na pele induz ao estresse oxidativo quando sua formação excede a capacidade de defesa antioxidante da pele (GODIC et al., 2014; POLJŠAK; DAHMANE, 2012). Além disso, a RUV causa o esgotamento dos antioxidantes endógenos, aumentando ainda mais o desequilíbrio que causa o estresse oxidativo (DUNAWAY et al., 2018).

Como a pele é o maior órgão e também o mais exposto ao meio ambiente, é imperativo que mecanismos de proteção contra lesões oxidativas estejam localizados na pele (ROBBINS; ZHAO, 2011). As proteções endógenas de nossa pele incluem: a melanina, os antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), por exemplo) e antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular (GSH, vitamina C e E, bilirrubina, ubiquinona e ácido úrico por exemplo) (GODIC et al., 2014; POLJŠAK; DAHMANE, 2012).

A melanina, pigmento produzido pelos melanócitos, é a primeira linha de defesa contra os danos ao DNA na superfície da pele, mas não pode prevenir totalmente os danos à pele. Uma segunda linha de defesa são os processos de reparo, que removem as biomoléculas danificadas antes que elas se acumulem e antes que sua presença resulte em alteração do metabolismo celular (GODIC et al., 2014; POLJŠAK; DAHMANE, 2012). Além dos mecanismos de reparo do DNA, a proteção das células da pele contra o dano ao DNA induzido pela RUV inclui antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (PANICH et al., 2016).

Uma das moléculas antioxidantes endógenas mais importantes é a GSH,

um tripeptídeo hidrofílico que possui grupamentos sulfidril que atua neutralizando os radicais livres por meio da doação de elétrons. Ao doar elétrons a glutatona deixa a forma reduzida e passa a se apresentar na forma oxidada (GSSG), sem ação antioxidante. Na presença de NADPH (doador de elétrons) a enzima glutatona redutase (GR) é capaz de restaurar o GSSG ao seu estado basal, tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutatona. O excesso de glutatona oxidada em relação a reduzida pode indicar a presença de estresse oxidativo (D'ORAZIO et al., 2013; SCHALLREUTER et al., 1999).

A SOD é uma enzima antioxidante responsável por catalisar a quebra do ânion superóxido em oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Muitos estudos têm mostrado que a atividade antioxidante, principalmente da superóxido dismutase de manganês (MnSOD), é reduzida em vários tipos de câncer de pele. Foi evidenciado que atividade da SOD epidérmica está diminuída em queratinócitos hiperproliferativos do carcinoma de células escamosas e epiteloma basocelular (ROBBINS; ZHAO, 2011). O peróxido de hidrogênio formado por atuação da SOD pode ser degradado por outras enzimas, como a CAT e a glutatona peroxidase (GPx). A CAT é uma enzima antioxidante endógena, que catalisa a conversão de H_2O_2 em oxigênio e água, encontrada em concentração elevada na epiderme. A diminuição dos níveis dessa enzima após exposição da pele a RUV representa um potencial dano às macromoléculas celulares, uma vez que o excesso de H_2O_2 pode gerar o radical $\cdot OH$, um poderoso oxidante capaz de produzir danos as todas as bases do DNA (HALLIWELL, 2009). A GPx é uma seleno-enzima que também pode reduzir o peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos (incluindo hidroperóxidos derivados de lipídeos) a água e álcoois na presença de GSH, completando assim a ação da SOD (GIROTTI, 1990).

Estudos demonstram que a diminuição dos níveis da CAT ocorre devido a sua destruição direta pela luz solar e aos efeitos indiretos, sejam mediados por radicais livres ou outras espécies prejudiciais formadas após irradiação UV (SHINDO et al., 1994).

Durante o estresse oxidativo, o sistema de defesa antioxidante é regulado por diferentes moléculas sinalizadoras, dentre as quais se destacam o fator de transcrição Nrf2 (fator nuclear [derivado eritróide-2] tipo 2) e a via do

elemento de resposta antioxidante (ARE), que modulam a expressão de enzimas antioxidantes e desintoxicantes, conhecidas como enzimas de fase II. Nesse grupo de enzimas, incluem-se a heme oxigenase-1 (HO-1), NADPH:quinona oxidoreductase 1 (NQO1) e glutathione-S-transferase (GST), que protegem nosso corpo de oxidantes prejudiciais. O fator de transcrição Nrf2 é regulado negativamente por uma proteína Kelch 1 associada a ECH (Keap-1). Em condições normais, o Nrf2 está no citoplasma formando um complexo inativo com o Keap-1, o que evita a sua migração para o núcleo. No estresse oxidativo, Nrf2 é dissociado do Keap1, migrando para o núcleo e se ligando com ARE, que está localizado na região promotora das enzimas desintoxicantes de fase II (CHOI et al., 2013). Enzimas antioxidantes como a CAT, a GPx e SOD são reguladas pelo Nrf2 (KOBAYASHI; YAMAMOTO, 2005).

Nrf2 é um fator chave para a citoproteção como anticancerígeno, efeito neuroprotetivo e estímulo a resposta anti-inflamatória (KOBAYASHI; YAMAMOTO, 2005). A interrupção Nrf2 aumenta a regulação dos principais fatores de transcrição inflamatória, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9) e aumento da expressão de macrófagos inflamatórios. Nrf2 interfere com vias de sinalização inflamatória inibindo a ativação de NF- κ B através da manutenção do estado redox celular (WANG et al., 2010).

As moléculas de DNA da pele são constantemente “bombardeadas” por EROS provenientes de processos endógenos, bem como de agentes ambientais e de fontes de radiação. O DNA danificado está sendo frequentemente reparado por muitos sistemas de reparo celular. Se a frequência de eventos danosos exceder a capacidade de reparo, o DNA danificado não é reparado a tempo e pode passar para as células-filhas e, assim, desencadear o processo de iniciação e progressão do tumor (POLJŠAK; DAHMANE, 2012).

Além disso, os antioxidantes podem atuar aumentando os sistemas de reparo do DNA por meio de uma regulação gênica pós-transcricional de fatores de transcrição. Os mecanismos de defesa antioxidante celular são, portanto, cruciais para a prevenção ou remoção dos danos causados pelo componente oxidante da RUV (POLJŠAK; DAHMANE, 2012).

O processo oxidativo induzido pela radiação UVB afeta macromoléculas como os lipídios. Os radicais livres em excesso agem sobre a membrana biológica das células e a disponibilidade de ácidos graxos poli-insaturados regula o processo de peroxidação lipídica. O termo peroxidação lipídica (LPO) se refere à degradação oxidativa de fosfolipídeos, colesterol e outros ácidos graxos insaturados na presença de oxigênio. Níveis elevados de peroxidação estão associados a efeitos prejudiciais nos sistemas biológicos, como perda de fluidez, inativação de enzimas de membrana e receptores, além do aumento da permeabilidade de íons, que pode levar à ruptura da membrana (GIROTTI, 1990; KATIYAR; MEERAN, 2007). A LPO leva a uma desorganização da membrana celular com liberação de ácido graxo, como o ácido araquidônico, a partir de fosfolipídeos resultando em níveis aumentados de prostaglandinas que medeiam reações inflamatórias na pele (Figura 3) (HALLIDAY, 2005).

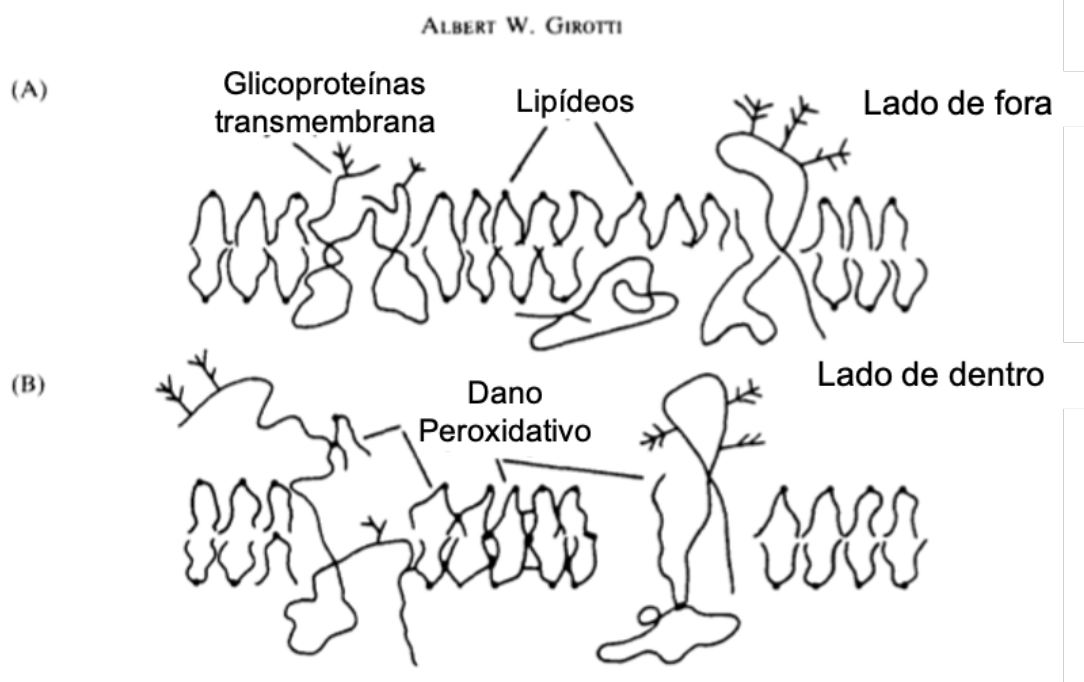


Figura 3: Peroxidação dos lipídeos de membrana. Adaptado (Pillai, S. et all, 2005).

1.5. Mediador lipídico RvD5

O processo inflamatório é a primeira resposta do sistema imunológico à infecção ou lesão tecidual. Tem função protetora e é necessário para garantir a

continuidade da saúde do organismo. No entanto, respostas inflamatórias excessivas ou inadequadas contribuem para uma série de doenças humanas agudas e crônicas (DUVALL; LEVY, 2016; SEKI et al., 2010). A resposta imunológica inicia-se pelo processo inflamatório agudo que pode progredir para o crônico. Para que não haja transição da inflamação aguda para a crônica, são produzidos mediadores lipídicos locais para resolução da inflamação, denominados de mediadores lipídicos pró-resolução, do termo em inglês *specialized pro-resolving mediators* (SPMs). Esses mediadores atuam em conjunto para o reestabelecimento da homeostase do tecido após lesões, controlando a magnitude e a extensão dos eventos inflamatórios (CHIURCHIU et al., 2016).

A fase de resolução da inflamação, antes considerada um evento passivo, agora é conhecida por ser um evento altamente regulado, ativo e complexo que termina a resposta inflamatória assim que a ameaça for contida. Essa fase é orquestrada por SPMs que limitam a resposta imunológica dentro do tecido afetado (SEKI et al., 2010; T. et al., 2017).

O fracasso na resolução da inflamação aguda leva a várias consequências como: inflamação crônica, excesso de dano tecidual, desregulação da cicatrização de tecidos e tem sido implicada em múltiplos tipos de doença, inclusive na patogênese do câncer (SERHAN, 2014; SOMMER; BIRKLEIN, 2011) quando associada ao estresse oxidativo (NISHISGORI, 2015; WANG et al., 1991).

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

Os SPMs são biossintetizados a partir de ácidos graxos poli-insaturados, como o ômega-3. A biossíntese enzimática desses SPMs ocorre em fluidos e órgãos do corpo humano, como sangue periférico, líquido cefalorraquidiano, placenta, fluidos sinoviais, urina, expectoração, baço e nódulos linfáticos (SHANG et al., 2019).

Por meio de ações celulares específicas esses SPMs atuam como potentes reguladores da infiltração de neutrófilos, produção de citocinas e quimiocinas e depuração de neutrófilos apoptóticos por macrófagos, promovendo o retorno à homeostase do tecido (DUVALL; LEVY, 2016).

Os ácidos graxos ômega 3 são conhecidos por serem nutrientes essenciais, mas que não são produzidos por humanos de forma significativa. São encontrados principalmente em óleos de peixe da dieta (DUVALL; LEVY, 2016). Pertencem a família do ômega-3 o ácido docosaexaenoico (DHA) e o ácido eicosapentaenoico (EPA), constituintes significativos da membrana celular e precursores de mediadores lipídicos importantes, como as resolvinas, maresinas e protectinas (DUVALL; LEVY, 2016). Também pertencem a família das SPMs as lipoxinas (LXs) que são metabólitos do ácido araquidônico com reconhecidas atividades anti-inflamatórias e pró-resolução (SERHAN; LEVY, 2018).

A figura 4 ilustra as diferentes etapas da inflamação aguda que envolvem a biossíntese de SPMs e consequente resolução do processo inflamatório.

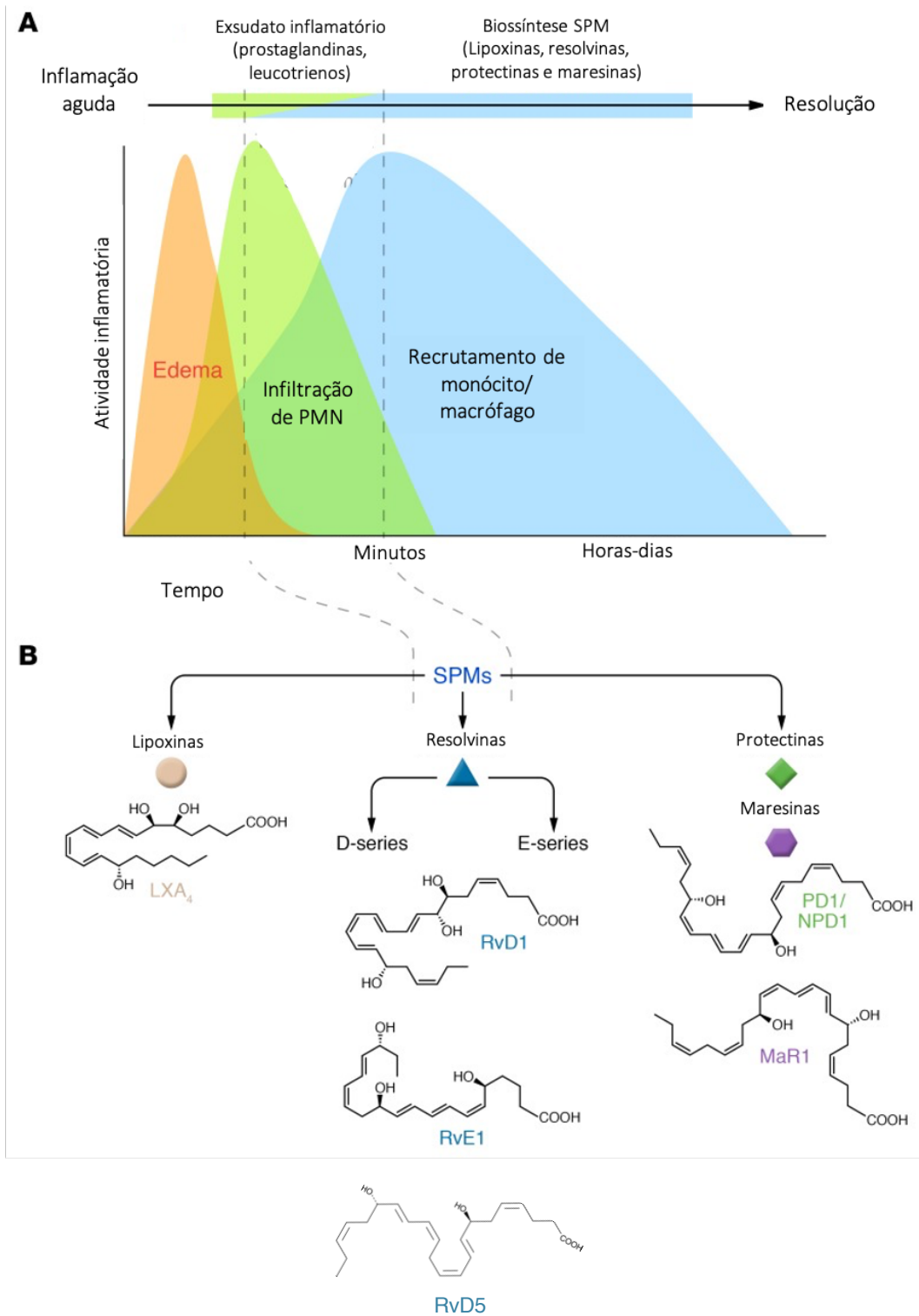


Figura 4: Resposta inflamatória aguda e seu resultado ideal: resolução completa. (A) Biossíntese dos SPMs e início da resolução ativa do processo inflamatório. Etapas definidas no curso de inflamação aguda: edema, infiltração de neutrófilos polimorfonucleares humanos (PMN) e recrutamento de monócitos/macrófagos para exsudatos inflamatórios. A redução no número de

PMN coincide com a biossíntese dos SPMs: lipoxinas, resolvinas (séries E e D), protectinas e maresinas na resolução da inflamação. (B) Cada família de SPMs é estruturalmente distinta e possui potentes ações pró-resolução. Adaptado (SERHAN; LEVY, 2018)

Os ácidos graxos EPA e DHA encontram-se em circulação no plasma e quando há processo inflamatório agudo do tecido, eles se movem para o local da lesão, onde são convertidos enzimaticamente em SPMs para interagir com as células imunes locais (). Além disso, na ativação celular, o DHA e o EPA podem ser rapidamente liberados das membranas celulares por meio da atividade de enzimas secretoras de fosfolipase A2, que hidrolisam os fosfolípidios, para liberar ácidos graxos (DUVALL; LEVY, 2016).

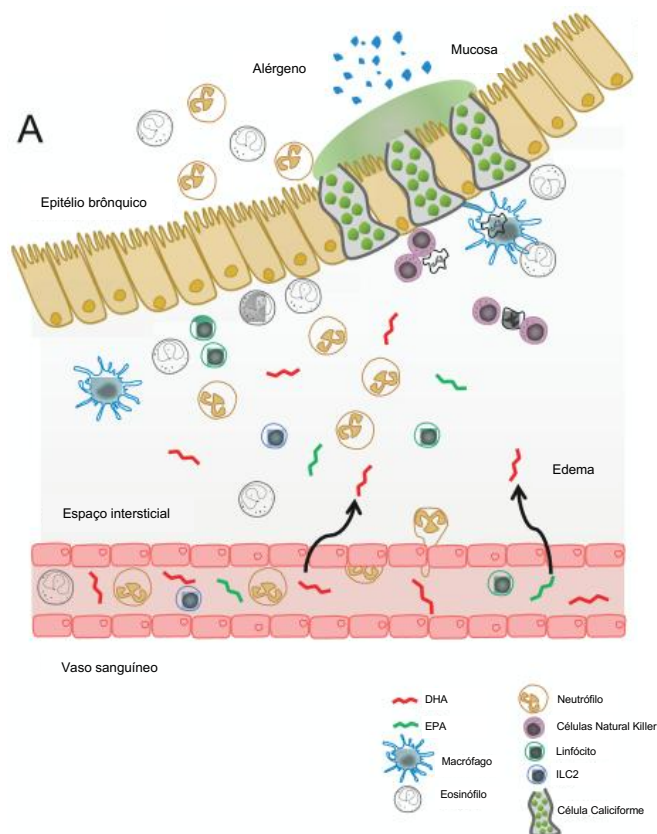


Figura 5: EPA e DHA estão disponíveis nos locais de inflamação aguda. A) Os ácidos graxos ômega-3 EPA e DHA circulam no plasma. Na lesão, eles se movem com edema para os locais de tecido de inflamação aguda, onde são convertidos em SPMs para interagir com as células imunes locais. É mostrado na ilustração a inflamação pulmonar aguda causada pela asma alérgica. Adaptado (DUVALL; LEVY, 2016)

O ácido DHA sofre ação enzimática e origina as resolvinas da série D, as protectinas e as maresinas, já o ácido EPA origina as resolvinas da série E (LI et al., 2020).

As resolvinas da série D podem atuar por diferentes mecanismos anti-inflamatórios. Dentre eles podemos citar a inibição do NF-κB, que regula a expressão do fator de necrose tumoral-α (TNF-α), pela redução significativa da expressão de RNAm para NF-κB ou aumento da expressão da proteína inibidora de NF-κB (I-κb). Outro mecanismo seria a inibição da ativação MAPK pelo bloqueio da fosforilação da p38 MAPK e JNK (LI et al., 2020).

Dentre as resolvinas da série D, podemos enfatizar a RvD5, um mediador lipídico derivado do DHA pela ação da enzima 5-lipooxigenase conhecida por exercer efeitos anti-inflamatórios (CHUN et al., 2020) e foco do nosso trabalho.

A RvD5 faz a contra regulação de genes pró-inflamatórios, incluindo aqueles que codificam NF-κB e TNF-α durante o processo inflamatório, além de aumentar a fagocitose de neutrófilos e macrófagos a agentes infecciosos (SERHAN; LEVY, 2018).

A RvD5 produz suas ações benéficas por meio de receptores específicos acoplados a proteína G, como o GPR32. Além disso, receptores específicos adicionais para RvD5 podem existir em células imunes (por exemplo, macrófagos) que medeiam a redução da dor induzida por processo inflamatório. Notadamente, a RvD5 é uma importante resolvina produzida por macrófagos M2 humanos (LUO et al., 2019; WERZ et al., 2018). Na figura 6 temos a estrutura molecular da RvD5.

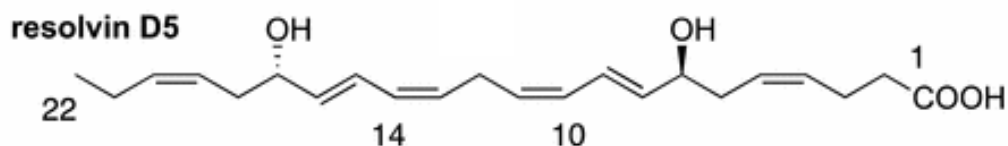


Figura 6: Estrutura molecular da RvD5 (OGAWA et al., 2017)

Estudo realizado por *Chun, et al.* 2019, constatou que a RvD5 é capaz de inibir a produção de mediadores inflamatórios importantes como a interleucina 6

(IL-6) e o ligante 5 de quimiocina (motivo C-C) (CCL5) em células THP-1 humanas. As células THP-1 quando estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS) desencadeiam a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e CCL5) por monócitos e macrófagos pela ativação da MAPK e do NF- κ B. Foi constatado que a fosforilação de proteínas MAPK incluindo ERK, JNK e p38 é aumentada após o tratamento com LPS. No entanto, o tratamento com a RvD5 atenua as respostas inflamatórias ao inibir a fosforilação de ERK/MAPK e consequentemente a produção de IL-6 e CCL5. Além disso, o estudo mostrou que a RvD5 foi capaz de inibir a produção induzida por LPS nas células THP-1 de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6 e enzimas induzíveis como a ciclooxigenase (COX-2) e o óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em monócitos e macrófagos, modulados via ativação do NF- κ B. Também foi verificado que a RvD5 inibiu a ativação induzida por LPS do NF- κ B (CHUN et al., 2020).

Outro estudo realizado por *Ganesan et al.*, 2020 relatou que a RvD5 ativa a fosfolipase D (PLD), uma lipase de membrana que modula as funções dos fagócitos, favorecendo a resolução da inflamação aguda (GANESAN et al., 2020).

Em 2012 *Chiang et al.*, realizaram um estudo em camundongos a fim de identificar o papel do mediador lipídico RvD5 na resolução de processo infeccioso causado por *Escherichia coli*. Constatou-se que a RvD5 acelerou a resolução da infecção, pois aumentou a fagocitose de *E. coli* por neutrófilos polimorfonucleares humanos (PMN) e macrófagos pela ativação do receptor GPR32, além de contra-regular os genes pró-inflamatórios, incluindo NF- κ B e TNF- α (CHIANG et al., 2012).

A RvD5 também atua na regulação da função da barreira epitelial intestinal. Um estudo realizado em camundongos, revelou que a diminuição dos níveis deste mediador durante a artrite inflamatória está ligada ao aumento da permeabilidade da barreira intestinal e inflamação das articulações. O tratamento de camundongos artríticos com RvD5 foi capaz de restaurar a função da barreira intestinal, reduzir o tráfego de leucócitos e limitar a inflamação das articulações. A redução dos níveis de RvD5 na artrite inflamatória ocorreu devido ao aumento do seu metabolismo local (FLAK et al., 2019).

Esses resultados reforçam o potencial benéfico desse mediador no controle da inflamação cutânea. É importante destacar que, apesar do estabelecimento do papel endógeno e efeito anti-inflamatório e pró-resolução em alguns modelos de doença, ainda não existem evidências do papel ou efeito terapêutico da RvD5 na inflamação e estresse oxidativo induzido pela radiação UVB.

Considerando o efeito sinérgico da produção de EROS e de mediadores inflamatórios, a melhora do sistema antioxidante endógeno e a resolução da inflamação tornam-se abordagens promissoras para prevenir e/ou tratar os danos cutâneos induzidos pela radiação UVB (FONSECA et al., 2010). Neste contexto, a avaliação de mediadores lipídicos anti-inflamatórios/pró-resolução para enriquecer o sistema de proteção endógeno e assim controlar os processos lesivos induzidos pela radiação UVB tornam-se uma alternativa interessante, visto que o uso de protetores solares não é totalmente seguro. Estudos demonstraram que os protetores solares podem penetrar na pele e induzir a produção de EROS e o seu uso pode estimular a exposição prolongada ao sol, pois retardam a ocorrência de queimaduras solares (HANSON; GRATTON; BARDEEN, 2006). Estudos epidemiológicos e clínicos confirmaram que o uso de filtros solares para defesa da pele é útil, mas sua proteção não é adequada para prevenir todos os riscos de doenças cutâneas relacionadas ao sol (BALUPILLAI et al., 2015). Isso pode estar relacionado ao uso inadequado, proteção espectral incompleta e à toxicidade dos filtros UV e/ou outros componentes (BALUPILLAI et al., 2015).

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

2.1. Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da RvD5 na inflamação e estresse oxidativo induzidos pela radiação UVB em camundongos sem pelo.

2.2. Específicos

Avaliar a eficácia e mecanismo de ação *in vivo* da RvD5 quando administrada via intraperitoneal (ip) e em formulação de uso tópico na redução do estresse oxidativo e inflamação cutânea induzidos pela radiação UVB com enfoque em:

- Edema de pele;
- Avaliação do poder antioxidante da pele por meio dos ensaios de ABTS (2,2' azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e FRAP (Poder antioxidante de redução férrica);
- Migração do infiltrado leucocitário (ensaio da mieloperoxidase);
- Atividade/secreção de metaloproteinase-9;
- Níveis do antioxidante endógeno GSH e atividade da CAT.
- Produção de hidroperóxidos e de ânion superóxido
- Produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e anti-inflamatórias (TGF- β e IL-10);
- Expressão de RNAm para Nrf2, NQO1 e HO-1 por reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa;
- Avaliação histológica da pele para determinar:
 - Espessura e número de queratinócitos apoptóticos na epiderme
 - Número de mastócitos na derme
 - Densidade das fibras de colágeno da derme.

3. MATERIAIS

3.1. Reagentes

Resolvina D5 foi obtida da Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA). Ácido clorídrico, hidróxido de sódio e fosfato de potássio da Merck (grau analítico, Darmstadt, Hessen, Alemanha); terc-butil hidroperóxido, azul brilhante R, glutathiona reduzida (GSH), brometo de hexadeciltrimetil amônio (HTAB), o-dianisidina, nitroblue tetrazolium (NBT), bisacrilamida foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Hidroximetil aminometano (Tris) da Amresco (Solon, OH, USA). Acrilamida, dodecil sulfato de sódio (SDS). Acrilamida, dodecil sulfato de sódio (SDS), enzima transcriptase reversa (Superscript[®] III), Oligo

(dT)12-18 primers, Platinum SYBRGreen® e primers da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas da eBioscience (San Diego, CA, USA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2. Equipamentos

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

4. MÉTODOS

4.1. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos sem pelo da linhagem HRS/J, do sexo feminino, adultos, pesando em média 25g. Os camundongos foram mantidos no Biotério do Centro de Ciências da Saúde/UEL onde foi utilizado ciclo claro/escuro (12/12 h) com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e livre acesso a água e a ração. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina e os experimentos foram realizados segundo suas normas (registro Of. CIRC. CEUA sob o nº 148/2016, processo nº 11146.2016.97).

4.2. Sistema e fonte de radiação UVB

A fonte de luz utilizada nos experimentos para indução do estresse oxidativo e processo inflamatório agudo nos camundongos foi uma lâmpada UVB fluorescente modelo PHILIPS TL/12 40W RS (MEDICAL-HOLANDA). A lâmpada emite radiação na faixa de λ de 270 a 400nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm. A dose de radiação utilizada para indução da inflamação e do estresse oxidativo foi de 4,14 J/cm² (CAMPANINI et al., 2013). A lâmpada foi instalada em uma caixa retangular de madeira com capacidade para 6 caixas menores, desenvolvida especificamente para esse fim. Os camundongos foram distribuídos nessas caixas menores e sobre eles foi colocada uma tela que restringe a altura da caixa e garante a exposição total do dorso dos animais a luz UV. Durante toda a irradiação foi realizado o rodízio das caixas para assegurar igual dose de irradiação nos animais, pois ocorre variações de emissão de luz ao longo da lâmpada.

4.3. Protocolo experimental de avaliação da eficácia da RvD5 em camundongos

4.3.1. Tratamento dos camundongos via ip

Os animais foram alocados aleatoriamente em seis grupos contendo seis animais cada grupo, sendo:

- Grupo 1: Controle não irradiado e tratado com salina
- Grupo 2: Controle irradiado e tratado com salina
- Grupo 3: Irradiado e tratado com a dose RvD5 0,003 ng/animal
- Grupo 4: Irradiado e tratado com a dose RvD5 0,01 ng/animal
- Grupo 5: Irradiado e tratado com a dose RvD5 0,03 ng/animal
- Grupo 6: Irradiado e tratado com a dose RvD5 0,1 ng/animal

Os animais foram tratados com 200 μ L de diferentes doses de RvD5 (0,003, 0,01, 0,03 e 0,1 ng/animal) via ip, em dois diferentes tempos: 1h antes do início da irradiação e 7h após o início da irradiação (MARTINEZ et al., 2015). Os animais dos grupos controles receberam tratamento apenas com o veículo (salina) utilizado na diluição da droga. As doses de RvD5 usadas nos

tratamentos foram selecionadas com base nos experimentos de dose resposta realizados nesse trabalho.

4.3.2. Tratamento dos animais com formulação tópica

Os animais foram tratados com formulação tópica contendo RvD5 ou tratados com a formulação controle (sem RvD5). As formulações foram aplicadas em todo o dorso dos animais com o auxílio de um pincel, cerca de 0,5g de formulação, 1h antes, 5 min antes da irradiação e 5 min após o fim da irradiação. A concentração de RvD5 utilizada na formulação foi de 0,01ng/0,5g de formulação por tratamento, ao total foram realizados 3 tratamentos. A dose foi escolhida de acordo com os resultados obtidos nos testes preliminares desse estudo, com o tratamento via ip.

Os animais foram alocados aleatoriamente em três grupos contendo seis animais cada grupo, sendo:

- Grupo 1: Controle não irradiado e não tratado
- Grupo 2: Controle irradiado e tratado com a formulação controle (sem RvD5)
- Grupo 3: Irradiado e tratado com a formulação tópica de RvD5 0,01 ng/tratamento

4.4. Preparo da formulação tópica

A comparação entre os resultados obtidos pelo tratamento via ip e tópica dos camundongos é importante para determinar se o tratamento local (via tópica) é tão eficaz quanto o tratamento sistêmico (ip).

As formulações foram preparadas e divididas em duas porções, sendo uma reservada para controle (sem adição da RvD5) e outra acrescida de 0,01ng de RvD5 por 0,5g de formulação.

As porcentagens dos componentes utilizados para o preparo da emulsão constam na Tabela 1. Para o preparo da formulação aqueceu-se separadamente a fase A (lipossolúvel) e a fase B (hidrossolúvel) até a temperatura de 70 °C. Após a fusão dos sólidos e quando as duas fases atingiram a temperatura determinada, verteu-se a fase B sobre a fase A com agitação constante até a

formação de uma emulsão e resfriamento completo. Quando a emulsão atingiu a temperatura ambiente adicionou-se a fase C e D. Após 24 horas do preparo da formulação foi incorporada a RvD5 0,01ng/0,5g de formulação. A formulação foi usada para o tratamento dos animais imediatamente após adição da RvD5

Tabela 1: Componentes da formulação contendo RvD5

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

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

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

³Phenonip[®]: mistura de parabenos e fenoxietanol;

*Quantidade suficiente para preparação.

4.5. Coleta das amostras de pele

Dependendo do teste realizado, os animais foram eutanasiados com 3% de isoflurano e as peles coletadas 12h após o final da irradiação ou anestesiados (3% de isoflurano), decapitados e as peles coletadas 2h e 4h após o final da irradiação.

A coleta da pele dos animais para análise foi realizada em diferentes tempos, de acordo com protocolos experimentais pré-estabelecidos. Para as análises de edema, dosagem de GSH, FRAP, ABTS, MPO, atividade/secreção da MMP-9 e histologia as peles dos animais foram coletadas 12 horas após o fim da irradiação. Já para as análises de atividade da CAT e produção de ânion superóxido (NBT) as peles foram coletadas 2h após o fim da irradiação e para as análises de citocinas, peroxidação lipídica e PCR, 4 horas após a irradiação (Figura 7 e 8) (CAMPANINI et al., 2013; MARTINEZ et al., 2015; SAITO et al., 2018).

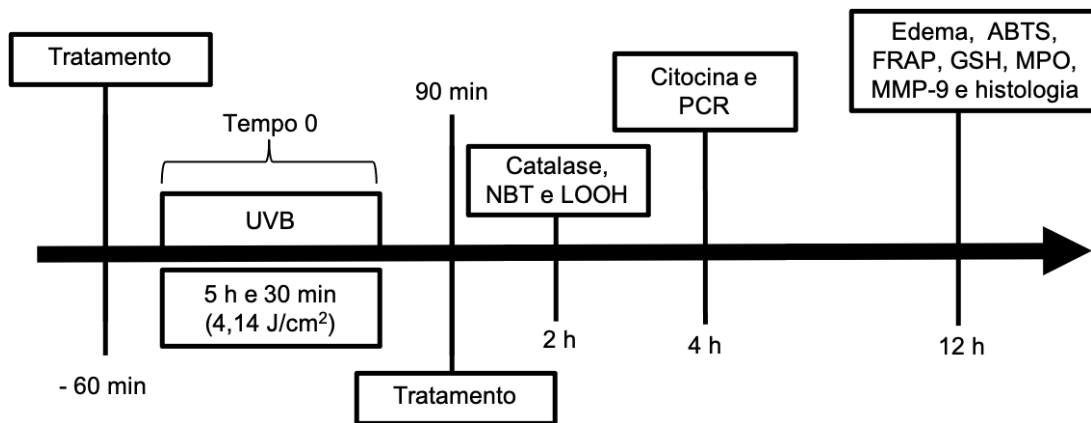


Figura 7: Fluxograma dos tempos de tratamentos ip e tempos de coleta das peles dos animais de acordo com os protocolos experimentais pré-estabelecidos para avaliação da eficácia da RvD5 administrada via ip. Os animais foram submetidos à radiação UVB por um período de 5 horas e 30 min ($4,14 \text{ J/cm}^2$). Nos animais foi realizado um pré-tratamento com RvD5 1h antes e um 7h após início da irradiação (0,003, 0,01, 0,03 e 0,1 ng/animal). Os animais foram eutanasiados e as amostras de pele foram coletadas em diferentes tempos: 2 horas, 4 horas e 12 horas após o fim da irradiação UVB de acordo com o teste a ser realizado.

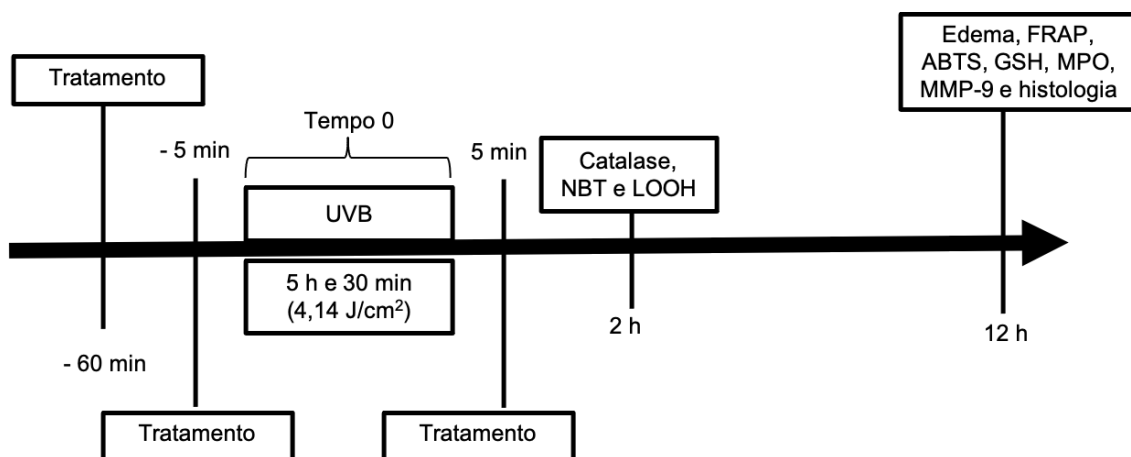


Figura 8: Fluxograma dos tempos de tratamentos tópicos e tempos de coleta das peles dos animais de acordo com os protocolos experimentais pré-estabelecidos para avaliação da eficácia da formulação tópica contendo RvD5. Os animais foram submetidos à radiação UVB por um período de 5 horas e 30

min (4,14. J/cm²). Nos animais foi realizado um pré-tratamento tópico com a formulação contendo 0,01 ng/tratamento de RvD5 1h antes, 5 min antes e 5 min após o fim da irradiação. Os animais foram eutanasiados e as amostras de pele foram coletadas em diferentes tempos: 2 horas e 12 horas após o fim da irradiação UVB de acordo com o teste a ser realizado.

4.6. Avaliação do edema de pele

No processo inflamatório agudo, desencadeado pela exposição à RUV, ocorre a liberação de mediadores químicos que aumentam a permeabilidade do endotélio vascular, levando a formação de edema como resultado do extravasamento de fluidos e proteínas para pele (Figura 9) (DUSTING; MACDONALD, 1995).

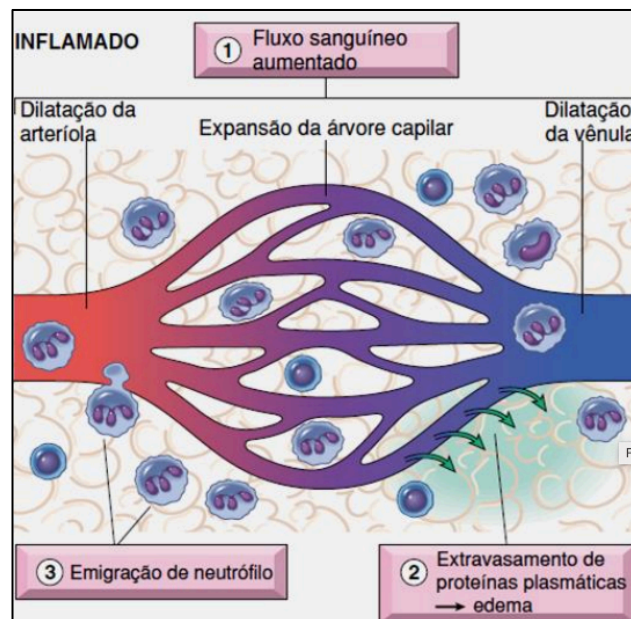


Figure 9: Manifestações locais da inflamação aguda. 1) Vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo (causando eritema e calor). 2) Extravasamento e extravascular deposição de plasma e proteínas. 3) Migração de leucócitos e acumulação no local da lesão. Adaptado Kumar *et al*: Robins & Cotran Pathologic Basis of disease. 8th Edition.

Para avaliação do edema de pele associado ao processo inflamatório foi

feita a coleta das amostras de pele do dorso dos animais com o auxílio de um molde com área fixa (5 mm diâmetro). O edema foi expresso pela variação do peso de pele entre os diferentes grupos controles e tratados (IVAN et al., 2014).

4.7. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Foi realizada a quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) como marcador do infiltrado de leucócitos (monócitos/macrófagos e neutrófilos) na pele após a irradiação UVB (KATIYAR; MEERAN, 2007).

As amostras de pele foram coletadas em tampão fosfato 50mM (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetil amônio (HTAB), homogeneizadas com auxílio do Tissue-Tearor (Biospec 985370) e centrifugadas (16,100 g por 2 min a 4°C). Para realização do ensaio, 30 µL do sobrenadante de cada amostra foram misturados com tampão fosfato 50mM (pH 6,0) contendo 0,167mg/mL de o-dianisidina e 0,015% de peróxido de hidrogênio. A atividade da MPO foi determinada espectrofotometricamente em 450nm (EnSpire, Perkin Elmer). A atividade da MPO das amostras foi obtida através da comparação com a atividade da MPO de uma curva padrão de neutrófilos. Os resultados obtidos foram expressos em números de neutrófilos/mg de pele (CASAGRANDE et al., 2006).

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

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

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

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

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

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

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

O interior da cuba de eletroforese foi preenchido com tampão Tris/glicina 190 mM (pH 8.3) contendo 0,1% de SDS. Antes da aplicação das amostras, o gel foi submetido a uma pré-corrída de 10 mA por 15 minutos. Após, foram aplicados 25 µL de cada amostra. Durante a eletroforese a corrente aplicada foi de 10 mA para o gel de concentração e 13 mA para o gel de separação, sendo

que a última corrente foi mantida constante por 15 minutos após a saída do corante do gel de separação.

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

4.9. Determinação da atividade antioxidante global da amostra pelos ensaios de FRAP e ABTS

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

As amostras de pele dos animais foram homogeneizadas com o triturador Tissue-Tearor, Biospec em 400 µL de KCl (1,15%) e, logo após, centrifugadas a 1.000g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado para a análise. Para o FRAP foram utilizados 30 µL do sobrenadante das amostras e 150 µL do reagente FRAP preparado previamente (2,5 mL de uma solução 10 mM de 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ) em HCl 40 mM, 2,5 mL de FeCl₃.6H₂O 20 mM e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH 3.6) incubada a 37 °C por 30 min). A leitura foi realizada em espectrofotometro a 595 nm.

Soluções padrão com diferentes concentrações de Trolox (0,039 a 40 nmol) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como nmol de equivalente de Trolox/mg de pele (KATALINIC et al., 2005).

Para a reação de ABTS, foi utilizado 7 µL do sobrenadante das amostras e 200 µL de solução de ABTS diluída previamente. A solução de ABTS foi preparada reagindo 7 mM da solução de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. A mistura foi armazenada em frasco âmbar a temperatura ambiente por 16 horas antes do uso. A solução ABTS foi diluída com tampão fosfato (pH

7.4) até atingir uma absorvância de 730nm. A reação foi incubada por 6 min e a leitura das amostras foi também realizada a 730 nm. Soluções padrão com diferentes concentrações de Trolox (0,039 a 40 nmol) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como nmol de equivalente de Trolox/mg de pele

4.10. Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno GSH

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

As amostras de pele (aproximadamente 0,1g) foram diluídas (1:4) em EDTA 0,02M e trituradas utilizando o Tissue-Tearor (Biospec 985370). Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 50% na proporção de 1:0,2 de EDTA e TCA, respectivamente. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 2.700 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e recentrifugado a 2.700 g por mais 15 minutos a 4°C. O sobrenadante final foi retirado para análise. Para o ensaio, foram utilizados 50 µl do sobrenadante da amostra, 100 µl de tampão Tris 0,4 M pH 8,9 e 5µl de uma solução de 1,9 mg/mL de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) em metanol. A absorvância foi determinada em espectrofotômetro (EnSpire, Perkin Elmer) após 5 minutos de incubação, em 405 nm. A curva padrão foi preparada com 0 a 150 µM de GSH. Os resultados foram expressos em µM de GSH/mg de pele (SRINIVASAN; SABITHA; SHYAMALADEVI, 2007).

4.11. Avaliação da atividade da CAT

O método é baseado no decaimento da concentração de H₂O₂ que é diretamente proporcional a diminuição da absorvância a 240 nm. A diferença de absorvância por unidade de tempo é a medida da atividade da CAT (AEBI, 1984).

As amostras de pele dos animais foram homogeneizadas em 500 μ L de EDTA 0,02M utilizando o homogeneizador Tissue-Tearor (Biospec 985370). O homogenato foi centrifugado a 2.700 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante final foi retirado para análise. A determinação da atividade da CAT na pele foi realizada em microplaca por meio da adição de 10 μ l amostra, 160 μ L tampão Tris-HCl 1M com EDTA 5 mM pH 8,0, 20 μ L água deionizada e 20 μ L H₂O₂ 200 mM. Foi incluído um branco para cada amostra preparado com 10 μ L do sobrenadante da amostra, 180 μ L de tampão Tris-HCl 1M com EDTA 5 mM pH 8,0 e 20 μ L de água deionizada. A velocidade com que o H₂O₂ é reduzido pela ação da CAT foi avaliada através da diminuição no valor da absorbância pela diferença entre a leitura inicial e a leitura 30 segundos após a adição do H₂O₂ 200 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (EnSpire, Perkin Elmer) a 240 nm com temperatura mantida em 25 °C. Os valores de catalase foram expressos como unidade de catalase/mg de pele/minuto (AEBI, 1984).

4.12. Avaliação da produção de hidroperóxido (LOOH)

A peroxidação lipídica é uma das expressões orgânicas mais importantes do estresse oxidativo (YAGI, 1987). A oxidação dos lipídeos foi mensurada a partir da formação de hidroperóxidos que são os produtos primários na peroxidação lipídica (LINGNERT; VALLENTIN; ERIKSSON, 1979).

A produção de hidroperóxido foi avaliada por método de quimiluminescência descrito anteriormente (MARTINEZ et al., 2015). O método é baseado na determinação de quimioluminescência iniciada pelo tert-butil hidroperóxido (GONZALEZ FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991).

As amostras de pele dos animais foram homogeneizadas em 800 μ L de tampão fosfato (pH 7,4) com auxílio do Tissue-Tearor (Biospec 985370). Em seguida, foram centrifugadas a 700 g por 2 minutos a 4 °C. Para o ensaio, 250 μ L do sobrenadante foram adicionados a 1730 μ L de meio de reação (KCl 120mM, tampão fosfato pH 7,4 30 mM) e 20 μ L de tert-butil hidroperóxido 3 mM. Este ensaio foi realizado em contador β marca Beckman® LS 6000 (FULLERTON, CA, EUA) em uma faixa de contagem não coincidente com a resposta entre 300 e 620 nm. Todo o experimento foi realizado ao abrigo da luz

para evitar a fosforescência dos frascos, a 30 °C, durante 120 minutos. Os resultados foram medidos em contagem por minuto (cpm) por mg de pele.

4.13. Avaliação da produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

A produção de ânion superóxido é aumentada após a exposição a radiação UVB (YASUI et al., 2006). A dosagem de ânion superóxido foi realizada através do ensaio de redução do *nitroblue tetrazolium* (NBT) (SAITO et al., 2018). As amostras de pele foram homogeneizadas com o Tissue-Tearor (Biospec 985370) em EDTA 0,02 M e centrifugadas (2000 g por 20 segundos a 4°C). Para a reação, o sobrenadante (50 µL) foi incubado em microplacas por 1 hora. Em seguida, o sobrenadante foi removido e adicionado NBT (1mg/mL) as células fixadas. Após 15 minutos, o NBT foi cuidadosamente removido e ao precipitado foram adicionados 20 µL de metanol 100% para fixar. O composto formado pela redução do NBT (formazan) foi solubilizado com 120 µL de KOH 2M e 140 µL de dimetilsufóxido (DMSO). A redução do NBT para formazan foi medida em espectrofotômetro de microplacas (EnSpire, Perkin Elmer) a 620 nm e os resultados foram apresentados como densidade óptica (OD)/10 mg de pele (CAMPANINI et al., 2013).

4.14. Dosagens das citocinas pró-inflamatórias: IL-1 β e TNF- α e citocinas anti-inflamatórias: TGF- β e IL-10

As amostras de pele foram homogeneizadas em salina (500 µL) com o Tissue-Tearor (Biospec 985370) e centrifugadas a 2000 g por 15 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram utilizados para quantificação das citocinas IL-1 β , TNF- α , TGF- β e IL-10 através da técnica de enzimaensaio (ELISA) do tipo sanduíche com diferentes kits comerciais disponíveis de acordo com as instruções de uso do fabricante. Os resultados foram obtidos comparando as densidades ópticas em 490 nm das amostras com as densidades das respectivas curvas padrões das citocinas (VERRI et al., 2008).

4.15. Expressão de RNAm para Nrf2, NQO1 e OH-1 por reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa

As amostras de pele foram coletadas em reagente trizol e homogeneizadas para a extração do RNA total. O RNA total foi transcrito por ação da enzima transcriptase reversa, e o DNAc obtido foi usado para amplificação específica do RNAm de interesse. A expressão quantitativa de RNAm para Nrf2, NQO1 e OH-1 foi analisada por meio de reações de PCR em tempo real, em que foram utilizados o reagente SYBRGreen Master Mix (o qual contém fluoróforo SYBRGreen; enzima DNA polimerase; DNTPs e fluoróforo ROX), a solução de DNAc, água MiliQ tratada com *dietilpirocarbonato* e uma solução contendo cada primer. O sistema utilizado realiza as reações de amplificação e detecção, e quantifica as amostras no termociclador ABI5700 (APPLIED BIOSYSTEMS, WARRINGTON, REINO UNIDO) por meio da análise do nível de fluorescência gerado pela incorporação de nucleases fluorogênicas (SYBRGreen) aos produtos de amplificação durante o curso da reação. A transcrição reversa de RNA total para cDNA e qPCR foi realizada usando GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, WI, EUA) em um sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A expressão gênica relativa foi determinada usando o método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, e a expressão do mRNA GAPDH foi usada como referência para integridade tecidual em todas as amostras. Os resultados foram analisados com base no valor do limiar do ciclo, onde a amplificação das amostras atinge um limiar que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado (VERRI et al., 2008). Abaixo a sequência do sense e anti-sense dos primers utilizados (Tabela 3):

Tabela 3: Primers utilizados para amplificação dos genes Nrf2, HO-1 e NQO1

Gene	Primer	Sequência 5' → 3'
Nrf2	Nrf2-sense	5' TCACACGAGATGAGCTTAGGGCAA-3'
	Nrf2-antisense	5'- TACAGTTCTGGGCGGCGACTTTAT-3'
HO-1	HO-1-sense	5'- CCCAAAACCTGGCCTGTAAAA-3'
	HO-1-antisense	5'-CGTGGTCAGTCAACATGGAT 3'
NQO1	NQO1-sense	5'- TGGCCGAACACAAGAAGCTG-3'
	NQO1-antisense	5'-GCTACGAGCACTCTCTCAAACC-3'

4.16. Avaliação histopatológica por microscopia óptica

Para análise histopatológica, as amostras de pele do dorso dos animais foram coletadas 12 horas após irradiação e armazenadas em formol 10%. Subsequentemente, as amostras de pele foram fixadas em paraformaldeído 4% e desidratadas em banhos de soluções de etanol em concentrações crescentes (70%, 95% e 100%). Em seguida, foram diafanizadas com xilol e incluídas em parafina. Foram preparadas secções de 5 µm que foram coradas com hematoxilina eosina (H&E), azul toluidina e tricrômico de masson.

As secções coradas com H&E foram examinadas utilizando microscopia óptica a uma ampliação de 400 vezes (objetiva de 40) para determinação da espessura epidérmica (DENG et al., 2015) e uma amplificação de 1000 vezes (objetiva de 100) para contagem do número de queratinócitos apoptóticos (SCHWARZ et al., 1995). Para contagem de mastócitos, as secções foram coradas com azul de toluidina e a análise feita em microscopia óptica a uma ampliação de 400 vezes (objetiva de 40). As análises foram feitas com o software Infinity Analyze (Lumenera® Software). Já as secções coradas com tricrômico de masson foram examinadas utilizando microscopia óptica a uma ampliação de 100 vezes (objetiva de 10) para visualizar alterações nas fibras de colágeno através da análise da intensidade da coloração azul nas áreas dérmicas da pele exposta a radiação UVB com auxílio do software Image J (NIH) (SONG et al., 2016).

4.17. Análise estatística dos resultados

Os resultados foram analisados por análise de variância 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 e representativos de 2 experimentos separados. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SPECIALIZED PRO-RESOLVING MEDIATOR RESOLVIN D5, PROTECTS SKIN FROM INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS INDUCED BY UVB IRRADIATION

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

Priscila Saito^a, Ingrid Caroline Pinto^a, Clóvis Miroru Kumagai^a, Camilla Carolina Arriero Rodrigues^a, Ricardo Luís Nascimento de Matos^a, David Laios do Vale^a, Cristina de Paula Barros de Melo^a, Ana P. F. R. L. Bracarense^b, Marcela M. Baracat^a, Sandra R. Georgetti^a, Waldiceu Aparecido Verri Jr^c, Rúbia Casagrande^{*a}

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

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

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

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

Highlights

- RvD5 protects the skin from the harmful effects of UVB irradiation.
- RvD5 inhibits UVB-induced skin edema
- RvD5 suppress the secretion of MMP-9 and collagen degradation induced by UVB-irradiation.
- RvD5 inhibits UVB-induced sunburn cells and mast cells counts
- RvD5 inhibits UVB-induced skin oxidative stress
- RvD5 reduces UVB-induced production of a wide range of cytokines.

ABTS 2,2-azinobis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

ANOVA one-way analysis of variance

CAT catalase

COX-2 cyclooxygenase

DHA docosahexaenoic acid

DHA docosahexaenoic acid

DTNB 5,5' - dithiobis(2 - nitrobenzoic acid)

ECM extracellular matrix

FRAP ferric reducing antioxidant power assay

GSH reduced glutathione

H₂O₂ hydrogen peroxide

HTAB hexadecyltrimethylammonium bromide

IL interleucin

iNOS nitric oxide synthase

IP intraperitoneally

KCl potassium chloride

KOH potassium hydroxide

LOOH	lipid hydroperoxides
LPO	lipid peroxidation
MMP	matrix metalloproteinase
MPO	myeloperoxidase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBT	nitroblue tetrazolium
NF-κB	nuclear factor-κB
NOX2	NADPH oxidase 2
NQO-1	NAD(P)H quinone dehydrogenase 1
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
O ₂ ^{•-}	superoxide anion
QL	chemiluminescence
ROS	reactive oxygen species
RvD5	resolvin D5
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error mean
SOD	superoxide dismutase
SPMs	specialized pro-resolving mediators
TGF - β	transforming growth factor <i>beta</i>
TNF - α	tumor necrosis factor - α
UV	ultraviolet
ABTS	2,2-azinobis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

DTNB	5,5' - dithiobis(2 - nitrobenzoic acid)
CAT	catalase
QL	chemiluminescence
COX-2	cyclooxygenase
DHA	docosahexaenoic acid
DHA	docosahexaenoic acid
FRAP	ferric reducing antioxidant power assay
HTAB	hexadecyltrimethylammonium bromide
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
IL	interleucin
IP	intraperitoneally
LOOH	lipid hydroperoxides
LPO	lipid peroxidation
MMP	matrix metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
MPO	myeloperoxidase
NQO-1	NAD(P)H quinone dehydrogenase 1
NOX ₂	NADPH oxidase 2
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
iNOS	nitric oxide synthase
NBT	nitroblue tetrazolium
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NF-κB	nuclear factor-κB

ANOVA	one-way analysis of variance
KCl	potassium chloride
KOH	potassium hydroxide
ROS	reactive oxygen species
GSH	reduced glutathione
RvD5	resolvin D5
SDS	sodium dodecyl sulfate
SPMs	specialized pro-resolving mediators
SEM	standard error mean
O ₂ ^{•-}	superoxide anion
SOD	superoxide dismutase
TGF - β	transforming growth factor <i>beta</i>
TNF - α	tumor necrosis factor - α
UV	ultraviolet

Abstract:

Exposure to ultraviolet (UV) irradiation may cause inflammation, premature aging, and skin cancer. Resolvin D5 (RvD5) is a lipid mediator that has been reported with anti-inflammatory and antioxidant properties. However, its effects and mechanisms on UVB irradiation-induced inflammation and oxidative stress, which are the aim of this study, are still unknown. The intraperitoneal treatment with RvD5 (0.03 ng/mouse) reduced UVB-induced skin edema, matrix metalloproteinase 9 activity (MMP-9), and glutathione (GSH) depletion. In addition, RvD5 inhibited UVB-induced hydroperoxide formation and superoxide anion production. RvD5 also increased the Nrf2 and its downstream targets NQO1 and HO-1 mRNA expression. Regarding cytokines, RvD5 inhibited UVB-induced production of IL-1 β , TNF- α , TGF- β , and IL-10. These immunobiochemical alterations by RvD5 treatment resulted in the reduction of UVB-induced epidermal thickness, sunburn and mast cell counts, and collagen degradation. Therefore, the lipid mediator RvD5 inhibits skin damage promoted by UVB and may be a promising therapeutic approach to control skin disease.

Keywords: Cytokines, antioxidant, lipid mediator, ROS

1. Introduction

The skin is the largest organ in the human body and constitutes about 16% of the body mass [1]. It provides a protective physical barrier between the body and the environment, preventing the loss of water and electrolytes and reducing the penetration of external aggressors including exposure to ultraviolet (UV) irradiation, the leading cause of skin damage [2–4]. Overexposure to sunlight has been associated with photoaging and immunosuppression [5,6], and UV irradiation is the most important risk factor for the development of skin cancer [1].

UV radiation causes depletion of endogenous antioxidants like catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), which results in an imbalance between ROS production and antioxidant defense mechanisms, resulting in oxidative stress [7,8]. As a consequence, there is skin inflammation. Erythema and histological changes such as thickening of the epidermis, edema, and perivascular infiltration are signs that indicate inflammation induced by ultraviolet B irradiation (UVB) [9].

During the inflammatory process, pro and anti-inflammatory cytokines are produced, and the balance between them determines the magnitude of the inflammatory response [10]. Different studies show that UVB radiation induces the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6 and anti-inflammatory IL-10 and TGF- β *in vivo* models [11,12]. IL-1 β and TNF- α participate in the induction of ROS, which, in turn, induce the production of more cytokines. This cycle of ROS and cytokines tends to feedback the reciprocal production, thus perpetuating the inflammatory process [13].

Inflammation is the first response of the immune system to infection or tissue damage. It has a protective function, and it is necessary to ensure the continuity of the organism's health. However, excessive or inadequate inflammatory response contributes to several acute and chronic human diseases [14,15].

Previously considered a passive event, inflammation resolution is now understood as a highly regulated, active, and complex event that ends inflammation after the threat is contained. This response is orchestrated by specialized pro-resolving mediators (SPMs) that limit the immune response within the affected tissue [15,16]. Therefore, these SPMs are emerging as highly

effective immunoregulatory agents by activating the pro-resolving pathway, as reported by plenty of scientific evidence gathered in the last two decades since their discovery [17].

Resolvin D5 (RvD5) is an SPMs derived from docosahexaenoic acid (DHA) by the action of the enzyme 5-lipoxygenase, known for its anti-inflammatory effects [18]. In recent years, these lipid mediators have been a major focus due to their anti-inflammatory and pro-resolution abilities in some disease models. Their actions include inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines, including TNF- α , IL-1, IL-6; inhibiting inducible enzymes such as cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in monocytes and macrophages, which are modulated via activation of the nuclear factor kappa B (NF- κ B) transcription [18]. In addition, RvD5 increases phagocytosis of neutrophils and macrophages to infectious agents [19].

RvD5 produces beneficial actions in human organisms through interaction with specific receptors coupled to G protein, such as GPR32. Additionally, specific receptors for RvD5 may exist in immune cells (e.g., macrophages) that mediate the reduction of pain induced by the inflammatory process. Notably, RvD5 is a vital lipid mediator produced by human M2 macrophages [20,21].

These observations make it reasonable to think that RvD5 can reduce inflammation and oxidative injury in other diseases. However, there is no evidence on the effect of RvD5 in UVB irradiation-induced skin inflammation and oxidative stress, which we reason to be worthy of investigating in the present study.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Chemicals were obtained from the following sources: Resolvin D5 from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA); brilliant blue R, reduced glutathione (GSH), hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), o-dianisidine dihydrochloride, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), nitroblue tetrazolium (NBT), and bisacrylamide from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); tert-butyl hydroperoxide from Acros (Pittsburgh, PA, USA); tris from Amresco (Solon, OH,

USA); ELISA kits for the determination of cytokine from eBioscience (San Diego, CA, USA); and acrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS), platinum SYBRGreen, and superscript III kits from Invitrogen. All other reagents used were from pharmaceutical grade.

2.2. Animals

The experiments were performed in hairless mice (HRS/J) weighing 20–30 g and obtained from the University Hospital of Londrina State University (UEL), Paraná, Brazil. The mice were maintained with free access to water and food throughout the experiment with a light/dark cycle of 12/12 h and temperature-controlled ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). The Animal Ethics Committee of the Londrina State University approved all procedures used in this study (CEUA process number 11146.2016.97). All methods were performed following the relevant guidelines and regulations. All experiments were realized with a minimum number of animals and minimum suffering. Euthanasia at the end of experiments involved the procedures of terminal anesthesia with isoflurane 5% (Abbott Park, IL, USA) and anesthesia with isoflurane 5% following decapitation. The mice were continuously monitored regarding welfare-related assessment before, during, and after the experiments.

2.3. Experimental protocol

The mice were randomly assigned to six groups with six animals per group. The groups were: non-irradiated control treated with vehicle (saline), irradiated control treated with vehicle (saline), irradiated treated with RvD5 0.003 ng/mouse, irradiated treated with RvD5 0.01 ng/mouse, irradiated treated with RvD5 0.03 ng/mouse, and irradiated treated with RvD5 0.1ng/mouse. RvD5 dilutions were prepared with saline solution.

Mice were treated with RvD5 (via intraperitoneal administration) 1 h before and 7 h after the beginning of UVB irradiation exposure [12]. Animals in the control groups received treatment with vehicle (saline). The doses of RvD5 used in the treatments were selected based on dose-response curves tested in the present study.

After the UVB irradiation exposure, samples of skin mice were dissected 2 h, 4 h, or 12 h after the exposure, depending on the assay. Each parameter was evaluated at a specific time point, which was previously determined as suitable to detect significant differences between non-irradiated control and irradiated control groups [22–24], therefore being valid for determining possible treatment effects with RvD5.

The results obtained in the assays evaluating skin edema, FRAP, ABTS, and GSH were utilized for selecting the best dose of RvD5. This dose was used in the following assays to analyze the effect of RvD5 on UV-induced oxidative stress (hydroperoxide formation and superoxide anion production) and determine Nrf2, NQO1, and HO-1 mRNA expression by qPCR. It was also used to evaluate inflammatory (IL-1 β and TNF- α) and anti-inflammatory (TGF- β and IL-10) cytokine levels, histopathological alterations (epidermal thickness, sunburn cell counts, collagen degradation, and mast cell counts), and MMP-9 activity.

2.4. Irradiation protocol

UVB lamp (Philips TL/12 RS 40 W, Medical-Holand) was used in the experiments to induce oxidative stress and acute inflammatory process in hairless mice. The lamp emits light between 270 and 400 nm with peak emission at 313 nm. The radiation dose used to induce process inflammatory and oxidative stress was 4.14 J/cm² [11,12].

The lamp was mounted 20 cm overhead the table where the mice were allocated, and all animals were irradiated simultaneously, as previously described [25]. 12h after the irradiation, the hairless mice were terminally anesthetized with 5% isoflurane (Abbott [Abbott Park, IL, USA]). The full thickness of the dorsal skins was removed for edema, MMP-9 activity, GSH assays, and histology analysis.

For catalase and NBT assays, the hairless mice were anesthetized with 5% isoflurane, followed by decapitation 2h after the end of irradiation. For evaluation of production hydroperoxides, catalase activity, cytokines measurement. Finally, for PCR assays, the animals were anesthetized and decapitated 4h after the end of UVB exposure, and the dorsal skins were

removed. Each parameter was evaluated at a specific time, which was previously determined [11,25].

After collection, the skin samples were stored at -80°C until analysis. For analysis of cutaneous edema, the samples were weighed immediately after collection, and for histological examination, the samples were fixed in buffered formaldehyde.

2.5. Skin edema

Dorsal skin samples were collected carefully with the aid of a 5 mm diameter mold. The results were expressed in mg of skin tissue obtained from the weight of each sample. The skin weight from the control group (irradiated and non-irradiated group) and treated group were compared [11,12].

2.6. Total antioxidant capacity: FRAP and ABTS assays

For FRAP and ABTS assays, skin samples were dissected, homogenized into buffer containing 1.15% KCl, centrifuged (1,000 g in 4°C for 10 min), and total antioxidant capacity was determined as described previously [24,26]. Reading was performed at 595 and 794 nm in a spectrophotometer reader (ENSPIRE, PERKIN ELMER). The results were expressed as nmol Trolox equivalent per mg of skin tissue. All results were compared to a standard curve of Trolox (concentration ranging between 0.01–20 nmol) [24,26].

2.7. Quantification of endogenous antioxidant reduced glutathione (GSH)

GSH method is based on the quantification of the colored compound (5-mercapto-2-nitrobenzoic acid) formed by breaking the 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) bond by the glutathione sulfhydryl group [27].

GSH levels were determined as described previously [12]. The absorbance was performed at 405 nm. The results are presented as μM of GSH per mg of skin, compared to a standard curve (GSH concentration ranging 5–150 μM) [27].

2.8. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 activity measurement

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

2.9. Lipid peroxidation assay (LPO)

Lipid peroxidation was evaluated by the chemiluminescence (QL) method previously described [12]. The method is based on the measure of the QL initiated by the tert-butyl hydroperoxide [28]. The reading was conducted in a β -counter Beckman® LS 6000SC (FULLERTON, CA, USA) in a non-coincident counting for 30 s with a response range between 300 and 620 nm. The results were measured in counts per min (cpm) per mg of skin.

2.10. Superoxide anion production

Exposure to UVB-induced formation of O₂⁻ by keratinocyte skin [29]. Production in the skin was measured using the nitroblue tetrazolium (NBT) assay as described previously [12]. Reduction of NBT to formazan was determined in spectrophotometer reader (ENSPIRE, PERKIN ELMER) at 620 nm, and the results are presented as NBT reduction (OD/ 10 mg of skin).

2.11. Cytokine measurement and Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

The quantification of cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-10, and TGF- β in the skin was performed using commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

kits according to manufacturer's instructions (eBioscience). For that, skin samples were dissected and homogenized into sterile saline (500 μ L). Reading was performed at 450 nm in a spectrophotometer reader (ENSPIRE, PERKIN ELMER), and the results are expressed as picograms (pg) of each cytokine/mg of skin tissue compared to the respective cytokine standard curve [30].

2.12. Real-time and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).

The quantitative polymerase chain reaction method was described previously [12]. Briefly, skin samples were collected into Trizol reagent (Invitrogen), and total RNA was extracted as recommended by the manufacturer. RNA purity was determined spectrophotometrically in 260/280 nm (between 1.8 and 2.0 for all preparations). Reverse transcription of total RNA to cDNA and qPCR were performed using GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, WI, USA) on a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The relative gene expression was determined using the comparative $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ method, and GAPDH mRNA expression was used as a reference for tissue integrity in all samples. Primer sequences were described previously [12].

2.13. Skin histologic evaluation

Skin samples were collected in formol 10%, embedded in paraffin, sectioned (5 μ m), and stained with hematoxylin and eosin, toluidine blue, and Masson's trichrome stain.

For epidermal thickness determination and sunburn cell count, the sections were stained with H & E and examined using light microscopy at 400x [31] and a 1000x magnification, respectively [32]. For mast cell count, the sections were stained with toluidine blue and analyzed under light microscopy at 400x magnification. All analyses were done with the software Infinity Analyze (Lumenera® Software). Masson's trichrome staining was also used to analyze the intensity of the blue coloration in the dermal areas of the skin exposed to UVB using light microscopy (100x magnification) with the aid of the Image J program (NIH) as described previously [12]. Histopathological scores are presented

together with the representative images quantifying the alterations detected between the groups. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test [$*p < 0.05$ compared to the non-radiated control group; $\#p < 0.05$ compared to the radiated control group (vehicle)].

2.14. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparisons test. Results were presented as mean \pm standard error (SEM) of measurements made with 6 animals in each group per experiment. The results were representative of 2 separate experiments and were considered significantly different at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Resolvin D5 (RvD5) reduces UVB irradiation-induced skin edema

The anti-inflammatory effects of RvD5 were first assessed by the edema assay. Skin edema was inhibited by 0.01 and 0.03 ng/mouse RvD5 treatment compared with the irradiated group (Figure 1). Skin edema is a parameter associated with the inflammatory process induced by UV radiation [12] because it causes increased permeability of the vascular endothelium [33].

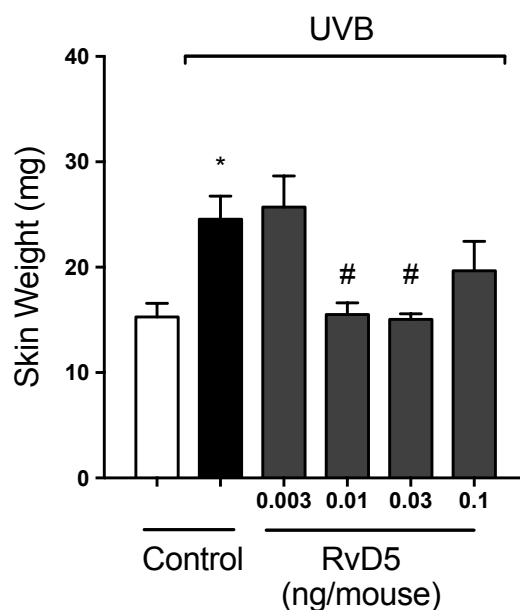


Figure 1. RvD5 reduces the development of skin edema induced by UVB irradiation. Mice were treated intraperitoneally with 0.003, 0.01, 0.03 or 0.1 ng of RvD5 1 h before and 7 h after the beginning of UVB irradiation. The skin edema was determined in samples collected 12 h after the end of irradiation. Results are presented as tissue weight in milligrams of skin. Bars are representative of two separate experiments and represent means \pm SEM of 6 mice per group per experiment. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test [$*p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; $\#p < 0.05$ compared to the irradiated control group (vehicle)].

3.2. RvD5 inhibits UVB irradiation-induced depletion of skin antioxidants

Given that the overproduction of ROS induced by exposure to UVB irradiation decreases antioxidant defenses [34,35], we evaluated the effect of treatment with RvD5 on UVB-induced oxidative stress.

UVB irradiation led to decreased ferric reducing (Figure 2A) and ABTS scavenging (Figure 2B) tissue abilities. Also, it reduced GSH levels (Figure 2C) compared with the non-irradiated control group. All these oxidative stress parameters induced by UVB radiation were significantly inhibited by the treatment with 0.03 ng of RvD5. Besides that, the treatment with 0.01 ng of RvD5 could inhibit the decreased ABTS scavenging capacity. Based on the result obtained in

edema, FRAP, and GSH levels, the dose of 0.03 ng/mouse was chosen for the next assays.

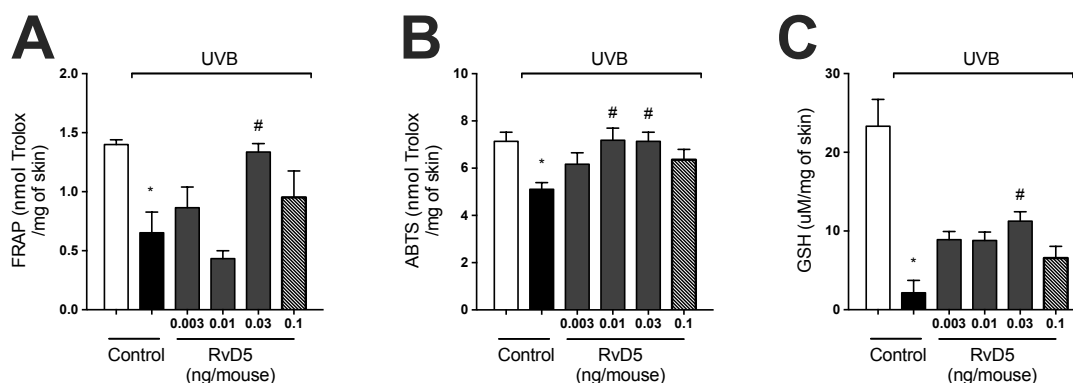


Figure 2: RvD5 inhibited UVB irradiation-induced decrease of skin antioxidant capacity. Mice were treated intraperitoneally with 0.003, 0.01, 0.03 or 0.1 ng of RvD5 1 h before and 7 h after the beginning of UVB irradiation. Total antioxidant capacity FRAP (A), ABTS (B), and GSH levels (C) were determined in samples dissected 12 h after irradiation. Results are presented as nmol of Trolox per milligrams of tissue for FRAP and ABTS assays and micromoles per milligrams of tissue for GSH assay. Bars are representative of two separate experiments and represent 0.01 means \pm SEM of 6 mice per group per experiment. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test [$*p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; $\#p < 0.05$ compared to the irradiated control group (vehicle)].

3.3. Catalase activity assay

Catalase (CAT) is an important antioxidant enzyme of the skin. The decrease in levels of this enzyme after UV-irradiation exposure represents potential damage to cellular macromolecules, as excess hydrogen peroxide (H_2O_2) can generate OH radical, a powerful oxidant capable of causing damage to all bases of DNA [36]. UVB-irradiation has induced a decreased catalase activity when compared with not UVB exposure controls. Our results showed that treatment with RvD5 restored catalase activity (Figure 3).

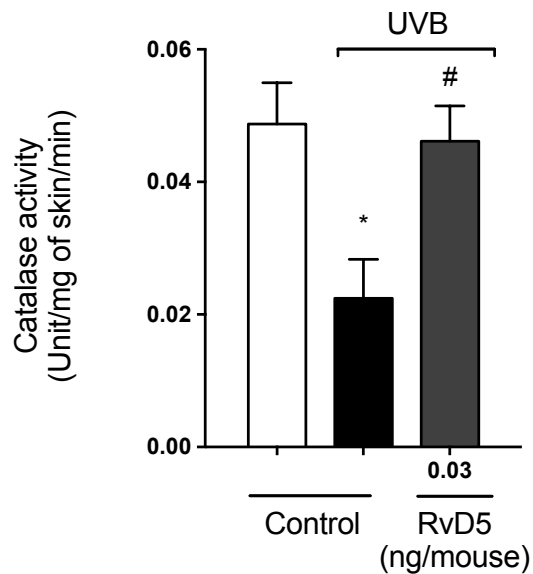


Figure 3: RvD5 inhibited UVB irradiation-induced decrease of skin catalase activity. Mice were treated intraperitoneally with 0.03 ng of RvD5 1 h before and 7 h after the beginning of UVB irradiation. The catalase activity was evaluated in the skin samples collected 2 h after the end of irradiation. Bars are representative of two separate experiments and represent means \pm SEM of 6 mice per group per experiment. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test [$*p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; $\#p < 0.05$ compared to the irradiated control group (vehicle)].

3.4. RvD5 inhibits UVB irradiation-induced apoptosis of keratinocytes

After high-level exposure to UVB radiation, keratinocytes undergo apoptosis (sunburn cells) [1]. Sunburn cells were characterized histologically by chromatin condensation and eosinophilic cytoplasm [37]. UVB-irradiation induced an increased sunburn cell count in comparison with the non-irradiated group (Figure 4). RvD5 treatment inhibited sunburn cell formation by 81.23% compared to the irradiated control group. These data indicate a protective effect of RvD5 upon UVB irradiation-induced keratinocytes apoptosis.

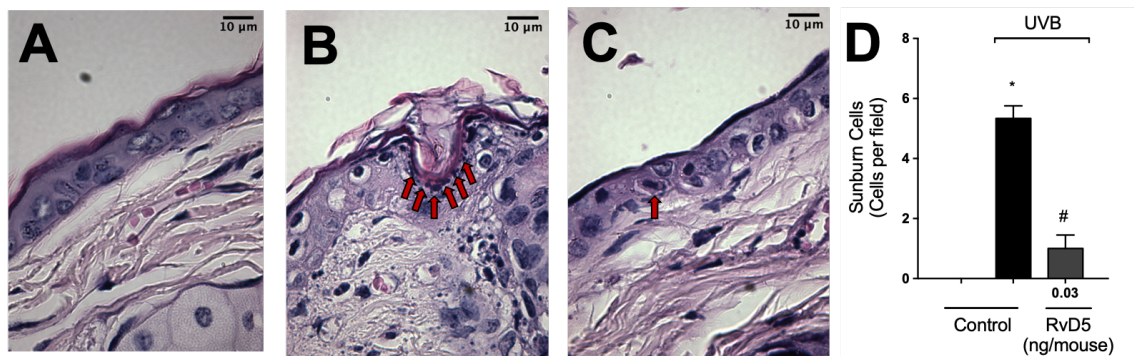


Figure 4: RvD5 reduces UVB radiation-induced sunburn cells. Mice were treated intraperitoneally with 0.03 ng of RvD5 1 h before and 7 h after the beginning of UVB irradiation. Sunburn cells were evaluated using hematoxylin and eosin staining (H & E) in skin samples collected 12 h after the end of irradiation. The sections stained with H & E were examined using light microscopy at 1000x magnification. Representative images of the groups: non-irradiated control (A), irradiated treated with vehicle (B), irradiated treated with 0.03ng/mouse of RvD5 (C). Sunburn cells count is presented in cells per field in panel D. Bars are representative of two separate experiments and represent means \pm SEM of 6 mice per group per experiment. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test [$*p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; $\#p < 0.05$ compared to the irradiated control group (vehicle)].

3.5. RvD5 inhibits UVB irradiation-induced epidermal thickening

Exposure to UVB radiation induces an increase in epidermal thickness due to the hyperproliferation of keratinocytes [38].

Histological analysis of hematoxylin and eosin-stained tissue sections indicated that epidermal thickness was significantly increased following exposure to UVB. On the other hand, epidermal hypertrophy was reduced by 65.28% compared with the irradiated control group when mice were treated with RvD5 0,03 ng/mouse (Figure 5).

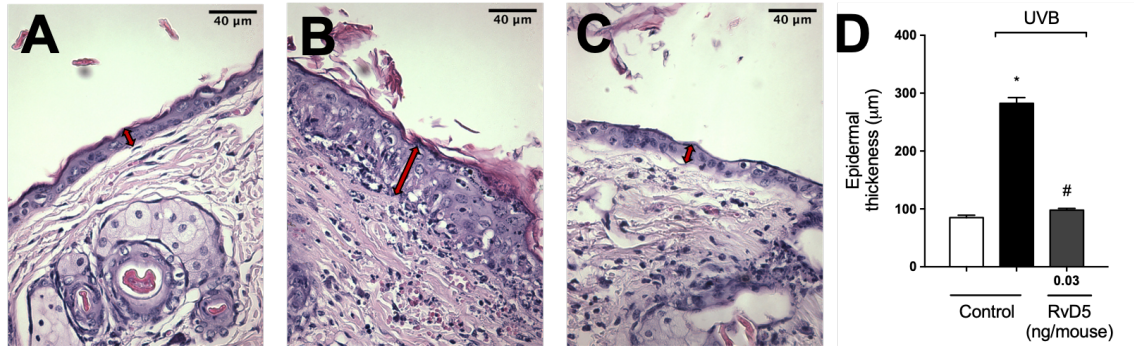


Figure 5: RvD5 reduced UVB irradiation-induced increase of epidermal thickness. Mice were treated intraperitoneally with 0.03 ng of RvD5 1 h before and 7 h after the beginning of UVB irradiation. The epidermal thickness was determined in samples collected 12 h after the end of irradiation and stained with hematoxylin and eosin staining (H&E). Representative images of the groups: non-irradiated control (A), irradiated treated with vehicle (B), irradiated treated with 0.03ng/mouse of RvD5 (C). The epidermal thickness of experimental groups is presented in µm in panel D. The sections stained with H & E were examined using light microscopy at 400x magnification. Bars are representative of two separate experiments and represent means \pm SEM of 6 mice per group per experiment. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test [$*p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; $\#p < 0.05$ compared to the irradiated control group (vehicle)].

3.6. RvD5 inhibits UVB irradiation-induced increase of mast cell counts

Exposure to UV radiation leads to increased recruitment of mast cells into the skin [39]. Mast cells secrete mediators that trigger inflammation and recruit other leukocytes such as neutrophils [40].

Treatment with RvD5 0.03 ng/mouse ameliorates UVB irradiation-induced inflammation by effectively reducing the numbers of mast cells in the skin (Figure 6).

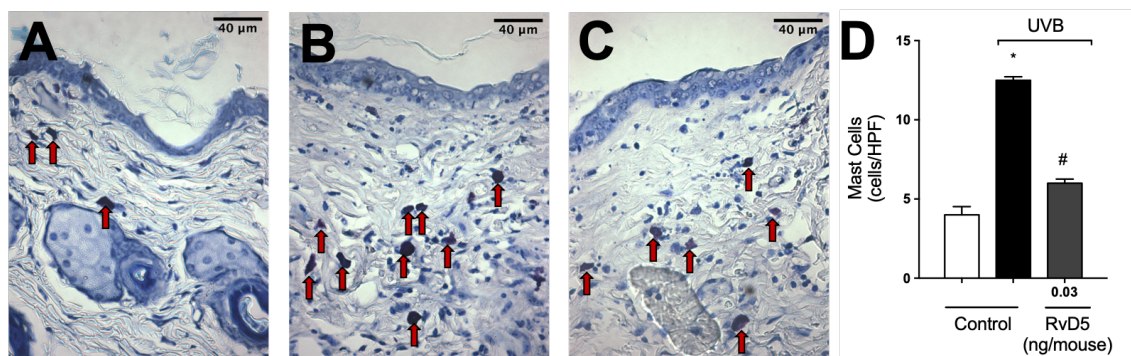


Figure 6. RvD5 reduced UVB irradiation-induced increase of mast cell count. The proliferation of mast cells was determined in samples collected 12 h after the end of the irradiation and stained with toluidine blue. Representative images of the groups: non-irradiated control (A), irradiated treated with vehicle (B), and irradiated treated with 0.03 ng/mouse of RvD5 (C). Mast cell count of experimental groups is presented per field in panel D. Original magnification 400x. Bars are representative of two separate experiments and represent means \pm SEM of 6 mice per group per experiment. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. [* p <0.05 compared to the non-irradiated control group; # p <0.05 compared to the irradiated control group (vehicle)].

3.7. RvD5 inhibits UVB irradiation-induced MMP-9 activity and collagen fibers degradation

MMP-9 is an enzyme secreted predominantly by neutrophils, mast cells, and macrophages that have proteolytic activity against the main component of the basement membrane, type IV collagen [41–44]. MMP-9-induced damage to the collagenous matrix of the skin is one of the hallmarks of photoaging and non-melanoma skin cancer [45,46].

UVB irradiation increases MMP-9 activity and treatment with RvD5 0.03 ng/mouse reduced the activity of MMP-9. These data evidence that RvD5 reduces dermal connective tissue damage (Figure 7).

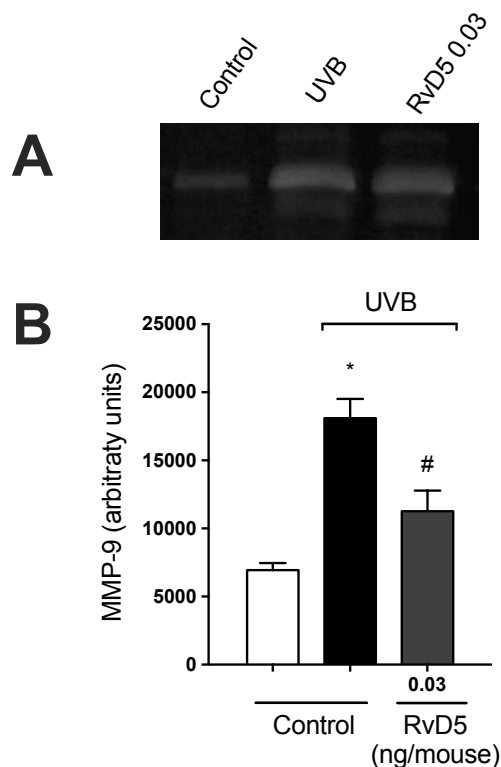


Figure 7. RvD5 inhibited UVB irradiation-induced MMP-9 activity in the skin. MMP-9 activity was determined in samples collected 12 h after the end of irradiation. A representative image of gelatin zymography is presented in panel A and skin MMP-9 activity in panel B. Results are presented as arbitrary units per sample for MMP-9 activity. Bars are representative of two separate experiments and represent means \pm SEM of 6 mice per group per experiment. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. [* $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; # $p < 0.05$ compared to the irradiated control group (vehicle)].

Given the deleterious effect of MMP-9 enzyme activity on collagen fibers, we quantified collagen density in sections of skin tissue with Masson's trichrome staining [47]. Notably, treatment with RvD5 0.03 ng/mouse reduced the degradation of skin collagen, as observed by the preservation of the blue color in the Masson's trichrome staining compared with the irradiated group (Figure 8). Therefore, the results of the enzymatic activity assay (MMP-9) and tissue staining (Masson's trichrome) corroborate each other

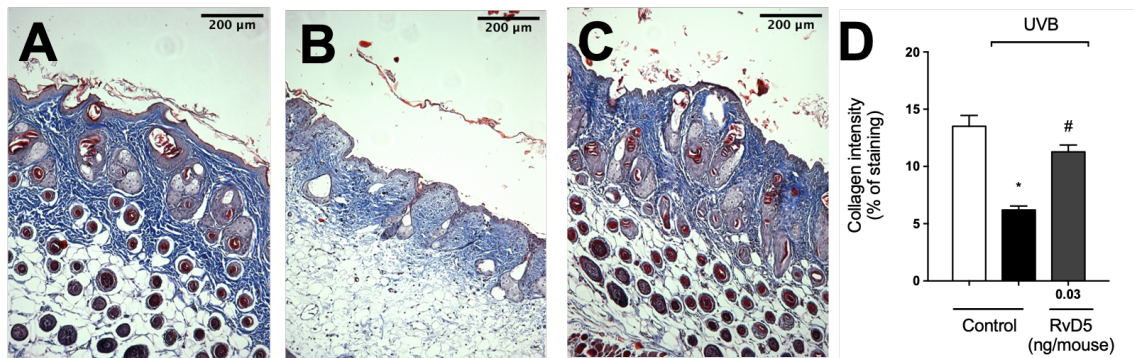


Figure 8: RvD5 inhibited UVB irradiation-induced collagen fiber degradation in the skin. Degradation of collagen was determined in samples collected 12 h after the end of irradiation and stained with Masson's trichrome. Representative images of the groups: non-irradiated control treated with vehicle (salina) (A), irradiated treated with vehicle (salina), and (B) irradiated treated with 0.03 ng/mouse of RvD5 (C) (100x magnification). Quantitative analysis of collagen degradation of experimental groups is presented as percentage of staining in panel D. Bars are representative of two separate experiments and represent means \pm SEM of 6 mice per group per experiment. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test [$*p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; $\#p < 0.05$ compared to the irradiated control group (vehicle)].

3.8. RvD5 inhibits UVB irradiation-induced cytokine production

Cytokines such IL-1 β , TNF- α , TGF- β , and IL-10 are produced after overexposure to UVB radiation [11,12,48,49]. IL-1 β and TNF- α are pro-inflammatory cytokines involved in various cellular and tissue alterations, including stimulus of ROS production and MMP-9 by neutrophils [50–52]. IL-10 and TGF- β modulate the production of pro-inflammatory cytokines and, consequently, the inflammatory response, besides orchestrating tissue repair [51,53]. RvD5 treatment (dose 0.03 ng/mouse) reduced both pro and anti-inflammatory UVB-induced cytokines.

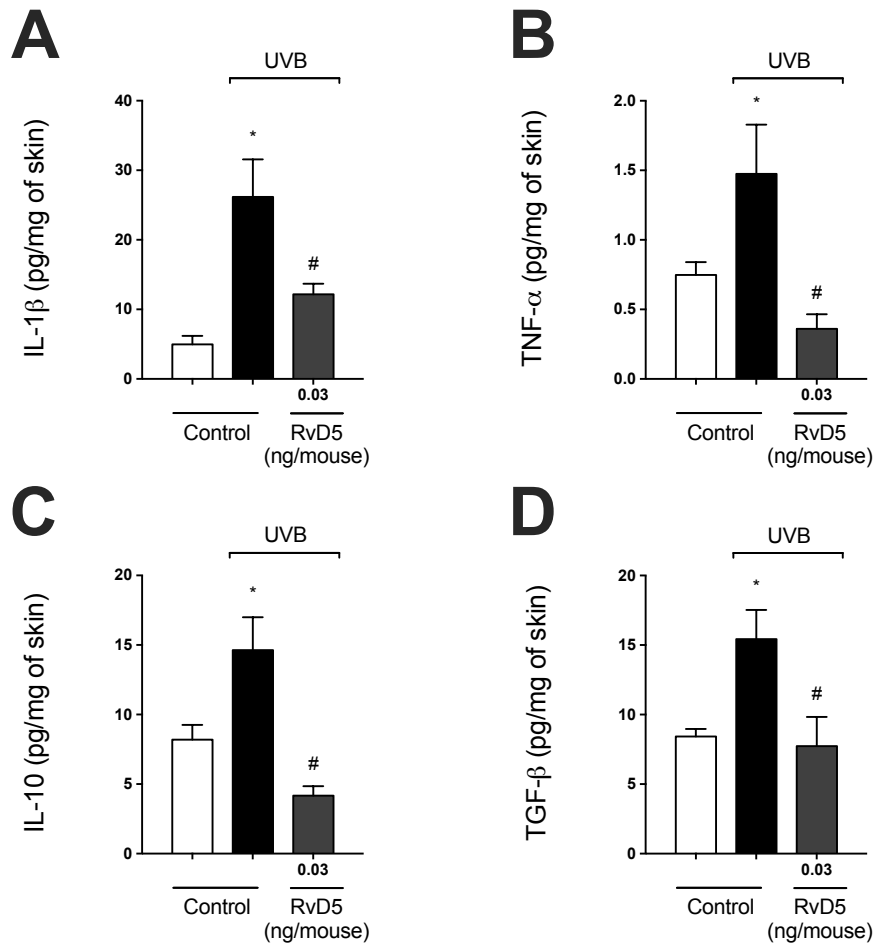


Figure 9: RvD5 inhibits UVB irradiation-induced pro-inflammatory cytokines production (A) IL-1 β and (B) TNF- α and inhibits anti-inflammatory cytokines production (C) IL-10 and (D) TGF- β . Cytokines were determined in skin samples collected 4 h after the end of irradiation. Bars are representative of two separate experiments and represent means \pm SEM of 6 mice per group per experiment. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test [$*p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; $\#p < 0.05$ compared to the irradiated control group (vehicle)].

3.9. RvD5 reduces UVB irradiation-induced oxidative stress and enhances mRNA expression of genes involved in antioxidant response and skin antioxidants

One of the consequences of the inflammatory process caused by exposure to UVB is that recruited cells, such as neutrophils and macrophages, produce large amounts of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide

anion [48,54]. Exposure to UVB irradiation increased superoxide anion production comparable with non-irradiated control (Figure 10A). RvD5 treatment at 0.03 ng/mouse inhibited superoxide anion production.

TNF- α is up-regulated in response to UV radiation exposure [55]. The expression mRNA of this cytokine is increased after UVB radiation exposure, but RvD5 treatment could inhibit this effect (Figure 10B).

GSH, NQO1, and HO-1 are downstream targets of Nrf2 [56]. We observed that UVB irradiation decreased mRNA expression of both Nrf2 and NQO1 and increased on HO-1, corroborating with our previous study [12]. RvD5 treatment (dose of 0.03 ng/mouse) has reversed the down-modulation of Nrf2 and NQO1 mRNA expression. Also, it has increased its mRNA expression in the skin (Figures 10C and 10D). RvD5 has increased even more HO-1 mRNA expression while compared to the irradiated group (Figures 10E). Thus, the antioxidant effects of RvD5 added to the others (ABTS, FRAP and GSH) contribute to the attenuation of the skin damages caused by UVB irradiation.

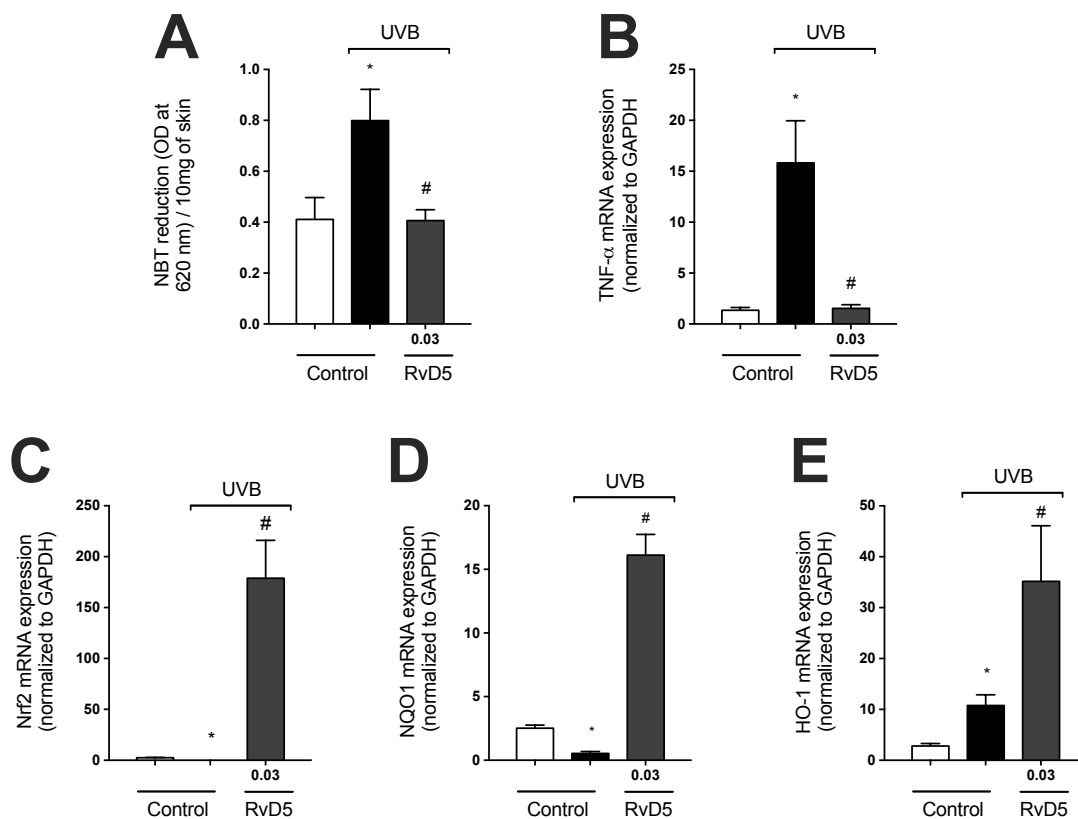


Figure 10: RvD5 inhibits UVB irradiation-induced oxidative stress, mRNA expression of oxidative stress-related genes, and increased production of ROS. Superoxide anion production (A) was determined by nitroblue tetrazolium (NBT)

reduction assay at 2 h; TNF- α (B), Nrf2 (C), NQO1 (D), and HO-1 (E) mRNA expression were determined by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) at 4 h after the end of irradiation. Bars are representative of two separate experiments and represent means \pm SEM of 6 mice per group per experiment. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. [* p <0.05 compared to the non-irradiated control group; # p <0.05 compared to the irradiated control group (vehicle)].

4. Discussion

UV radiation is the most important risk factor for the development of skin cancer [1]. The harmful effect of UV irradiation in the skin, in particular UVB (280–315 nm), occurs due to excessive free radical production and direct DNA damage [57]. Overproduction of ROS causes depletion of endogenous antioxidants and consequent oxidative stress [7]. In addition, ROS are directly involved in the induction of the inflammatory process because they stimulate the secretion of cytokines [22].

Recently, we demonstrated that resolvin D1, a pro-resolution lipid mediator derived from DHA metabolism, reduces UVB-induced skin inflammatory process and oxidative stress [12]. However, to our knowledge, the present study shows for the first time that treatment with RvD5 efficiently reduces the deleterious impact of UVB-induced skin injury.

RvD5 treatment inhibited the inflammatory process and oxidative stress by reducing the production of ROS and cytokines resulting in diminished skin cellular infiltrate, keratinocyte apoptosis, collagen degradation, and depletion of antioxidants.

The release of cytokines induced by UVB radiation is essential for the recruitment of inflammatory cells in the skin. These cells stimulate the proliferation of epidermal keratinocytes contributing to their accumulation, therefore increasing epidermal thickness and skin edema [38,58]. Epidermal thickness and skin edema are used as quantitative parameters to assess inflammation [24]. In the present study, RvD5 treatment inhibited skin hyperkeratosis and edema.

Altered dermal and epidermal cytokine profiles have been implicated in the pathophysiology of various skin disorders and the sunburn reaction. Cytokines mediate cell growth and differentiation, as well as inflammatory and immune responses [59]. Here, was demonstrated that RvD5 treatment inhibited the increase of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α and anti-inflammatory TGF- β and IL-10 induced by UVB exposure. TNF- α is up-regulated in response to UV radiation exposure and it has been reported as a mouse skin tumor promoter since TNF- α deficient mice are resistant to the skin cancer development induced by UV radiation [60]. Further, RvD5 accelerated the resolution of *Escherichia coli* infection in mice by counter-regulating pro-inflammatory genes, including those encoding NF- κ B and TNF- α . Furthermore, it increases the phagocytosis of neutrophils and macrophages to infectious agents [61]. IL-1 β and TNF- α participate in the induction of ROS, which, in turn, cause the production of more cytokines. This cycle of ROS and cytokines tends to feedback each other, thus perpetuating the inflammatory process [13]. Therefore, these data on the inhibitory effect of RvD5 over UVB irradiation-induced proinflammatory cytokine production contribute to explaining, at least in part, the reduction of skin inflammation (edema, mast cell counts, neutrophil recruitment, MMP-9 activity, and collagen degradation).

The organism limits the harmful consequences of prolonged exposure to the action of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β , by releasing anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 and IL-13. These anti-inflammatory cytokines modulate the production of pro-inflammatory cytokines, hence the inflammatory response [51]. TGF- β also has an anti-inflammatory contribution and a tissue repair role since it stimulates fibroblasts to produce collagen [53]. A study revealed that RvD5 exerts anti-inflammatory effects on human monocytic THP-1 cells by regulating the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and nuclear translocation of nuclear factor (NF)- κ B. This regulation inhibited the production of inflammatory cytokines [18].

Neutrophils are the first line of immune defense and the first immune cells to migrate to the injury site [15]. These phagocytes are responsible for the additional production of superoxide anion (O₂^{•-}) via activation of the enzyme nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 2. Superoxide anion induces cytokines including TNF- α and IL-1 β , triggering inflammation and

amplifying oxidative stress [62,63]. RvD5 reduced neutrophil migration and superoxide anion production, indicating a reduction of phagocyte NADPH oxidase (NOX₂) activity.

One of the consequences of acute exposure to UV radiation is increased cell division of keratinocytes mediated by various epidermal growth factors causing epidermal thickening [38]. Also, UVB exposure causes the formation of sunburn cells (apoptotic keratinocytes). Because apoptosis eliminates cells with defected DNA promoted by UVR exposure, it contributes to preventing photocarcinogenesis [54]. Histopathological analysis showed that UVB irradiation increased sunburn cell counts and epidermal thickening, which was decreased by RvD5 treatment (0.03ng/mouse).

Dermal mast cells correlate directly with the degree of susceptibility to systemic immunosuppression induced by long-term UVB exposure, and the suppression of the immune system avoids tumor killing [39]. UV irradiation induces the increase of mast cells in the dermis [64]. Mast cells contribute to UV-induced skin inflammation by releasing inflammatory mediators, including prostaglandin E₂ (PGE₂), leukotrienes (LT), and histamine [65]. Histamine is the main biogenic amine in mast cells, and it is related to systemic immunosuppression induced by UVB radiation [39]. In the present study, RvD5 treatment decreased the UVB-induced increase of mast cell counts. Also, it is possible that RvD5 also inhibits the function of the mediators released by mast cells. Furthermore, it has been shown that mast cells degranulate and also produce TNF- α upon direct contact with activated T cells. This mast cell-T cell interaction regulates TNF- α release. TNF- α is a cytokine triggering inflammatory responses that occur in the skin and it is specifically involved in the up-regulation of MMP-9 expression. MMP-9 is an important mediator of extracellular matrix (ECM) degradation [66]. Furthermore, TNF- α plays a role in the development of sunburn cells [37]. This information suggests that inhibition of TNF- α production by RvD5 may contribute to the reduced MMP-9 activity and sunburn cell counts that we have observed.

RvD5 treatment reduced oxidative stress and improved the skin's antioxidant capacity after exposure to UVB irradiation by maintaining FRAP, ABTS scavenging at basal levels and preventing the reduction of GSH levels and catalase activity. GSH is one of the most important endogenous antioxidant

molecules, a hydrophilic tripeptide with sulfhydryl groups that neutralize free radicals by donating electrons [54]. It has been implicated in immune modulation and inflammatory responses. In addition, increasing intracellular GSH can decrease the release of cytokines and chemokines from lung cells by decreasing NF- κ B activation [67]. Increased production of ROS following exposure to UV can deplete these antioxidant defenses, leaving the skin vulnerable to attack from ROS [54]. Our finding showed that RvD5 increases redox status as indicated by enhanced GSH levels. CAT was chosen as a marker of acute oxidative stress as it is the most sensitive antioxidant to ultraviolet radiation. This enzyme converts H₂O₂ to water and molecular oxygen minimizing the damage caused by ROS within the cell. Maresca *et al.* observed that UV irradiation exposure induces alteration of CAT activity in human keratinocytes. This alteration is ascribable not only to the increase in ROS production but also to a direct effect of UV light. When CAT activity is reduced, H₂O₂ accumulates in the cell and damages several structures, including the enzyme itself [68]. RvD5 was capable to block the loss of cell viability associated with the decrease in endogenous antioxidant defenses caused by UV exposure.

Further, RvD5 enhanced anti-inflammatory and antioxidant pathways such as the Nrf2 mRNA expression and its downstream target NQO1 and HO-1 mRNA expression. Nrf2 is a key factor for cytoprotection for its anticancer, neuroprotective effect, and role as a stimulator of the anti-inflammatory response [69]. Nrf2 interruption upregulates the expression of inflammatory macrophages and the regulation of the main inflammatory transcription factors, such as the NF- κ B, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) [70]. Nrf2 modulates the expression of antioxidant and detoxifying enzymes as HO-1 and NQO1 [69,71]. In this study, UVB irradiation increased HO-1 mRNA expression and decreased Nrf2 and NQO1 mRNA expression. HO-1 is an important antioxidant and anti-inflammatory enzyme essential to cell resistance during oxidative and other stress conditions. Enhanced HO-1 mRNA expression was associated with the resolution of inflammation and natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity, which may explain why HO-1 production increases while other antioxidant enzymes are inhibited [72,73]. Treatment with RvD5 increased Nrf2 mRNA expression, which resulted in an enhancement of HO-1 and NQO1 mRNA expression. Nrf2 controls GSH expression by regulating glutathione reductase (GSR) [74]. GSH redox status is

critical for the transcriptional regulation of proinflammatory genes [67]. Therefore, RvD5 presents an active role in inducing Nrf2 that might be orchestrating the antioxidant responses.

In summary, the present study demonstrated for the first time that treatment with RvD5 effectively inhibits oxidative and inflammatory damage induced by UVB irradiation in hairless mice. RvD5 inhibited the inflammatory cell counts in the skin (sunburn cells and mast cells). The migration and activation of inflammatory cells were damped by reducing cytokine production and inducing antioxidant and anti-inflammatory genes. Those results showed that RvD5 protected the skin from UVB irradiation-induced tissue alterations such as collagen degradation. Therefore, the present results suggest RvD5 as a potential therapy to control UVB-induced skin inflammation- and oxidative stress-related alterations.

5. References

- [1] J. D’Orazio, S. Jarrett, A. Amaro-Ortiz, T. Scott, UV radiation and the skin, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 12222–12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>.
- [2] F. Afaq, V.M. Adhami, H. Mukhtar, Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 571 (2005) 153–173. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.07.019>.
- [3] Y.M. Fonseca, C.D. Catini, F.T.M.C. Vicentini, J.C. Cardoso, R.L. Cavalcanti De Albuquerque Junior, M.J. Vieira Fonseca, Efficacy of marigold extract-loaded formulations against UV-induced oxidative stress, *J. Pharm. Sci.* 100 (2011) 2182–2193. <https://doi.org/10.1002/jps.22438>.
- [4] J. Khavkin, D.A.F. Ellis, Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology, *Facial Plast. Surg. Clin. North Am.* 19 (2011) 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2011.04.003>.
- [5] P. Kullavanijaya, H.W. Lim, Photoprotection, *J. Am. Acad. Dermatol.* (2005). <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.07.063>.
- [6] U. Panich, G. Sittithumcharee, N. Rathviboon, S. Jirawatnotai, Ultraviolet radiation-induced skin aging: The role of DNA damage and oxidative stress

- in epidermal stem cell damage mediated skin aging, *Stem Cells Int.* (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/7370642>.
- [7] S. Dunaway, R. Odin, L. Zhou, L. Ji, Y. Zhang, A.L. Kadekaro, Natural antioxidants: Multiple mechanisms to protect skin from solar radiation, *Front. Pharmacol.* (2018). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00392>.
- [8] Y. Shindo, E. Witt, D. Han, L. Packer, Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis, *J. Invest. Dermatol.* (1994). <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12373027>.
- [9] A. Balupillai, R.N. Prasad, K. Ramasamy, G. Muthusamy, M. Shanmugham, K. Govindasamy, S. Gunaseelan, Caffeic Acid Inhibits UVB-induced Inflammation and Photocarcinogenesis Through Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ in Mouse Skin, *Photochem. Photobiol.* (2015). <https://doi.org/10.1111/php.12522>.
- [10] W.A. Verri, T.M. Cunha, C.A. Parada, S. Poole, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira, Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development?, *Pharmacol. Ther.* (2006). <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.04.001>.
- [11] R.M. Martinez, V. Fattori, P. Saito, C.B.P. Melo, S.M. Borghi, I.C. Pinto, A.J.C. Bussmann, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A.V. Jr, R. Casagrande, Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice, *J. Dermatol. Sci.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2018.04.014>.
- [12] P. Saito, C.P.B. Melo, R.M. Martinez, V. Fattori, T.L.C. Cezar, I.C. Pinto, A.J.C. Bussmann, J.A. Vignoli, S.R. Georgetti, M.M. Baracat, W.A. Verri, R. Casagrande, The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice, *Front. Pharmacol.* (2018). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01242>.
- [13] J. Fuchs, T.M. Zollner, R. Kaufmann, M. Podda, Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases, *Free Radic. Biol. Med.* (2001). [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00482-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00482-2).
- [14] M.G. Duvall, B.D. Levy, DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation, *Eur. J. Pharmacol.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.001>.

- [15] H. Seki, T. Sasaki, T. Ueda, M. Arita, Resolvins as Regulators of the Immune System, *Sci. World J.* 10 (2010) 818–831. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.72>.
- [16] G. T., D. J., C. R.A., C. D.F., A. M., B. D., A. L., V. N., D. C., H. T.V., S. C.N., P. M., Protectin D1n-3 DPA and resolvin D5n-3 DPA are effectors of intestinal protection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2017).
- [17] A. Leuti, M. Maccarrone, V. Chiurchiù, Proresolving lipid mediators: Endogenous modulators of oxidative stress, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/8107265>.
- [18] H.W. Chun, J. Lee, T.H. Pham, J. Lee, J.H. Yoon, J. Lee, D.K. Oh, J. Oh, D.Y. Yoon, Resolvin D5, a Lipid Mediator, Inhibits Production of Interleukin-6 and CCL5 Via the ERK-NF- κ B Signaling Pathway in Lipopolysaccharide-Stimulated THP-1 Cells, *J. Microbiol. Biotechnol.* (2020). <https://doi.org/10.4014/jmb.1907.07033>.
- [19] C.N. Serhan, B.D. Levy, Resolvins in inflammation: Emergence of the pro-resolving superfamily of mediators, *J. Clin. Invest.* (2018). <https://doi.org/10.1172/JCI97943>.
- [20] X. Luo, Y. Gu, X. Tao, C.N. Serhan, R.-R. Ji, Resolvin D5 Inhibits Neuropathic and Inflammatory Pain in Male But Not Female Mice: Distinct Actions of D-Series Resolvins in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy, *Front. Pharmacol.* (2019). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00745>.
- [21] O. Werz, J. Gerstmeier, S. Libreros, X. De La Rosa, M. Werner, P.C. Norris, N. Chiang, C.N. Serhan, Human macrophages differentially produce specific resolvin or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity, *Nat. Commun.* (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02538-5>.
- [22] A.L.M. Ivan, M.Z. Campanini, R.M. Martinez, V.S. Ferreira, V.S. Steffen, F.T.M.C. Vicentini, F.M.P. Vilela, F.S. Martins, A.C. Zarpelon, T.M. Cunha, M.J.V. Fonseca, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 138 (2014) 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.05.010>.

- [23] R.M. Martinez, F.A. Pinho-Ribeiro, D.L. Vale, V.S. Steffen, F.T.M.C. Vicentini, J.A. Vignoli, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Trans-chalcone added in topical formulation inhibits skin inflammation and oxidative stress in a model of ultraviolet B radiation skin damage in hairless mice, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 171 (2017) 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.05.002>.
- [24] R.M. Martinez, F.A. Pinho-Ribeiro, V.S. Steffen, C. V. Caviglione, J.A. Vignoli, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, 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). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.03.030>.
- [25] M.Z. Campanini, F.A. Pinho-Ribeiro, A.L.M. Ivan, V.S. Ferreira, F.M.P. Vilela, F.T.M.C. Vicentini, R.M. Martineza, A.C. Zarpelon, M.J.V. Fonseca, T.J. Faria, M.M. Baracat, W.A. Verri, S.R. Georgetti, R. Casagrande, Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 127 (2013) 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.08.007>.
- [26] V. Katalinic, D. Modun, I. Music, M. Boban, Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays, *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 140 (2005) 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.005>.
- [27] P. Srinivasan, K.E. Sabitha, C.S. Shyamaladevi, Attenuation of 4-Nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols, *Life Sci.* 80 (2007) 1080–1086. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.11.051>.
- [28] B. Gonzalez Flecha, S. Llesuy, A. Boveris, Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle, *Free Radic. Biol. Med.* 10 (1991) 93–100. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90002-K](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90002-K).
- [29] H. Yasui, T. Hakozaki, A. Date, T. Yoshii, H. Sakurai, Real-time chemiluminescent imaging and detection of reactive oxygen species

- generated in the UVB-exposed human skin equivalent model, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347 (2006) 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.046>.
- [30] W.A. Verri, A.T.G. Guerrero, S.Y. Fukada, D.A. Valerio, T.M. Cunha, D. Xu, S.H. Ferreira, F.Y. Liew, F.Q. Cunha, IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 2723–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712116105>.
- [31] Y. Deng, A. Ediriwickrema, F. Yang, J. Lewis, M. Girardi, W.M. Saltzman, A sunblock based on bioadhesive nanoparticles, *Nat. Mater.* 14 (2015) 1278–1285. <https://doi.org/10.1038/nmat4422>.
- [32] A. Schwarz, R. Bhardwaj, Y. Aragane, K. Mahnke, H. Riemann, D. Metze, T.A. Luger, T. Schwarz, Ultraviolet-B-Induced Apoptosis of Keratinocytes: Evidence for Partial Involvement of Tumor Necrosis Factor- α in the Formation of Sunburn Cells, *J. Invest. Dermatol.* 104 (1995) 922–927. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12606202>.
- [33] G.J. Dusting, P.S. Macdonald, Endogenous Nitric Oxide in Cardiovascular Disease and Trans p l a n t a t i o n Mechanisms of Vasodilatation - NO or, (1995) 395–406.
- [34] A. Godic, B. Poljšak, M. Adamic, R. Dahmane, The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/860479>.
- [35] B. Poljšak, R. Dahmane, Free radicals and extrinsic skin aging, *Dermatol. Res. Pract.* (2012). <https://doi.org/10.1155/2012/135206>.
- [36] B. Halliwell, The wanderings of a free radical, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2009) 531–542. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.008>.
- [37] S. A, B. R, A. Y, M. K, R. H, M. D, L. TA, S. T, Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells, *J. Invest. Dermatol.* 104 (1995) 922–927. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.EP12606202>.
- [38] T.L. Scott, P.A. Christian, M. V. Kesler, K.M. Donohue, B. Shelton, K. Wakamatsu, I. Shosuke, J. D’Orazio, Pigment-independent cAMP-mediated epidermal thickening protects against cutaneous UV injury by keratinocyte proliferation, *Exp. Dermatol.* 21 (2012) 771–777. <https://doi.org/10.1111/exd.12012>.

- [39] P.H. Hart, M.A. Grimbaldston, G.J. Swift, A. Jaksic, F.P. Noonan, J.J. Finlay-Jones, Dermal mast cells determine susceptibility to ultraviolet B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice, *J Exp Med.* 187 (1998) 2045–2053. <https://doi.org/10.1084/jem.187.12.2045>.
- [40] T. Quan, Z. Qin, W. Xia, Y. Shao, J.J. Voorhees, G.J. Fisher, Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging, in: *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.*, 2009: pp. 20–24. <https://doi.org/10.1038/jidsymp.2009.8>.
- [41] S. Boyd, K. Tolvanen, S. Virolainen, T. Kuivanen, L. Kyllönen, U. Saarialho-Kere, Differential expression of stromal MMP-1, MMP-9 and TIMP-1 in basal cell carcinomas of immunosuppressed patients and controls, *Virchows Arch.* (2008). <https://doi.org/10.1007/s00428-007-0526-0>.
- [42] V. Fortino, E. Maioli, C. Torricelli, P. Davis, G. Valacchi, Cutaneous MMPs are differently modulated by environmental stressors in old and young mice, *Toxicol. Lett.* (2007). <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.06.004>.
- [43] H.S. Kim, J.H. Song, U.J. Youn, J.W. Hyun, W.S. Jeong, M.Y. Lee, H.J. Choi, H.K. Lee, S. Chae, Inhibition of UVB-induced wrinkle formation and MMP-9 expression by mangiferin isolated from *Anemarrhena asphodeloides*, *Eur. J. Pharmacol.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.05.050>.
- [44] S. Onoue, T. Kobayashi, Y. Takemoto, I. Sasaki, H. Shinkai, Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation, *J. Dermatol. Sci.* 33 (2003) 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2003.08.002>.
- [45] M. Brennan, H. Bhatti, K.C. Nerusu, N. Bhagavathula, S. Kang, G.J. Fisher, J. Varani, J.J. Voorhees, Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin., *Photochem. Photobiol.* 78 (2003) 43–48. <https://doi.org/10.1562/0031-8655>.
- [46] A.O. Grady, C. Dunne, P.O. Kelly, G.M. Murphy, M. Leader, E. Kay, Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP) -2 , MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) -1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumour progression, *Histopathology.* 51 (2007) 793–804. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

2559.2007.02885.x.

- [47] J.H. Song, M.J. Piao, X. Han, K. Ah Kang, H.K. Kang, W.J. Yoon, M.H. Ko, N.H. Lee, M.Y. Lee, S. Chae, J.W. Hyun, t BA: A review of skin ageing and its medical therapy, *Mol. Med. Rep.* 14 (2016) 2937–2944. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5655>.
- [48] T.L.C. Cezar, R.M. Martinez, C. da Rocha, C.P.B. Melo, D.L. Vale, S.M. Borghi, V. Fattori, J.A. Vignoli, D. Camilios-Neto, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Treatment with maresin 1, a docosahexaenoic acid-derived pro-resolution lipid, protects skin from inflammation and oxidative stress caused by UVB irradiation, *Sci. Rep.* (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39584-6>.
- [49] R.M. Martinez, F.A. Pinho-Ribeiro, V.S. Steffen, C. V. Caviglione, J.A. Vignoli, D.S. Barbosa, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice, *J. Nat. Prod.* 78 (2015) 1647–1655. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00198>.
- [50] J.M. Robinson, T. Ohira, J.A. Badwey, Regulation of the NADPH-oxidase complex of phagocytic leukocytes. Recent insights from structural biology, molecular genetics, and microscopy, *Histochem. Cell Biol.* 122 (2004) 293–304. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0672-2>.
- [51] W.A. Verri, T.M. Cunha, C.A. Parada, S. Poole, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira, Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development?, *Pharmacol. Ther.* 112 (2006) 116–138. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.04.001>.
- [52] V. Witko-Sarsat, P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, L. Halbwachs-Mecarelli, Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects, *Lab. Investig.* 80 (2000) 617–653. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780067>.
- [53] J.W. Penn, A.O. Grobbelaar, K.J. Rolfe, The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review., *Int. J. Burns Trauma.* 2 (2012) 18–28.
- [54] G.M. Halliday, Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 571

- (2005) 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.09.013>.
- [55] R.J. Moore, D.M. Owens, G. Stamp, C. Arnott, F. Burke, N. East, H. Holdsworth, L. Turner, B. Rollins, M. Pasparakis, G. Kollias, F. Balkwill, Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis, *Nat. Med.* (1999). <https://doi.org/10.1038/10552>.
- [56] A. Loboda, M. Damulewicz, E. Pyza, A. Jozkowicz, J. Dulak, Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism, *Cell. Mol. Life Sci.* 73 (2016) 3221–3247. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0>.
- [57] E. Fernández-García, Skin protection against UV light by dietary antioxidants, *Food Funct.* 5 (2014) 1994. <https://doi.org/10.1039/C4FO00280F>.
- [58] C.N. Serhan, J. Dalli, S. Karamnov, A. Choi, C. Park, Z. Xu, R. Ji, M. Zhu, N.A. Petasis, Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain, *FASEB J.* (2012). <https://doi.org/10.1096/fj.11-201442>.
- [59] J. Vostalova, A.R. Svobodova, A. Galandakova, J. Sianska, D. Dolezal, J. Ulrichova, Differential modulation of inflammatory markers in plasma and skin after single exposures to UVA or UVB radiation in vivo, *Biomed. Pap.* 157 (2013) 137–145. <https://doi.org/10.5507/bp.2013.036>.
- [60] V. Molho-Pessach, M. Lotem, Ultraviolet radiation and cutaneous carcinogenesis, *Curr. Probl. Dermatol.* (2007). <https://doi.org/10.1159/0000106407>.
- [61] N. Chiang, G. Fredman, F. Bäckhed, S.F. Oh, T. Vickery, B.A. Schmidt, C.N. Serhan, Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements, *Nature.* 484 (2012) 524–528. <https://doi.org/10.1038/nature11042>.
- [62] F.Y. Yamacita-Borin, A.C. Zarpelon, F.A. Pinho-Ribeiro, V. Fattori, J.C. Alves-Filho, F.Q. Cunha, T.M. Cunha, R. Casagrande, W.A. Verri, Superoxide anion-induced pain and inflammation depends on TNF α /TNFR1 signaling in mice, *Neurosci. Lett.* 605 (2015) 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.08.015>.
- [63] V. Fattori, K.G. Serafim, A.C. Zarpelon, S.M. Borghi, F.A. Pinho-Ribeiro, J.C. Alves-Filho, T.M. Cunha, F.Q. Cunha, R. Casagrande, W.A. Verri Jr.,

- Differential regulation of oxidative stress and cytokine production by endothelin ETA and ETB receptors in superoxide anion-induced inflammation and pain in mice, *J Drug Target.* (2016) 1–27. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2016.1245308>.
- [64] M. a Grimbaldston, A. Simpson, J.J. Finlay-Jones, P.H. Hart, The effect of ultraviolet radiation exposure on the prevalence of mast cells in human skin., *Br. J. Dermatol.* 148 (2003) 300–6. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05113.x>.
- [65] M. Krystel-Whittemore, K.N. Dileepan, J.G. Wood, Mast cell: A multi-functional master cell, *Front. Immunol.* 6 (2016). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00620>.
- [66] D. Baram, G.G. Vaday, P. Salamon, I. Drucker, R. Hershkovich, Y.A. Mekori, Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF- α , *J. Immunol.* 167 (2001) 4008–4016. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.7.4008>.
- [67] I. Rahman, S.K. Biswas, L.A. Jimenez, M. Torres, H.J. Forman, Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation, *Antioxidants Redox Signal.* 7 (2005) 42–59. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.42>.
- [68] V. Maresca, E. Flori, S. Briganti, E. Camera, M. Cario-André, A. Taïeb, M. Picardo, UVA-Induced Modification of Catalase Charge Properties in the Epidermis Is Correlated with the Skin Phototype, *J. Invest. Dermatol.* 126 (2006) 182–190. <https://doi.org/10.1038/SJ.JID.5700021>.
- [69] M. Kobayashi, M. Yamamoto, Molecular Mechanisms Activating the Nrf2-Keap1 Pathway of Antioxidant Gene Regulation, *Antioxid. Redox Signal.* 7 (2005) 385–394. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.385>.
- [70] H. Wang, L. Mao, L. Qiao, X. Wang, Disruption of Nrf2 enhances the upregulation of nuclear factor-kappaB activity, tumor necrosis factor- α , and matrix metalloproteinase-9 after spinal cord injury in mice, *Mediators Inflamm.* 2010 (2010). <https://doi.org/10.1155/2010/238321>.
- [71] J.Y. Choi, D.I. Choi, J.B. Lee, S.J. Yun, D.H. Lee, J.B. Eun, S.C. Lee, Ethanol extract of peanut sprout induces Nrf2 activation and expression of antioxidant and detoxifying enzymes in human dermal fibroblasts: Implication for its protection against UVB-irradiated oxidative stress,

- Photochem. Photobiol. 89 (2013) 453–460. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01244.x>.
- [72] J. Listopad, K. Asadullah, C. Sievers, T. Ritter, C. Meisel, R. Sabat, W.D. Döcke, Heme oxygenase-1 inhibits T cell-dependent skin inflammation and differentiation and function of antigen-presenting cells, *Exp. Dermatol.* 16 (2007) 661–670. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00581.x>.
- [73] R.M. Martinez, F.A. Pinho-Ribeiro, V.S. Steffen, C. V. Caviglione, D. Pala, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Topical formulation containing hesperidin methyl chalcone inhibits skin oxidative stress and inflammation induced by ultraviolet B irradiation, *Photochem. Photobiol. Sci.* 15 (2016) 554–563. <https://doi.org/10.1039/C5PP00467E>.
- [74] C.J. Harvey, R.K. Thimmulappa, A. Singh, D.J. Blake, G. Ling, N. Wakabayashi, J. Fujii, A. Myers, S. Biswal, Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2009) 443–453. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.040>.

5.2 EFFICACY OF TOPICAL FORMULATION CONTAINING RVD5 AGAINST ULTRAVIOLET B IRRADIATION-INDUCED SKIN INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS IN MICE

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

Priscila Saito^a, Ingrid Caroline Pinto^a, Camilla Carolina Arriero Rodrigues^a, Ricardo Luís Nascimento de Matos^a, David Laios do Vale^a, Cristina de Paula Barros de Melo^a, Ana P. F. R. L. Bracarense^b, Marcela M. Baracat^a, Sandra R. Georgetti^a, Waldiceu Aparecido Verri Jr^c, Rúbia Casagrande^{*a}

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

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

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

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

Highlights

- Topical formulation containing RvD5 (RvD5-TF) protects the skin from the deleterious effects of UVB irradiation.
- RvD5-TF inhibits UVB-induced inflammatory edema and neutrophil recruitment.
- RvD5-TF suppress the secretion of MMP-9 induced by UVB-irradiation.
- RvD5-TF inhibits UVB-induced sunburn cells and mast cells counts
- RvD5-TF inhibits UVB-induced skin oxidative stress

Abbreviations

ABTS	2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ANOVA	one-way analysis of variance
CAT	catalase
DHA	docosahexaenoic acid
DMSO	dimethylsulfoxide
DTNB	5,5' – dithiobis (2 - nitrobenzoic acid)
FRAP	ferric reducing antioxidant power assay
GSH	reduced glutathione
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
HTAB	hexadecyltrimethylammonium bromide
IL	interleukin
KOH	potassium hydroxide
LOOH	lipid hydroperoxides
LPO	lipid peroxidation
MMP	matrix metalloproteinase
MPO	myeloperoxidase

mRNA	messenger ribonucleic acid
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBT	nitroblue tetrazolium
NF-κB	nuclear factor-κB
O ₂ ^{•-}	superoxide anion
QL	chemiluminescence
ROS	reactive oxygen species
RvD5	resolvin D5
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error mean
SOD	superoxide dismutase
TGF - β	transforming growth factor <i>beta</i>
TNF - α	tumor necrosis factor - α
UV	ultraviolet

Abstract:

Ultraviolet (UV) irradiation contributes to various skin diseases, including inflammation, premature aging, and cancer. RvD5 is a lipid mediator that has already demonstrated anti-inflammatory and pro-resolution effects against the damage caused by UVB radiation. However, it remains to be determined if a topical formulation containing RvD5 (RvD5-TF) can inhibit inflammatory and oxidative UVB-triggered alterations in the skin. Thus, the present study aimed to investigate the potential of topical formulation with RvD5 to inhibit UVB-induced inflammation and oxidative damage in the skin of hairless mice. It was observed that RvD5-TF (0.01 ng/mouse) reduced UVB-induced inflammatory parameters mensurated by skin edema, myeloperoxidase activity, matrix metalloproteinase 9 activity, and histological parameters (collagen degradation, epidermal thickness, sunburn cells, and mast cell counts). RvD5-TF also inhibited UVB-induced oxidative stress parameters evaluated by reduction catalase activity, hydroperoxide formation, and superoxide anion production. Therefore, RvD5-TF inhibited UVB-induced skin oxidative stress and inflammation, rendering this resolving lipid mediator a promising therapeutic agent.

Keywords: specialized pro-resolving mediators, photoaging, lipid mediator

1. Introduction

The skin is the largest organ in the human body and acts as a protective physical barrier between the body and environmental stressors, such as pathogens and ultraviolet radiation (UV) [1,2]. Sunlight is vital to life on Earth; however, excessive exposure to sunlight is associated with photoaging, immunosuppression, and skin cancer development [3,4].

UV induces the production of reactive oxygen species (ROS) and consequent oxidative stress [4]. The increased production of ROS leads to an oxidative imbalance with resultant damage to cellular components, such as proteins, lipids, and DNA [5,6]. The UVB spectrum is considered the most damaging and harmful UV radiation for the human skin [7–9] because UVB causes direct DNA damage [10].

In addition, UV radiation induces the release of a cascade of cytokines, vasoactive and neuroactive mediators in the skin. Together, these mediators promote the inflammatory response leading to the occurrence of sunburn [1,11]. A component of this response is the attraction to the epidermis of different cell types, such as neutrophils and macrophages [12]. The presence of neutrophils represents an additional source of ROS that tends to contribute to the intensification of tissue damage and inflammation [11].

Resolvin D5 (RvD5) is a lipid mediator known for its anti-inflammatory effects and pro-resolution abilities in some disease models. RvD5 is derived from docosahexaenoic acid (DHA) by enzymatic conversion catalyzed by 5-lipoxygenase [13]. These lipid mediators have been a significant focus in recent years. Their actions include a potent antiarthritic effect that consists of regulating both neutrophil and macrophage responses in inflammatory arthritis. An arthritis study in mice showed that RvD5 mediators could protect against weight loss (a marker of disease severity), limit joint edema, and reduce joint concentrations of the inflammation-initiating prostaglandins. In addition, the same study has demonstrated that RvD5 administration reduced intestinal inflammation linked with increased intestinal barrier permeability. This increase is induced by the decrease of levels of RvD5 in inflammatory arthritis [14].

In another study, RvD5 could counter-regulate pro-inflammatory genes, including NF- κ B and TNF- α , in bacterial infections by *Escherichia Coli*. Besides

that, RvD5 enhanced phagocytosis by polymorphonuclear neutrophils and macrophages, accelerating bacterial clearance [15].

The pro-resolution and anti-inflammatory effects of RvD5 are predominately achieved through G protein-coupled receptor GPR32. Additionally, specific receptors for RvD5 may exist in immune cells (e.g., macrophages) that mediate the reduction of pain induced by the inflammatory process [16,17].

Altogether, it reasonable to think that RvD5 has the potential to reduce the inflammation process and oxidative injury in other diseases. However, there are no studies related to evaluating a topical formulation containing the RvD5 regarding UVB-induced oxidative stress and inflammation. Therefore, this study aimed to assess the potential of RvD5 lipid mediator in a topical formulation as a photochemopreventive agent against UVB damage to the skin.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Resolvin D5 from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA). Brilliant blue R, reduced glutathione (GSH), hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), *o*-dianisidine dihydrochloride, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), nitroblue tetrazolium (NBT), and bisacrylamide were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tert-butyl hydroperoxide from Acros (Pittsburgh, PA, USA). Tris was obtained from Amresco (Solon, OH, USA). ELISA kits for cytokine determination were obtained from eBioscience (San Diego, CA, USA). Acrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS), platinum SYBRGreen, and superscript III kits were obtained from Invitrogen. All other reagents used were from pharmaceutical grade.

2.2. Topical formulation

The topical formulation was an emulsion prepared as described in the Table 1. To prepare the emulsion, the components of phase A (oil phase) and

phase B (water phase) were heated separately at 70 °C. After the fusion of the solids, phase B was poured over phase A, and the two phases were mixed under constant agitation until the temperature reached 45 °C. Phase C (moisturizer) and D (preservative) were then added and mixed. After 24 h, RvD5 was added to the formulation to reach the final concentration of 0.01 ng RvD5/0.5 g of emulsion. RvD5 added to the formulation immediately before use and kept in a refrigerator during the interval between treatments.

Table 1 – Components of the formulation containing RvD5

Raw material	%
(A) Polawax ^{®1} (self-emulsifying wax)	2
Caprylic/capric triglyceride (emolient)	5
(B) Purified water to complet	100
Aristoflex ^{®2} dispersion 5%	20
(C) Propylene glycol (moisturizer)	6
(D) Phenonip (preservative)	0,8
¹ Polawax: nonionic self-emulsifying wax (cetoestearyl alcohol + sorbitan monoestearate – 20 OE);	
² Aristoflex: Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer	

2.3. Animals

In vivo experiments were performed in hairless mice (HRS/J) weighing 20–30 g and obtained from the University Hospital of Londrina State University (UEL), Paraná, Brazil. Mice were maintained at a temperature of 23 ± 2°C and under 12 h light and 12 h dark cycles, with free access to water and food. The experimental protocol for this study was approved by The Animal Ethics Committee of the Londrina State University (CEUA process number 11146.2016.97). All methods were performed according to the relevant guidelines and regulations.

2.4. Experimental protocol

The mice were randomly assigned to four groups with six animals per group. The groups were: non-irradiated control, irradiated control, irradiated treated with emulsion without RvD5, and irradiated treated with 0.01 ng/mouse RvD5-TF.

Mice received topical treatment on the dorsal surface with 0.5 g of the formulation, 1 h, 5 min before, and 5 min after the beginning of UV irradiation. Animals in the control groups received treatment with vehicle (saline) used in the dilution of the drug. The dose of RvD5 used in the treatments was selected based on dose-response curves tested in the present study.

Samples of mice skin were dissected 2 h, 4 h, or 12 h after the irradiation, depending on the assay. Each parameter was evaluated at a specific time point, which was previously determined as suitable to detect significant differences between non-irradiated control and irradiated control groups [18–21].

2.5. Irradiation

The light source for irradiation was a fluorescent UVB lamp model PHILIPS TL/12 40W RS (MEDICAL-NETHERLANDS). The lamp emits radiation in the range of 270 to 400 nm with peak emission at 313 nm. The dose of radiation used was 4.14 J/cm² [22].

The mice were terminally anesthetized with 5% isoflurane (Abbott [Abbott Park, IL, USA]) 2, 4, or 12 h after UVB exposure. The full thickness of the dorsal skins was removed and stored at -80 °C for further analysis. For FRAP, ABTS, GSH, MMP-9, and histology analysis, the animals were terminally anesthetized with 5% isoflurane 12 h after the UVB exposure. The mice were anesthetized with 5% isoflurane, followed by decapitation at 2 h for catalase activity, NBT assays, hydroperoxides production, and 4 h after exposure for cytokine measurement. Each parameter was evaluated at a specific time, which was previously determined [20,22]. The samples were weighed immediately after collection to verify cutaneous edema and fixed in buffered formaldehyde for histology.

2.6. Skin edema

Edema was determined by the variation of skin weight between the different control and treated groups [18]. The dorsal skin samples were collected from the animals with a mold with a fixed area (5 mm diameter) and weighed.

2.7. Myeloperoxidase (MPO) and neutrophil infiltration

Neutrophil infiltration was indirectly determined by MPO activity on the skin after UVB irradiation. MPO catalyzes the oxidation of o-dianisidine to a colored compound [18,22,23].

The skin samples were collected in 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.5% hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HTAB), homogenized with Tissue-Tearor (Biospec 985370) and centrifuged (16,100 g for 2 min at 4°C). The reaction was performed adding 200 µL of 0.0167 mg/mL o-dianisidine in 0,05 M phosphate buffer (pH 6,0) and 0.015% hydrogen peroxide to a 30 µL aliquot of the sample supernatant.

MPO activity was determined spectrophotometrically at 450 nm (EnSpire, Perkin Elmer) and compared to a neutrophil standard curve. Results were expressed as number of neutrophils/mg of skin [24].

2.8. Analyses of skin proteinase substrate-embedded zymography

MMP-9 activity was analyzed by polyacrylamide gel zymography technique with sodium dodecyl sulfate (SDS), a method used to detect and quantify enzymes that degrade the gelatin present in the gel [25,26].

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) substrate-embedded zymography was performed as described previously (Saito et al. 2018). After electrophoresis, the gels were washed with 2.5% Triton X-100 with 0.05 M Tris-HCl (pH 7.4) for 1h on a rotary shaker to remove SDS and allow proteins to renature. In the second stage, gels were then incubated in 0.01 M CaCl₂ overnight at 37 °C. The next day, gels were stained with Brilliant Blue R and destained with 20% acetic acid. The proteolytic activity was analyzed by comparing the intensities of the bands of treated animal group with the controls of the untreated groups using the Image J Program. The zones of enzymatic

activity were detected as regions of negative staining against a dark background. We analyzed 5 gels in total, and each one presented the results of pools of 6 mice per group (NIH, Bethesda, MD, USA) [24,27].

2.9. FRAP and ABTS assay

For both tests, the samples were homogenized in 1.15% KCl using a Tissue-Tearor (Biospec), and centrifuged (1,000 g, 10 min, 4°C). For FRAP assay, the supernatant (30 μ L) was mixed with the FRAP reagent (0.3 mM acetate buffer pH 3.6, 10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine in 40 mM hydrochloride acid, and 20 mM ferric chloride). The ferric reducing ability was determined at 595 nm in a microplate reader. For the ABTS assay, the supernatant (7 μ L) was mixed with ABTS reagent (7 mM of ABTS and 2.45 mM of potassium persulfate) in phosphate buffer pH 7. ABTS radical scavenging ability of skin was measured by the decrease in absorbance at 730 nm. The results were compared to a Trolox curve (0.01-20 nmol) and presented as nmol Trolox equivalent per mg of skin [28].

2.10. Quantification of the endogenous antioxidant reduced glutathione (GSH)

GSH method is based on the detection of the yellow compound 5-mercapto-2-nitrobenzoic acid formed by 5',5'-dithyobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) breakage of disulfide bond by glutathione sulfhydryl group [29].

Skin samples were homogenized in 0.02 M EDTA using Tissue-Tearor (Biospec 985370). Briefly, whole homogenates were treated with 50% trichloroacetic acid and centrifuged at 2,700 g for 10 min at 4°C. The supernatant was removed and recentrifuged at 2,700 g for a further 15 min at 4°C. The final supernatant was removed for analysis. For the assay, 50 μ L of the supernatant was mixed with 100 μ L of 0.4 M Tris buffer pH 8.9 and 5 μ L of a 1.9 mg/mL solution of DTNB in methanol. The absorbance was measured at 405 nm (EnSpire, Perkin Elmer). One standard curve of GSH (5 –150 μ M) was utilized

for data analysis. The results were expressed as μM of GSH per mg of skin [24,28,29].

2.11.Catalase assay

Catalase activity was evaluated by measuring the decay of H_2O_2 concentration with resulting oxygen generation [30]. Samples were homogenized in 500 μL of 0.02 M EDTA using a Tissue-Tearor (Biospec), and centrifuged twice (2,700 g, 10 min, 4°C). 10 μL of supernatants was mixed with 160 μL 1M Tris-HCl buffer with 5 mM EDTA (pH 8.0), 20 μL of deionized water, and 20 μL of 200 mM of H_2O_2 . Catalase activity was determined at 25 °C through the difference between the initial reading and the reading conducted 30 seconds after the addition of H_2O_2 at 240 nm. Catalase values were expressed as units of catalase/mg of skin/minute [24].

2.12.Assay for lipid peroxidation (LPO)

LOOH-initiated chemiluminescence (QL) was determined according to an adaptation of the technique described previously [31]. The method is based on the determination of the chemiluminescence initiated by the tert-butyl hydroperoxide [31]. An increase in QL associated with oxidative stress leads to the consumption of the antioxidant defenses from the formation of hydroperoxides [21].

The dorsal skin samples were homogenized in 800 μL of phosphate buffer (pH 7.4) using a Tissue-Tearor (BIOSPEC 985370) and centrifuged at 700 g for 2 min at 4°C. For the assay, 70 μL of the supernatant was diluted to 420 μL of monobasic potassium phosphate buffer 20 mM (120 mM KCl, 30 mM phosphate buffer pH 7.4), 20 μL of 10 μL tert-butyl hydroperoxide, and 10 μL of luminol. The reading was conducted with Glomax® TD 20/20 luminometer (PROMEGA, USA) using 1200 reading points. The experiment was performed at 30°C for 20 min in the dark to avoid vial phosphorescence activated by light. The results were measured in counts per min (cpm) per mg of skin.

2.13. Superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) production

The measurement of $O_2^{\cdot-}$ production in the skin was performed using the NBT assay [22].

Skin samples were homogenized in 500 μ L of 0.02 M EDTA, using a Tissue-Tearor (Biospec), and centrifuged (2,000 g, 20 seconds, 4°C). For the reaction, 50 μ L of the supernatant was incubated in a 96-well plate for 1 h. The nonadherent/non-precipitated supernatant was carefully removed, followed by adding 100 μ L of NBT (1 mg/ml) to each well and incubating for 15 min. The NBT was then carefully removed and fixed in methanol 100% (20 μ L). The compound formed by the reduction of NBT (formazan) was solubilized by adding 120 μ L of KOH 2M and 140 μ L of dimethylsulfoxide (DMSO). Reading was performed at 620 nm. Results are expressed as NBT reduction (OD/ 10 mg of skin) [22,24].

2.14. Skin histologic evaluation

Skin samples were fixed in buffered formaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned (5 μ m). For collagen fiber analysis, the sections were stained with Masson's trichrome stain. Collagen fibers density was analyzed by the intensity of the blue coloration in the dermal areas examined using light microscopy at a magnification of 100x. UVB unexposed and exposed controls were compared to the RvD5 treated group with the aid of Image J software (Lumenera® Software). Tissue sections were also stained with hematoxylin and eosin (H & E) for determination of epidermal thickness [32] and for counting the number of sunburn cells [33] using light microscopy at a magnification of 400x and 1000x respectively. Both analyses were done with the software Infinity Analyze (Lumenera® Software) [24].

2.15. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparisons test.

Results were presented as mean \pm standard error (SEM) of measurements made with 6 animals in each group per experiment. The results were representative of 2 separate experiments and were considered significantly different at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. RvD5-TF reduces UVB irradiation-induced edema and myeloperoxidase (MPO) activity in the skin of hairless mice.

Exposure to UVB irradiation stimulates the inflammatory response, causing edema and inducing the recruitment of neutrophils [34]. Based on that, the anti-inflammatory action of RvD5-TF was first assessed by the edema assay and MPO activity (neutrophil marker). As shown in Figure 1A, UVB irradiation induced significant skin edema, which was significantly inhibited by treatment with RvD5-TF 0.01 ng/mouse. Recently it was reported that activation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway is necessary for initiating the acute pathological effects UV-induced in the epidermis. VEGF is a potent vascular permeability factor mainly produced by epidermal keratinocytes and fibroblasts. It is upregulated following UV exposure in mice and it induces edema, erythema, epidermal hyperplasia, and increased vascularity. Also, it causes edema and the related immediate impact on the skin while working concomitantly with reactive oxygen species to induce inflammation [35]. The production of VEGF is modulated by prostaglandin E₂ (PGE₂). This prostaglandin is released by skin cells after skin irradiation and it is important in the inflammatory angiogenesis process and the promotion of skin tumors [36]. It has been reported that RvD5 reduces PGE₂ in the inflammatory arthritis model [14]. Thereby, our results are in accordance with the literature.

The MPO activity is an enzymatic assay that indirectly indicates the migration of neutrophils to the skin and reflects the MPO activity in these cells [27,28]. Neutrophils are the first cells to migrate to the injury site [37]. These phagocytes produce large amounts of pro-inflammatory cytokines and ROS [23], like superoxide anion (O₂⁻) via activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 2. The additional production of ROS contributes to

the intensification of the inflammatory process and tissue damage [38]. As observed with edema (Figure 1A), RvD5-TF 0.01 ng/mouse inhibited MPO activity in the skin (Figure 1B). The neutrophils, when exposed to UV radiation, trigger a number of mechanisms that can potentially destroy surrounding tissues and lead to the photoaging effects of the skin [39]. The treatment with lipid mediator RvD5 minimized skin inflammation by reducing inflammatory mediators, such as cytokines and $O_2^{\cdot-}$ produced by neutrophils.

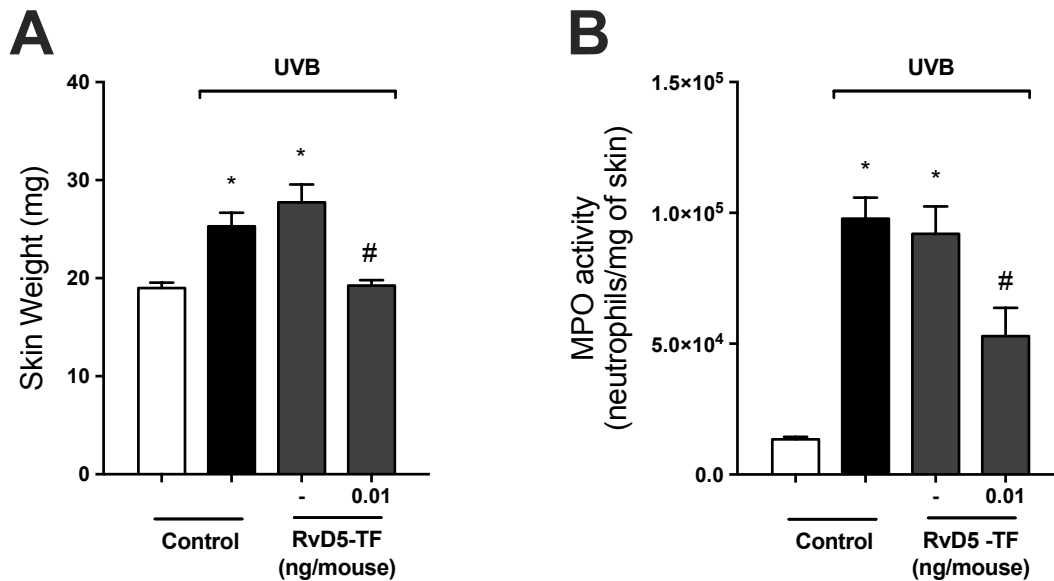


Figure 1 – RvD5-TF reduces UVB irradiation-induced skin edema and MPO activity. The skin inflammation was determined in samples collected 12 h after the end of irradiation. Skin edema (A) and MPO activity (B). Bars represent means \pm SEM of 6 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey’s test [* $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; # $p < 0.05$ compared to the irradiated control group and irradiated and treated with emulsion without RvD5 (vehicle)].

3.2. RvD5-TF reduces UVB irradiation-induced MMP-9 activity and collagen fibers in the skin of hairless mice

MMPs play a crucial role in photocarcinogenesis, regulating several processes related to tumor progression, including tumor initiation, growth,

angiogenesis, and metastasis [40]. In addition, overproduction of MMP-9 contributed to premature skin aging [41].

MMP-9 is a gelatinase that depends on the activation of AP-1 to be expressed. MMP-9 is secreted predominantly by neutrophils, mast cells, and macrophages and has proteolytic activity against the main component of the basement membrane, type IV collagen [40].

Cumulative exposure to UVB radiation induces the generation of excess ROS in the skin, leading to increased activity of the AP-1 and a consequent increase in the expression of MMPs, specifically MMP-1, MMP-3, and MMP-9, which leads to the continuous degradation of MEC proteins and a reduced rate of collagen renewal/synthesis [40,42].

Dysregulation of MMP-9 is associated with inflammatory skin diseases and the invasive and metastatic potential of cancer cells [43]. Thus, we used SDS-PAGE zymography to analyze the effects of RvD5-TF on skin MMP-9 activity after exposure to UVB irradiation. As shown in Figure 2, UVB exposure induced a significant increase in MMP-9 activity in the skin of hairless mice. RvD5-TF 0.01 ng/mouse significantly inhibited this elevated activity.

Collagen degradation was evaluated using the blue color intensity in dermal areas of the skin as an indicator of collagen fiber density [24]. As shown in Figure 3, UVB exposure induced collagen degradation, and RvD5-TF 0.01 ng/mouse inhibited this degradation. This result is in agreement with inhibited MMP-9 activity with RvD5-TF shown in Figure 2. MMP-9 is a proteolytic enzyme that degrades extracellular matrix collagen during pathological processes such as photoaging [44] induced by UVB exposure. Therefore, RvD5 protected the skin from UVB irradiation-induced tissue alterations such as collagen degradation.

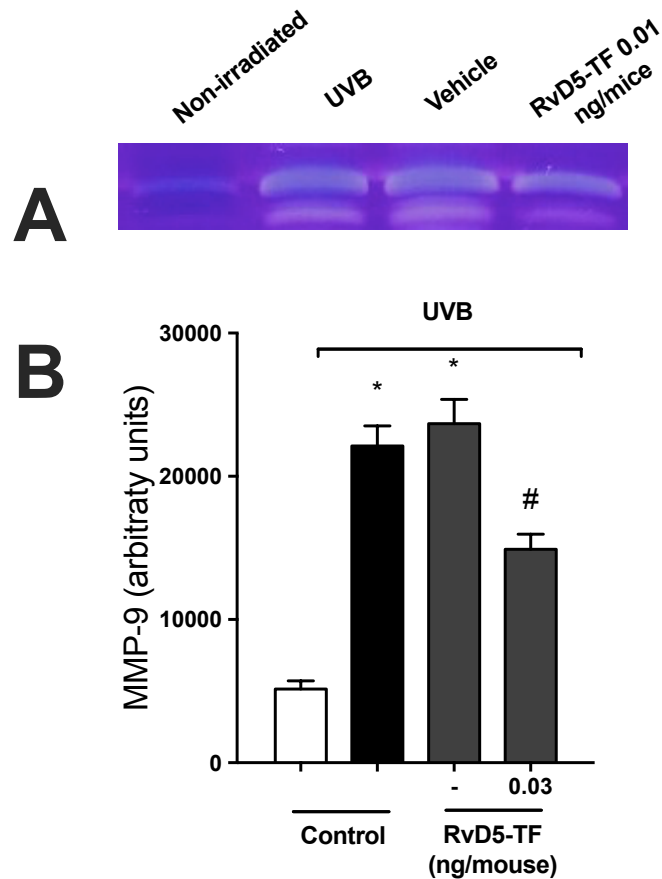


Figure 2. RvD5-TF inhibits UVB irradiation-induced increase of MMP-9 activity. The MMP-9 activity was determined in samples collected 12 h after the end of irradiation. Images of gelatin zymography (A) and bars represent means \pm SEM of 6 mice per group per experiment (B) and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test [$*p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; $\#p < 0.05$ compared to the irradiated control group and irradiated and treated with emulsion without RvD5 (vehicle)].

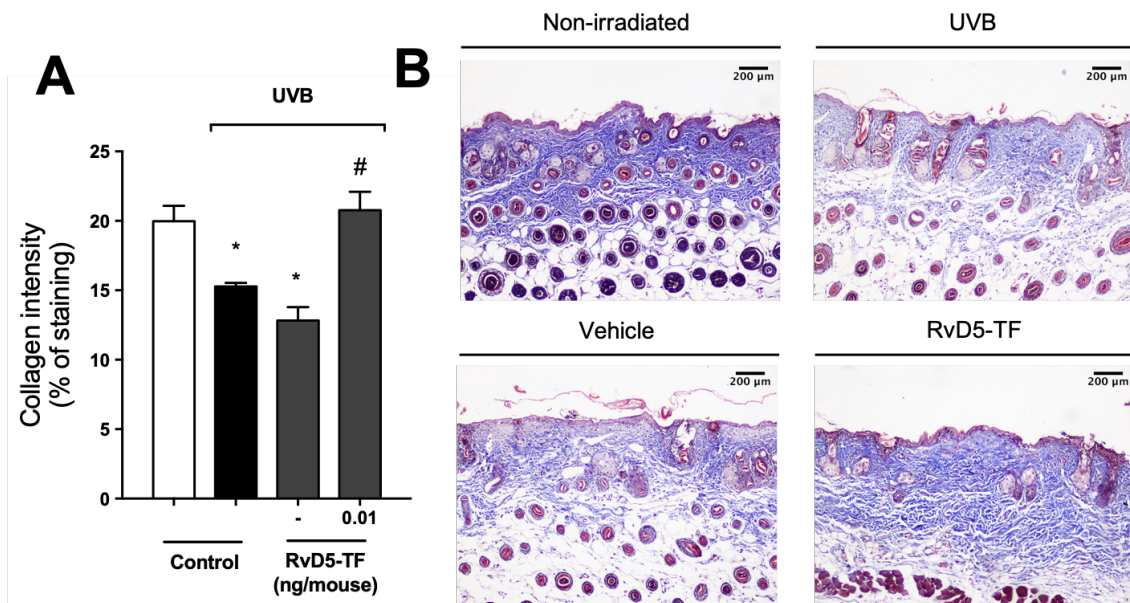


Figure 3 – RvD5-TF inhibits UVB irradiation-induced collagen fibers damage to the skin of hairless mice. Collagen fiber formation was evaluated using Masson's trichrome staining in skin samples collected 12 h after the end of irradiation. Collagen fiber intensity (A) and bundles are shown in blue were analyzed by the Image J Program (100x magnification). Bars are representative of two separate experiments and represent means \pm SEM of 6 mice per group per experiment (B). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test [$*p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; $\#p < 0.05$ compared to the irradiated control group and irradiated and treated with emulsion without RvD5 (vehicle)].

3.3. RvD5-TF reduces the UVB irradiation-induced depletion of antioxidant capacity in the skin of hairless mice.

UVB irradiation produces ROS directly and indirectly via inflammatory response [45]. Excessive production of ROS causes depletion of the skin's natural antioxidants, limiting the self-protecting capacity of the cells and resulting in oxidative stress [42,46]. Oxidative stress can lead to cell damage (e.g., lipid peroxidation and DNA fragmentation, apoptosis, and death [47]).

ROS plays a critical role in the photoaging of human skin, in addition to being responsible for various types of skin cancers and other inflammatory skin disorders [48,49].

The antioxidant potential of RvD5-TF 0.01 ng/mouse against the UVB-induced oxidative damage to the skin was evaluated by: FRAP (Figure 4A), ABTS (Figure 4B), and GSH levels (Figure 4C).

The ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay correlates well with the levels of antioxidants ascorbic acid, uric acid, and α -tocopherol [50]. In contrast, 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging capacity reflects the levels of endogenous antioxidant reduced glutathione (GSH) [45]. As described previously, in both assays, UVB exposure promoted a decrease of FRAP and ABTS scavenging capacity in the skin [24,28]. Treatment with RvD5-TF 0.01 ng/mouse maintained the antioxidant capacity near basal levels (Figure. 4A and 4B).

GSH is one of the most important endogenous antioxidant molecules. It is a hydrophilic tripeptide with sulfhydryl groups that neutralize free radicals through electron donation [1,51]. The loss of cell viability mediated by UVB radiation is associated with a marked decrease in the GSH levels that may predispose the cell to oxidative stress [52,53]. Several reports indicate that tissue injury induced by UV irradiation results in GSH depletion [54]. The dose of UVB irradiation used here was able to reduce significantly the GSH levels in the skin, which corroborates the results of the ABTS assay described above. RvD5-TF 0.01 ng/mouse was capable of inhibiting GSH depletion. Our finding showed that RvD5-TF increases redox status as indicated by enhanced GSH levels.

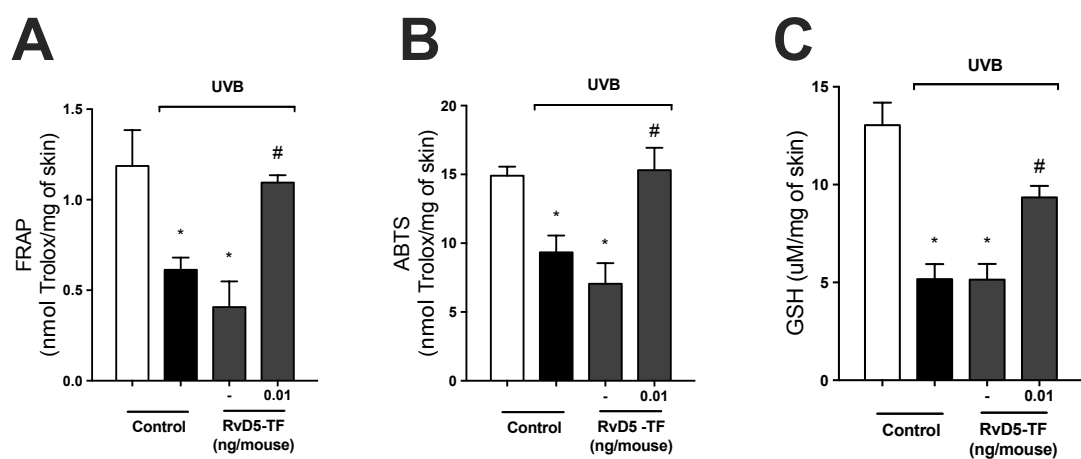


Figure 4. Effect of RvD5-TF on antioxidant capacity of skin after UVB irradiation. The antioxidant capacity was determined by FRAP (A), ABTS (B), and GSH (C) assays in samples collected 12 h after the end of irradiation. Bars represent means \pm SEM of 6 mice per group and are representative of two separate experiments [*p < 0.05 compared to the nonirradiated control group; # p < 0.05 compared to the irradiated control group and irradiated and treated with emulsion without RvD5 (vehicle)].

3.4. RvD5-TF prevents UVB irradiation-induced catalase (CAT) depletion, lipid peroxidation (LPO), and $O_2^{\cdot-}$ production in the skin of hairless mice

CAT is one of the main H_2O_2 -scavenging enzymes. It catalyzes the conversion of H_2O_2 into water and O_2 [55]. UVB exposure decreases the activity of this protective enzyme in normal cells [56] by 10-30% [57]. This effect is probably due to the depletion of the enzyme both by UV radiation itself and by UV-related ROS [57]. When irradiated with UV, skin is depleted of antioxidants, among which CAT is the most sensitive [58]. In agreement with previous studies [20,24,59], our data demonstrate that UVB irradiation exposure reduced CAT activity in hairless mice. Treatment with RvD5-TF 0.01 ng/mouse reversed this effect. The decrease in CAT activity can be very harmful because its recovery is slow and, while the enzyme's activity remains low, UV pro-oxidant agents can promote structural damage to the enzyme, which will decrease its functionality even further. [58]. The reduction of CAT activity results in H_2O_2 accumulated in the cell. It damages several structures, including, as mentioned before, the

enzyme itself [58]. Therefore, our studies demonstrated that RvD5-TF is a pathway to block the effects of oxidative stress in the skin.

In the presence of UVB irradiation, excessive ROS production causes massive LPO leading to the generation of oxidation products that are toxic to biomolecules [60]. LPO is an important organic parameter of oxidative stress [61] and It was measured by the formation of hydroperoxides [62]. We observed that UVB exposure induced a significant increase in skin LPO, which was inhibited by RvD5-TF (Figure 5B). LPO has been implicated as a deleterious factor in various diseases, including carcinogenesis, mutagenesis, atherosclerosis, and aging. Many toxic aldehydes are produced from skin lipids upon UV irradiation exposure and exert their toxic action by reacting with biological nucleophiles [63], also leading to DNA damage [62]. Therefore, our data indicate that RvD5-TF is important to protect skin from UV damage caused by lipid peroxidation.

$O_2^{\cdot-}$ is a mutagen and tumor promoter produced by NADH and NADPH in the presence of O_2 and UV radiation. Active oxygen species produced by UV are in part responsible for sunburn cell formation [64]. The initial free radical machinery involves enzyme superoxide dismutase (SOD), which converts $O_2^{\cdot-}$ directly to hydrogen peroxide (H_2O_2) and diatomic oxygen. Then, hydrogen peroxide is converted by catalase to the harmless product water. Nevertheless, SOD activity decreases by 50-60% after UV exposure [57]. There was a significant increase in $O_2^{\cdot-}$ production in the skin of irradiated mice, which was inhibited by RvD5-TF (Figure 5C).

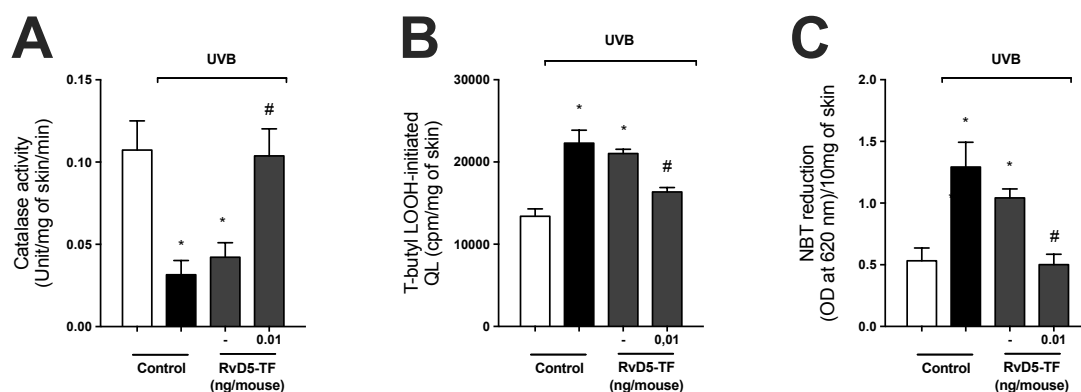


Figure 5. RvD5-TF treatment prevents UVB irradiation-induced catalase (CAT) depletion and lipid hydroperoxides (LOOH) and superoxide anion production. The

CAT activity (A), tert-butyl LOOH-initiated chemiluminescence (QL) (B) and nitroblue tetrazolium (NBT) reduction (C) were determined in samples collected 2, 4, and 2 h after the end of irradiation, respectively. Bars represent means \pm SEM of 6 mice per group and are representative of two separate experiments [$*p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; $\#p < 0.05$ compared to the irradiated control group and irradiated treated with emulsion without RvD5 (vehicle)].

3.5. RvD5-TF prevents UVB irradiation-induced epidermal thickness and sunburn cells in the skin of hairless mice

After UVB exposure, keratinocytes undergo apoptosis (sunburn cells) if the damage is sufficiently large and exceeds the cell recovery limit [1]. Apoptosis is the major mechanism preserving cell homeostasis and thus preventing skin carcinogenesis [65]. UVB causes DNA fragmentation in keratinocytes [33], and DNA-damaged cells are prone to undergo subsequently malignant transformation [65].

Histologically, sunburn cells present altered morphology as observed by chromatin condensation and eosinophilic cytoplasm [66]. UVB irradiation increased the number of sunburn cells and RvD5-TF (0.01 ng/mouse) significantly reduced sunburn cell counts (Figure 6). UVB radiation induces the release of TNF- α by keratinocytes. TNF- α cytokine is an important mediator of immunity and inflammation. It has also the ability to kill growing tumor cells and it might be involved in the generation of sunburn cells since keratinocytes express the 55-kD receptor for TNF- α . Schwarz *et al.* have concluded that TNF- α contributes to the formation of sunburn cells, but it does not seem to be the only mechanism involved. Keratinocytes also release a variety of cytokines which may contribute as well. Therefore, the study supports the concept that UVB-induced formation of sunburn cells and apoptosis is a multifactorial event [33]. Also, the reduction in the number of sunburn cells indicates an increase in the photoprotection of keratinocytes by RvD5-TF.

Hours after the exposure to UV, the signs of damage response decrease, and epidermal keratinocytes begin to proliferate intensely, mediated by various epidermal growth factors. Increased cell division of keratinocytes after exposure

to UV causes epidermal thickening [67]. UVB irradiation induced significant epidermal thickening compared to the non-irradiated control group. This effect was inhibited by RvD5-TF (0.01 ng/mouse) treatment (Figure 7).

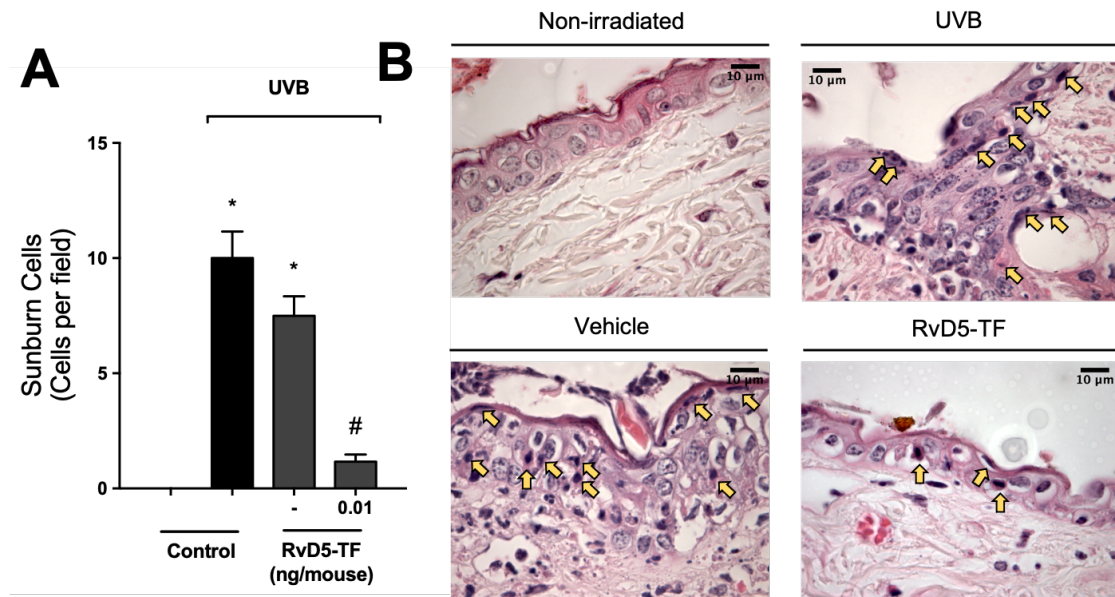


Figure 6. RvD5-TF reduces UVB radiation-induced sunburn cells. Sunburn cells were evaluated using hematoxylin and eosin staining (H & E) in skin samples collected 12 h after the end of irradiation. The sections stained with H & E were examined using light microscopy at 1000x magnification. Bars are representative of two separate experiments and represent means \pm SEM of 6 mice per group per experiment. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test [$*p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; $\#p < 0.05$ compared to the irradiated control group and irradiated and treated with emulsion without RvD5 (vehicle)].

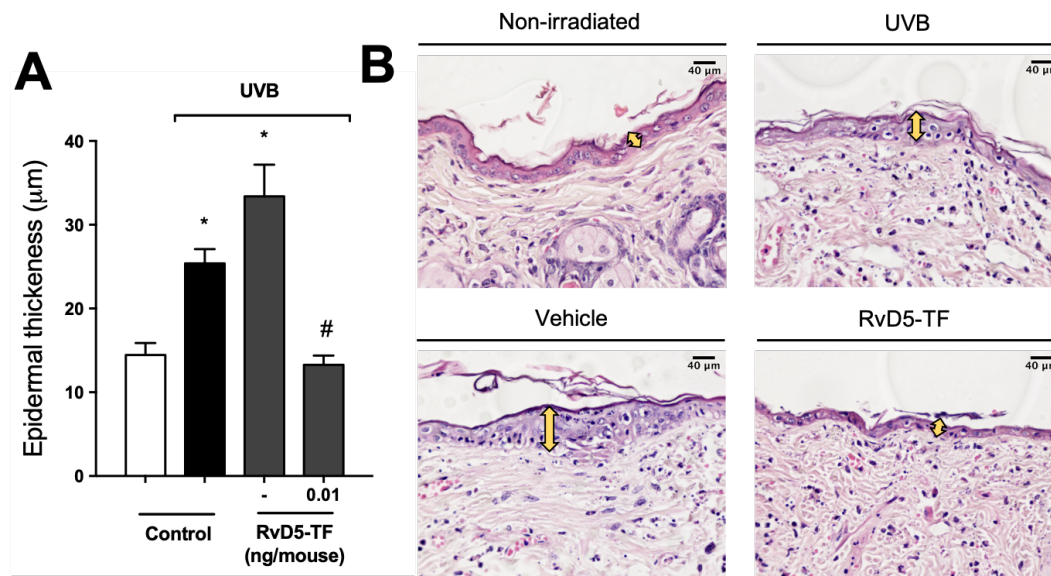


Figure 7. RvD5-TF reduces UVB radiation-induced epidermal thickness. Epidermal thickness was evaluated using hematoxylin and eosin staining (H & E) in skin samples collected 12 h after the end of irradiation. The sections stained with H & E were examined using light microscopy at 400x (A) magnification. Bars are representative of two separate experiments and represent means \pm SEM of 6 mice per group per experiment (B). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test [$*p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; $\#p < 0.05$ compared to the irradiated control group and irradiated and treated with emulsion without RvD5 (vehicle)].

3.6. RvD5-TF reduces UVB irradiation-induced mast cell counts in the skin of hairless mice

UVB irradiation stimulates mast cells to secrete mediators that trigger inflammation and recruit other leukocytes such as neutrophils [68]. Histamine is the main biogenic amine in mast cells and is related to systemic immunosuppression induced by UVB irradiation [69]. UVB exposure caused a significant increase of mast cells compared to basal conditions of the non-irradiated control group, and RvD5-TF (0.01 ng/mouse) significantly reduced mast cell counts (Figure 8). Also, it is possible that RvD5-TF also inhibits the function of the mediators released by mast cells. Hart *et al.* have shown that the downregulation of systemic immune responses in mice after UVB exposure is

directly correlated with the prevalence of histamine-containing dermal mast cells. The suppression of the immune system provides a mechanism by which UV-induced tumors escape immune destruction [69]. Histamine may directly influence the migration of immune cells into the UV-irradiated site, or to nearby lymph nodes, and regulate their proliferation and cytokine profiles [70–72]. Furthermore, it has been reported that the mast cells degranulate in response to direct contact with activated T cells and produce TNF- α in the inflammatory process. TNF- α is a cytokine triggering inflammatory responses that occur in the skin and it is involved in the up-regulation of MMP-9 expression [73], as demonstrated by our results (Figure 2).

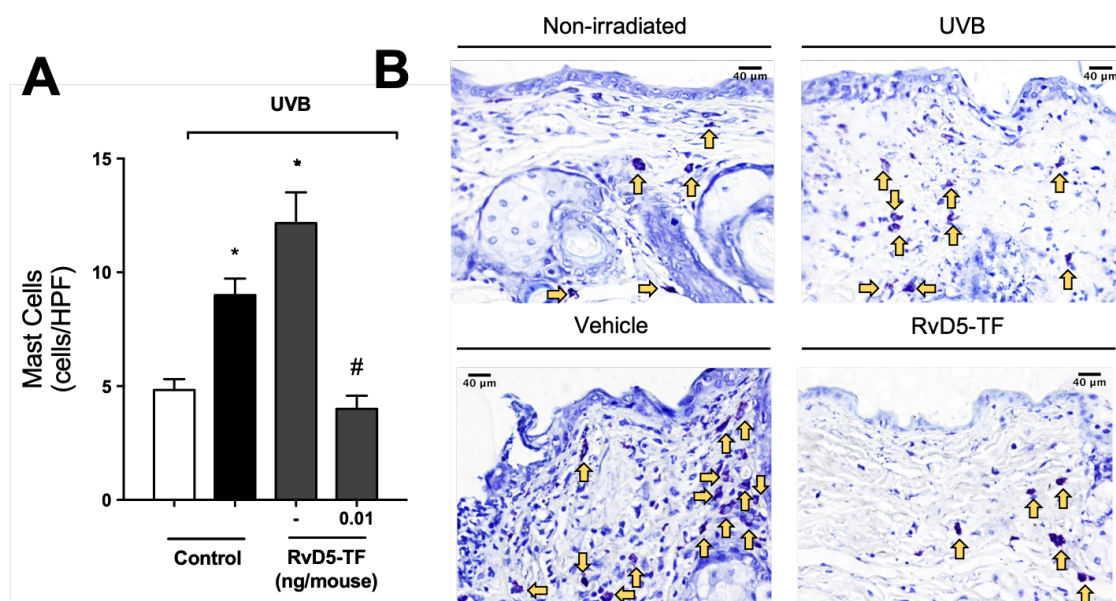


Figure 8 – RvD5-TF reduces UV irradiation-induced mast cell counts. Mast cells were evaluated using blue toluidine in skin samples collected 12 h after the end of irradiation. The number of mast cells (A) and the sections stained with blue toluidine were examined using light microscopy at 400x magnification. Bars are representative of two separate experiments and represent means \pm SEM of 6 mice per group per experiment (B). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey’s test [$*p < 0.05$ compared to the non-irradiated control group; $\#p < 0.05$ compared to the irradiated control group and irradiated and treated with emulsion without RvD5 (vehicle)].

4. Conclusion

The topical treatment with a formulation containing RvD5 protected the skin of hairless mice from the harmful effects of UVB irradiation. RvD5-TF has decreased inflammation markers such as mast cell count, epidermal thickness, sunburn cells, skin weight, and MMP-9 activity. Furthermore, RvD5-TF improved the antioxidant defenses in UVB exposed skin by maintaining ferric reducing ability, ABTS scavenging capacity, glutathione levels, catalase activity, and inhibiting $O_2^{\cdot-}$ radical production. Together, these results suggest that topical treatment with RvD5-containing formulation may be a potential product to prevent and/or treat skin diseases related to UVB exposition.

5. Acknowledgments

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

6. References

- [1] J. D’Orazio, S. Jarrett, A. Amaro-Ortiz, T. Scott, UV radiation and the skin, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 12222–12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>.
- [2] J. Khavkin, D.A.F. Ellis, Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology, *Facial Plast. Surg. Clin. North Am.* 19 (2011) 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2011.04.003>.
- [3] P. Kullavanijaya, H.W. Lim, Photoprotection, *J. Am. Acad. Dermatol.* (2005). <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.07.063>.
- [4] U. Panich, G. Sittithumcharee, N. Rathviboon, S. Jirawatnotai, Ultraviolet radiation-induced skin aging: The role of DNA damage and oxidative stress in epidermal stem cell damage mediated skin aging, *Stem Cells Int.* (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/7370642>.
- [5] O.I. Aruoma, Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants,

- Food Chem. Toxicol. (1994). [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(94\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0278-6915(94)90011-6).
- [6] J.P. Kehrer, Free radicals as mediators of tissue injury and disease, Crit. Rev. Toxicol. (1993). <https://doi.org/10.3109/10408449309104073>.
- [7] F. Afaq, V.M. Adhami, H. Mukhtar, Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis, Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 571 (2005) 153–173. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.07.019>.
- [8] S.A. Figueiredo, F.M.P. Vilela, C.A. Da Silva, T.M. Cunha, M.H. Dos Santos, M.J.V. Fonseca, In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of Garcinia brasiliensis epicarp extract, J. Photochem. Photobiol. B Biol. 131 (2014) 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.01.004>.
- [9] M. Hupel, N. Poupart, E. Ar Gall, Development of a new in vitro method to evaluate the photoprotective sunscreen activity of plant extracts against high UV-B radiation, Talanta. 86 (2011) 362–371. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.09.029>.
- [10] G. Emri, I. Horkay, E. Remenyik, [The role of free radicals in the UV-induced skin damage. Photo-aging]., Orv. Hetil. 147 (2006) 731–735.
- [11] G.J. Clydesdale, G.W. Dandie, H.K. Muller, Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects, Immunol. Cell Biol. 79 (2001) 547–568. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2001.01047.x>.
- [12] V. Witko-Sarsat, P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, L. Halbwachs-Mecarelli, Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects, Lab. Investig. 80 (2000) 617–653. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780067>.
- [13] H.W. Chun, J. Lee, T.H. Pham, J. Lee, J.H. Yoon, J. Lee, D.K. Oh, J. Oh, D.Y. Yoon, Resolvin D5, a Lipid Mediator, Inhibits Production of Interleukin-6 and CCL5 Via the ERK-NF- κ B Signaling Pathway in Lipopolysaccharide-Stimulated THP-1 Cells, J. Microbiol. Biotechnol. (2020). <https://doi.org/10.4014/jmb.1907.07033>.
- [14] M.B. Flak, D.S. Koenis, A. Sobrino, J. Smith, K. Pistorius, F. Palmas, J. Dalli, GPR101 mediates the pro-resolving actions of RvD5n-3 DPA in arthritis and infections, J. Clin. Invest. 130 (2020) 359–373.

- <https://doi.org/10.1172/JCI1131609>.
- [15] N. Chiang, G. Fredman, F. Bäckhed, S.F. Oh, T. Vickery, B.A. Schmidt, C.N. Serhan, Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements, *Nature*. 484 (2012) 524–528. <https://doi.org/10.1038/nature11042>.
- [16] X. Luo, Y. Gu, X. Tao, C.N. Serhan, R.-R. Ji, Resolvin D5 Inhibits Neuropathic and Inflammatory Pain in Male But Not Female Mice: Distinct Actions of D-Series Resolvins in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy, *Front. Pharmacol.* (2019). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00745>.
- [17] O. Werz, J. Gerstmeier, S. Libreros, X. De La Rosa, M. Werner, P.C. Norris, N. Chiang, C.N. Serhan, Human macrophages differentially produce specific resolvin or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity, *Nat. Commun.* (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02538-5>.
- [18] A.L.M. Ivan, M.Z. Campanini, R.M. Martinez, V.S. Ferreira, V.S. Steffen, F.T.M.C. Vicentini, F.M.P. Vilela, F.S. Martins, A.C. Zarpelon, T.M. Cunha, M.J.V. Fonseca, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 138 (2014) 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.05.010>.
- [19] R.M. Martinez, F.A. Pinho-Ribeiro, V.S. Steffen, C. V. Caviglione, V. Fattori, A.J.C. Bussmann, C. Bottura, M.J.V. Fonseca, J.A. Vignoli, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, 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). <https://doi.org/10.1039/c6pp00442c>.
- [20] R.M. Martinez, F.A. Pinho-Ribeiro, V.S. Steffen, C. V. Caviglione, J.A. Vignoli, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, 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). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.03.030>.

- [21] R.M. Martinez, F.A. Pinho-Ribeiro, V.S. Steffen, C. V. Caviglione, J.A. Vignoli, D.S. Barbosa, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice, *J. Nat. Prod.* 78 (2015) 1647–1655. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00198>.
- [22] M.Z. Campanini, F.A. Pinho-Ribeiro, A.L.M. Ivan, V.S. Ferreira, F.M.P. Vilela, F.T.M.C. Vicentini, R.M. Martineza, A.C. Zarpelon, M.J.V. Fonseca, T.J. Faria, M.M. Baracat, W.A. Verri, S.R. Georgetti, R. Casagrande, Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 127 (2013) 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.08.007>.
- [23] P.P. Bradley, D.A. Priebat, R.D. Christensen, G. Rothstein, Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker, *J. Invest. Dermatol.* 78 (1982) 206–209. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12506462>.
- [24] P. Saito, C.P.B. Melo, R.M. Martinez, V. Fattori, T.L.C. Cezar, I.C. Pinto, A.J.C. Bussmann, J.A. Vignoli, S.R. Georgetti, M.M. Baracat, W.A. Verri, R. Casagrande, The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice, *Front. Pharmacol.* (2018). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01242>.
- [25] M.J.V. Fonseca, Y.M. Fonseca, F. Marquele-Oliveira, F.T.M.C. Vicentini, N.A.J.C. Furtado, J.P.B. Sousa, Y.M. Lucisano-Valim, Evaluation of the potential of Brazilian propolis against UV-induced oxidative stress, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2011 (2011). <https://doi.org/10.1155/2011/863917>.
- [26] J. Kim, C.W. Lee, E.K. Kim, S.J. Lee, N.H. Park, H.S. Kim, H.K. Kim, K. Char, Y.P. Jang, J.W. Kim, Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts, *J. Ethnopharmacol.* (2011). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.072>.
- [27] R. Casagrande, S.R. Georgetti, W.A. Verri, D.J. Dorta, A.C. dos Santos, M.J.V. Fonseca, Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice, *J.*

- Photochem. Photobiol. B Biol. 84 (2006) 21–27.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.01.006>.
- [28] R.M. Martinez, V. Fattori, P. Saito, C.B.P. Melo, S.M. Borghi, I.C. Pinto, A.J.C. Bussmann, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A.V. Jr, R. Casagrande, Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice, *J. Dermatol. Sci.* (2018).
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2018.04.014>.
- [29] P. Srinivasan, K.E. Sabitha, C.S. Shyamaladevi, Attenuation of 4-Nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols, *Life Sci.* 80 (2007) 1080–1086.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.11.051>.
- [30] H. Aebi, Catalase in Vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- [31] B. Gonzalez Flecha, S. Llesuy, A. Boveris, Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle, *Free Radic. Biol. Med.* 10 (1991) 93–100.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90002-K](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90002-K).
- [32] Y. Deng, A. Ediriwickrema, F. Yang, J. Lewis, M. Girardi, W.M. Saltzman, A sunblock based on bioadhesive nanoparticles, *Nat. Mater.* 14 (2015) 1278–1285. <https://doi.org/10.1038/nmat4422>.
- [33] S. A, B. R, A. Y, M. K, R. H, M. D, L. TA, S. T, Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells, *J. Invest. Dermatol.* 104 (1995) 922–927. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.EP12606202>.
- [34] A. Filip, D. Daicoviciu, S. Clichici, P. Bolfa, C. Catoi, I. Baldea, L. Bolojan, D. Olteanu, A. Muresan, I.D. Postescu, The effects of grape seeds polyphenols on SKH-1 mice skin irradiated with multiple doses of UV-B, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 105 (2011) 133–142.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.08.002>.
- [35] S.P. Hartono, V.M. Bedell, S.K. Alam, M. O’Gorman, M. Serres, S.R. Hall, K. Pal, R.A. Kudgus, P. Mukherjee, D.M. Seelig, A. Meves, D. Mukhopadhyay, S.C. Ekker, L.H. Hoepfner, Vascular Endothelial Growth Factor as an Immediate-Early Activator of Ultraviolet-Induced Skin Injury, *Mayo Clin. Proc.* (2021). <https://doi.org/10.1016/J.MAYOCP.2021.08.018>.

- [36] S. Trompezinski, I. Pernet, D. Schmitt, J. Viac, UV radiation and prostaglandin E2 up-regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) in cultured human fibroblasts, *Inflamm. Res.* 50 (2001) 422–427. <https://doi.org/10.1007/PL00000265>.
- [37] H. Seki, T. Sasaki, T. Ueda, M. Arita, Resolvins as Regulators of the Immune System, *Sci. World J.* 10 (2010) 818–831. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.72>.
- [38] G.J. Clydesdale, G.W. Dandie, H.K. Muller, Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects, *Immunol. Cell Biol.* (2001). <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2001.01047.x>.
- [39] M. Zawrotniak, D. Bartnicka, M. Rapala-Kozik, UVA and UVB radiation induce the formation of neutrophil extracellular traps by human polymorphonuclear cells, *J. Photochem. Photobiol. B.* 196 (2019). <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOB.2019.111511>.
- [40] P. Pittayapruek, J. Meephansan, O. Prapapan, M. Komine, M. Ohtsuki, Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis, *Int. J. Mol. Sci.* (2016). <https://doi.org/10.3390/ijms17060868>.
- [41] G.J. Fisher, S.C. Datta, H.S. Talwar, Z.Q. Wang, J. Varani, S. Kang, J.J. Voorhees, Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism, *Nature.* 379 (1996) 335–339. <https://doi.org/10.1038/379335a0>.
- [42] A. Svobodova, D. Walterova, J. Vostalova, Ultraviolet light induced alteration to the skin., *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* 150 (2006) 25–38. <https://doi.org/10.5507/bp.2006.003>.
- [43] a John, G. Tuszynski, The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis., *Pathol. Oncol. Res.* 7 (2001) 14–23. <https://doi.org/10.1007/BF03032599>.
- [44] S. Kossodo, W.-R. Wong, G. Simon, I.E. Kochevar, Effects of UVR and UVR-induced cytokines on production of extracellular matrix proteins and proteases by dermal fibroblasts cultured in collagen gels%, *Photochem. Photobiol.* 79 (2004) 86–93. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2004\)79<86:EOUAUC>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2004)79<86:EOUAUC>2.0.CO;2).
- [45] H. Wei, X. Zhang, Y. Wang, M. Lebwohl, Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by

- isoflavone genistein, *Cancer Lett.* 185 (2002) 21–29. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00240-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00240-9).
- [46] Y.M. Fonseca, C.D. Catini, F.T.M.C. Vicentini, A. Nomizo, R.F. Gerlach, M.J.V. Fonseca, Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion, *J. Ethnopharmacol.* 127 (2010) 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.019>.
- [47] T.L. de Jager, A.E. Cockrell, S.S. Du Plessis, Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species, in: *Adv. Exp. Med. Biol.*, Springer New York LLC, 2017: pp. 15–23. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_2.
- [48] Y. Kawaguchi, H. Tanaka, T. Okada, H. Konishi, M. Takahashi, M. Ito, J. Asai, The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts, *Arch. Dermatol. Res.* (1996). <https://doi.org/10.1007/BF02505041>.
- [49] I.R. Record, I.E. Dreosti, M. Konstantinopoulos, R.A. Buckley, The Influence of Topical and Systemic Vitamin E on Ultraviolet Light-Induced Skin Damage in Hairless Mice, *Nutr. Cancer.* (1991). <https://doi.org/10.1080/01635589109514160>.
- [50] V. Katalinic, D. Modun, I. Music, M. Boban, Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays, *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 140 (2005) 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.005>.
- [51] K.U. Schallreuter, J. Moore, J.M. Wood, W.D. Beazley, D.C. Gaze, D.J. Tobin, H.S. Marshall, A. Panske, E. Panzig, N.A. Hibberts, In Vivo and In Vitro Evidence for Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Accumulation in the Epidermis of Patients with Vitiligo and its Successful Removal by a UVB-Activated Pseudocatalase, *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.* 4 (1999) 91–96. <https://doi.org/10.1038/sj.jidsp.5640189>.
- [52] B. Halliwell, The wanderings of a free radical, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2009) 531–542. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.008>.
- [53] M.A. Zaid, F. Afaq, D.N. Syed, M. Dreher, H. Mukhtar, Inhibition of UVB-

- mediated Oxidative Stress and Markers of Photoaging in Immortalized HaCaT Keratinocytes by Pomegranate Polyphenol Extract POMx, (2007) 882–888.
- [54] M. Carini, G. Aldini, M. Piccone, R.M. Facino, Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure, *Farmaco*. 55 (2000) 526–534. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(00\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(00)00037-9).
- [55] Q. Gao, L. Zhang, Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate-deficient *vtc1* mutants of *Arabidopsis thaliana*, *J. Plant Physiol.* 165 (2008) 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.04.002>.
- [56] G.H. Jin, Y. Liu, S.Z. Jin, X.D. Liu, S.Z. Liu, UVB induced oxidative stress in human keratinocytes and protective effect of antioxidant agents, *Radiat. Environ. Biophys.* 46 (2007) 61–68. <https://doi.org/10.1007/s00411-007-0096-1>.
- [57] Y. Shindo, T. Hashimoto, Y. Shindo, T. Hashimoto, Antioxidant defence mechanism of the skin against UV irradiation: study of the role of catalase using acatalasaemia fibroblasts, Springer-Verlag, 1995.
- [58] V. Maresca, E. Flori, S. Briganti, E. Camera, M. Cario-André, A. Taïeb, M. Picardo, UVA-Induced Modification of Catalase Charge Properties in the Epidermis Is Correlated with the Skin Phototype, *J. Invest. Dermatol.* 126 (2006) 182–190. <https://doi.org/10.1038/SJ.JID.5700021>.
- [59] R.M. Martinez, F.A. Pinho-Ribeiro, V.S. Steffen, T.C.C. Silva, C. V. Caviglione, C. Bottura, M.J.V. Fonseca, F.T.M.C. Vicentini, J.A. Vignoli, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande, Topical formulation containing naringenin: Efficacy against ultraviolet B irradiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice, *PLoS One*. 11 (2016) 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146296>.
- [60] A. Leuti, M. Maccarrone, V. Chiurchiù, Proresolving lipid mediators: Endogenous modulators of oxidative stress, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/8107265>.
- [61] K. Yagi, Lipid peroxides and human diseases, *Chem. Phys. Lipids.* 45 (1987) 337–351. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(87\)90071-5](https://doi.org/10.1016/0009-3084(87)90071-5).
- [62] H. LINGNERT, K. VALLENTIN, C.E. ERIKSSON, MEASUREMENT OF

- ANTIOXIDATIVE EFFECT IN MODEL SYSTEM, *J. Food Process. Preserv.* 3 (1979) 87–103. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1979.tb00574.x>.
- [63] T. Shibamoto, The Role of Lipid Peroxidation Caused by Ultraviolet Light in Skin Diseases, <Http://Dx.Doi.Org/10.3109/15569529409062919>. 13 (2008) 193–202. <https://doi.org/10.3109/15569529409062919>.
- [64] M.L. Cunningham, N.I. Krinsky, S.M. Giovanazzi, M.J. Peak, Superoxide anion is generated from cellular metabolites by solar radiation and its components, *J. Free Radicals Biol. Med.* 1 (1985) 381–385. [https://doi.org/10.1016/0748-5514\(85\)90150-3](https://doi.org/10.1016/0748-5514(85)90150-3).
- [65] H.R. Rezvani, M. Cario-André, C. Pain, C. Ged, H. DeVerneuil, A. Taïeb, Protection of normal human reconstructed epidermis from UV by catalase overexpression, *Cancer Gene Ther.* 2007 142. 14 (2006) 174–186. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7701000>.
- [66] A. Schwarz, K. Mahnke, T.A. Luger, T. Schwarz, Pentoxifylline reduces the formation of sunburn cells, *Exp. Dermatol.* 6 (1997) 1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.1997.tb00138.x>.
- [67] T.L. Scott, P.A. Christian, M. V. Kesler, K.M. Donohue, B. Shelton, K. Wakamatsu, I. Shosuke, J. D’Orazio, Pigment-independent cAMP-mediated epidermal thickening protects against cutaneous UV injury by keratinocyte proliferation, *Exp. Dermatol.* 21 (2012) 771–777. <https://doi.org/10.1111/exd.12012>.
- [68] T. Quan, Z. Qin, W. Xia, Y. Shao, J.J. Voorhees, G.J. Fisher, Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging, in: *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.*, 2009: pp. 20–24. <https://doi.org/10.1038/jidsymp.2009.8>.
- [69] P.H. Hart, M.A. Grimbaldston, G.J. Swift, A. Jaksic, F.P. Noonan, J.J. Finlay-Jones, Dermal mast cells determine susceptibility to ultraviolet B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice, *J Exp Med.* 187 (1998) 2045–2053. <https://doi.org/10.1084/jem.187.12.2045>.
- [70] T.B. Bury, J.L. Corhay, M.F. Radermecker, Histamine-induced inhibition of neutrophil chemotaxis and T-lymphocyte proliferation in man, *Allergy.* 47 (1992) 624–629. <https://doi.org/10.1111/J.1398-9995.1992.TB02385.X>.
- [71] B. Lagier, B. Lebel, J. Bousquet, J. Pène, Different modulation by histamine

- of IL-4 and interferon-gamma (IFN- γ) release according to the phenotype of human Th0, Th1 and Th2 clones, *Clin. Exp. Immunol.* 108 (1997) 545. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2249.1997.3791276.X>.
- [72] S. Laberge, W.W. Cruikshank, H. Kornfeld, D.M. Center, Histamine-induced secretion of lymphocyte chemoattractant factor from CD8+ T cells is independent of transcription and translation: Evidence for constitutive protein synthesis and storage, *J. Immunol.* 155 (1995) 2902–2910. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7673707/> (accessed December 3, 2021).
- [73] D. Baram, G.G. Vaday, P. Salamon, I. Drucker, R. Hershkovich, Y.A. Mekori, Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF-alpha, *J. Immunol.* 167 (2001) 4008–4016. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.7.4008>.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição a radiação ultravioleta induz uma série de efeitos deletérios na pele, inclusive o envelhecimento precoce e o câncer de pele. A produção excessiva de radicais livres, induzida pela UVB, leva a depleção dos antioxidantes endógenos e também ao processo inflamatório. Assim, o uso de mediadores lipídicos anti-inflamatórios/pró-resolução, como a RvD5, para enriquecer o sistema antioxidante endógeno e controlar os processos lesivos induzidos pela radiação UVB torna-se uma alternativa promissora. Estudos recentes, elencados neste trabalho, evidenciaram efeitos benéficos do uso da RvD5 na diminuição do processo inflamatório na artrite inflamatória e na inflamação infecciosa iniciada por *E. coli* em camundongos. No entanto, ao nosso conhecimento, ainda não existem estudos sobre o uso da RvD5 na melhora ou prevenção de danos inflamatórios e oxidativos causados pela radiação UVB em camundongos.

Os resultados *in vivo* obtidos nesse estudo demonstraram que ambos os tratamentos com RvD5, ip e tópico, foram efetivos no controle do processo oxidativo e inflamatório induzidos pela radiação UVB. A RvD5 foi capaz de inibir o estresse oxidativo por manter os níveis de GSH e atividade de catalase. Além disso, o tratamento com RvD5 também aumentou a expressão de RNAm para proteínas envolvidas na resposta antioxidante e anti-inflamatória (Nrf2, OH-1 e NQO-1). Somando-se a isso, a RvD5 também foi capaz de inibir o edema cutâneo, o recrutamento de neutrófilos, a atividade da MMP-9, a produção de hidroperóxidos lipídicos, o radical superóxido e a produção de citocinas inflamatórias (IL-1 β , e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β). A RvD5 também reduziu a espessura epidérmica, o número de células apoptóticas, de mastócitos e a degradação de fibras de colágeno induzidos pela RUV.

Em conclusão, os resultados do nosso trabalho sugerem que o mediador lipídico RvD5 pode ser uma nova estratégia para controlar e/ou prevenir os danos causados pela radiação UVB na pele.

8. REFERÊNCIAS

- ADHAMI, Vaqar Mustafa; AFAQ, Farrukh; AHMAD, Nihal. Suppression of ultraviolet B exposure-mediated activation of NF- κ B in normal human keratinocytes by resveratrol. **Neoplasia**, [S. l.], 2003. DOI: 10.1016/s1476-5586(03)80019-2.
- AEBI, Hugo. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, [S. l.], v. 105, n. C, p. 121–126, 1984. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- AFAQ, Farrukh; ADHAMI, Vaqar M.; MUKHTAR, Hasan. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [S. l.], v. 571, n. 1-2 SPEC. ISS., p. 153–173, 2005. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.07.019.
- AHMAD, Nihal; GILLIAM, Anita C.; KATIYAR, Santosh K.; O'BRIEN, Thomas G.; MUKHTAR, Hasan. A definitive role of ornithine decarboxylase in photocarcinogenesis. **American Journal of Pathology**, [S. l.], 2001. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)61764-6.
- ANRATHER, Josef; RACCHUMI, Gianfranco; IADECOLA, Costantino. NF- κ B regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 281, n. 9, p. 5657–5667, 2006. DOI: 10.1074/jbc.M506172200.
- ARUOMA, O. I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], 1994. DOI: 10.1016/0278-6915(94)90011-6.
- BALOGH, Tatiana Santana; PEDRIALI, Carla Aparecida; KANEKO, Telma Mary. Proteção à radiação ultravioleta : recursos disponíveis na. [S. l.], v. 1, p. 732–742, 2011. DOI: 10.1590/S0365-05962011000400016.
- BALUPILLAI, Agilan; PRASAD, Rajendra N.; RAMASAMY, Karthikeyan; MUTHUSAMY, Ganesan; SHANMUGHAM, Mohana; GOVINDASAMY, Kanimozhi; GUNASEELAN, Srithar. Caffeic Acid Inhibits UVB-induced Inflammation and Photocarcinogenesis Through Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ in Mouse Skin. **Photochemistry and Photobiology**, [S. l.], 2015. DOI: 10.1111/php.12522.
- BOYD, Sonja; TOLVANEN, Kalle; VIROLAINEN, Susanna; KUIVANEN, Tiina; KYLLÖNEN, Lauri; SAARIALHO-KERE, Ulpu. Differential expression of stromal MMP-1, MMP-9 and TIMP-1 in basal cell carcinomas of immunosuppressed

- patients and controls. **Virchows Archiv**, [S. l.], 2008. DOI: 10.1007/s00428-007-0526-0.
- CADET, Jean; DOUKI, Thierry. **Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development** **Photochemical and Photobiological Sciences**, 2018. DOI: 10.1039/c7pp00395a.
- CAMPANINI, Marcela 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: Biology**, [S. l.], v. 127, p. 153–160, 2013. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2013.08.007.
- CASAGRANDE, Rúbia; GEORGETTI, Sandra R.; VERRI, Waldiceu A.; DORTA, Daniel J.; DOS SANTOS, Antônio C.; FONSECA, Maria J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 84, n. 1, p. 21–27, 2006. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2006.01.006.
- CHIANG, Nan; FREDMAN, Gabrielle; BÄCKHED, Fredrik; OH, Sungwhan F.; VICKERY, Thad; SCHMIDT, Birgitta A.; SERHAN, Charles N. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. **Nature**, [S. l.], v. 484, n. 7395, p. 524–528, 2012. DOI: 10.1038/nature11042. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22538616/>. Acesso em: 8 abr. 2021.
- CHIURCHIU, V.; LEUTI, A.; DALLI, J.; JACOBSSON, A.; BATTISTINI, L.; MACCARRONE, M.; SERHAN, C. N. Proresolving lipid mediators resolvin D1, resolvin D2, and maresin 1 are critical in modulating T cell responses. **Science Translational Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 353, p. 353ra111-353ra111, 2016. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf7483. Disponível em: <http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.aaf7483>.
- CHOI, Jee Young; CHOI, Da In; LEE, Jee Bum; YUN, Suk Jung; LEE, Dong Ho; EUN, Jong Bang; LEE, Seung Chul. Ethanol extract of peanut sprout induces Nrf2 activation and expression of antioxidant and detoxifying enzymes in human dermal fibroblasts: Implication for its protection against UVB-irradiated oxidative stress. **Photochemistry and Photobiology**, [S. l.], v. 89, n. 2, p. 453–460, 2013. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2012.01244.x.
- CHUN, Hyun Woo; LEE, Jintak; PHAM, Thu Huyen; LEE, Jiyon; YOON, Jae Hwan; LEE, Jin; OH, Deok Kun; OH, Jaewook; YOON, Do Young. Resolvin D5, a Lipid

- Mediator, Inhibits Production of Interleukin-6 and CCL5 Via the ERK-NF- κ B Signaling Pathway in Lipopolysaccharide-Stimulated THP-1 Cells. **Journal of microbiology and biotechnology**, [S. l.], 2020. DOI: 10.4014/jmb.1907.07033.
- CLYDESDALE, G. J.; DANDIE, G. W.; MULLER, H. K. **Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects** *Immunology and Cell Biology*, 2001. DOI: 10.1046/j.1440-1711.2001.01047.x.
- COELHO, Sergio G. et al. Short- and long-term effects of UV radiation on the pigmentation of human skin. **The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 32–5, 2009. DOI: 10.1038/jidsymp.2009.10. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2799903&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- D'ORAZIO, John; JARRETT, Stuart; AMARO-ORTIZ, Alexandra; SCOTT, Timothy. **UV radiation and the skin** *International Journal of Molecular Sciences*, 2013. DOI: 10.3390/ijms140612222.
- DENG, Yang; EDIRIWICKREMA, Asiri; YANG, Fan; LEWIS, Julia; GIRARDI, Michael; SALTZMAN, W. Mark. A sunblock based on bioadhesive nanoparticles. **Nature Materials**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 1278–1285, 2015. DOI: 10.1038/nmat4422.
- DORÉ, Jean Francois; CHIGNOL, Marie Christine. **Tanning salons and skin cancer** *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2012. DOI: 10.1039/c1pp05186e.
- DUNAWAY, Spencer; ODIN, Rachel; ZHOU, Linli; JI, Liyuan; ZHANG, Yuhang; KADEKARO, Ana L. **Natural antioxidants: Multiple mechanisms to protect skin from solar radiation** *Frontiers in Pharmacology*, 2018. DOI: 10.3389/fphar.2018.00392.
- DUPONT, E.; GOMEZ, J.; BILODEAU, D. **Beyond UV radiation: A skin under challenge** *International Journal of Cosmetic Science*, 2013. DOI: 10.1111/ics.12036.
- DURÁN-ANIOTZ, Claudia et al. The immunological response and post-treatment survival of DC-vaccinated melanoma patients are associated with increased Th1/Th17 and reduced Th3 cytokine responses. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, [S. l.], v. 62, n. 4, p. 761–772, 2013. DOI: 10.1007/s00262-012-1377-3.

- DUSTING, Gregory J.; MACDONALD, Peter S. Endogenous Nitric Oxide in Cardiovascular Disease and Trans p l a n t a t i o n Mechanisms of Vasodilatation - NO or. [S. l.], n. 1, p. 395–406, 1995.
- DUVALL, Melody G.; LEVY, Bruce D. DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.11.001.
- EMRI, Gabriella; HORKAY, Iren; REMENYIK, Eva. [The role of free radicals in the UV-induced skin damage. Photo-aging]. **Orvosi hetilap**, [S. l.], v. 147, n. 16, p. 731–735, 2006.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, Elisabet. Skin protection against UV light by dietary antioxidants. **Food & Function**, [S. l.], v. 5, n. 9, p. 1994, 2014. DOI: 10.1039/C4FO00280F. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4FO00280F>.
- FERNANDO, Pattage Madushan Dilhara Jayatissa; PIAO, Mei Jing; KANG, Kyoung Ah; RYU, Yea Seong; HEWAGE, Susara Ruwan Kumara Madduma; CHAE, Sung Wook; HYUN, Jin Won. Rosmarinic acid attenuates cell damage against UVB radiation-induced oxidative stress via enhancing antioxidant effects in human HaCaT cells. **Biomolecules and Therapeutics**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 75–84, 2016. DOI: 10.4062/biomolther.2015.069.
- FIGUEIREDO, Sônia Aparecida; VILELA, Fernanda Maria Pinto; SILVA, Claudinei Alves Da; CUNHA, Thiago Mattar; DOS SANTOS, Marcelo Henrique; FONSECA, Maria José Vieira. In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 131, p. 65–73, 2014. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2014.01.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.01.004>.
- FLAK, Magdalena B.; COLAS, Romain A.; MUÑOZ-ATIENZA, Estefanía; CURTIS, Michael A.; DALLI, Jesmond; PITZALIS, Costantino. Inflammatory arthritis disrupts gut resolution mechanisms, promoting barrier breakdown by *Porphyromonas gingivalis*. **JCI Insight**, [S. l.], v. 4, n. 13, 2019. DOI: 10.1172/jci.insight.125191. Disponível em: https://www.google.com/search?q=Inflammatory+arthritis+disrupts+gut+resolution+mechanisms%2C+promoting+barrier+breakdown+by+Porphyromonas+gingivalis&rlz=1C5CHFA_enBR947BR948&oq=Inflammatory+arthritis+disrupts+gut+resolution+mechanisms%2C+promoting+barrier. Acesso em: 4 dez. 2021.

- FONSECA, Maria José Vieira; FONSECA, Yris Maria; MARQUELE-OLIVEIRA, Franciane; VICENTINI, Fabiana T. M. C.; FURTADO, Nieve Araçari J. C.; SOUSA, João Paulo B.; LUCISANO-VALIM, Yara M. Evaluation of the potential of Brazilian propolis against UV-induced oxidative stress. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2011, 2011. a. DOI: 10.1155/2011/863917.
- FONSECA, Yris Maria; CATINI, Carolina Dias; VICENTINI, Fabiana T. M. C.; CARDOSO, Juliana Cordeiro; CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE JUNIOR, Ricardo Luiz; VIEIRA FONSECA, Maria José. Efficacy of marigold extract-loaded formulations against UV-induced oxidative stress. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 100, n. 6, p. 2182–2193, 2011. b. DOI: 10.1002/jps.22438.
- FONSECA, Yris Maria; CATINI, Carolina Dias; VICENTINI, Fabiana T. M. C.; NOMIZO, Auro; GERLACH, Raquel Fernanda; FONSECA, Maria José Vieira. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 127, n. 3, p. 596–601, 2010. DOI: 10.1016/j.jep.2009.12.019.
- FORTINO, Vittoria; MAIOLI, Emanuela; TORRICELLI, Claudia; DAVIS, Paul; VALACCHI, Giuseppe. Cutaneous MMPs are differently modulated by environmental stressors in old and young mice. **Toxicology Letters**, [S. l.], 2007. DOI: 10.1016/j.toxlet.2007.06.004.
- FUCHS, J.; ZOLLNER, T. M.; KAUFMANN, R.; PODDA, M. **Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases** *Free Radical Biology and Medicine*, 2001. DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00482-2.
- GANESAN, Ramya; HENKELS, Karen M.; SHAH, Krushangi; DE LA ROSA, Xavier; LIBREROS, Stephania; CHEEMARLA, Nagarjuna R.; SERHAN, Charles N.; GOMEZ-CAMBRONERO, Julian. D-series Resolvins activate Phospholipase D in phagocytes during inflammation and resolution. **FASEB Journal**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1096/fj.201903025RR.
- GARCIA, C.; PITHON-CURI, T. C.; DE LOURDES FIRMANO, M.; PIRES DE MELO, M.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. Effects of adrenaline on glucose and glutamine metabolism and superoxide production by rat neutrophils. **Clinical science (London, England : 1979)**, [S. l.], v. 96, n. 6, p. 549–55, 1999. DOI: 10.1042/CS19980340.

Disponível

em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10334960>.

- GIROTTI, Albert W. PHOTODYNAMIC LIPID PEROXIDATION IN BIOLOGICAL SYSTEMS. **Photochemistry and Photobiology**, [S. l.], v. 51, n. 4, p. 497–509, 1990. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1990.tb01744.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.1990.tb01744.x>.
- GODAR, Dianne. UV Doses Worldwide. **Photochemistry and Photobiology**, [S. l.], 2005. DOI: 10.1562/2004-09-07-ir-308.
- GODIC, Aleksandar; POLJŠAK, Borut; ADAMIC, Metka; DAHMANE, Raja. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], 2014. DOI: 10.1155/2014/860479.
- GONZALEZ FLECHA, Beatriz; LLESUY, Susana; BOVERIS, Alberto. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 93–100, 1991. DOI: 10.1016/0891-5849(91)90002-K.
- GRADY, A. O.; DUNNE, C.; KELLY, P. O.; MURPHY, G. M.; LEADER, M.; KAY, E. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumour progression. **Histopathology**, [S. l.], v. 51, p. 793–804, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2007.02885.x.
- HALLIDAY, Gary M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [S. l.], v. 571, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 107–120, 2005. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.09.013.
- HALLIWELL, Barry. **The wanderings of a free radical** **Free Radical Biology and Medicine**, 2009. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.008.
- HANSON, Kerry M.; GRATTON, Enrico; BARDEEN, Christopher J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 41, n. 8, p. 1205–1212, 2006. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.06.011.
- HART, P. H.; GRIMBALDESTON, M. A.; SWIFT, G. J.; JAKSIC, A.; NOONAN, F. P.; FINLAY-JONES, J. J. Dermal mast cells determine susceptibility to ultraviolet B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice. **J Exp Med**, [S. l.], v. 187, n. 12, p. 2045–2053, 1998. DOI:

10.1084/jem.187.12.2045.

Disponível

em:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9625764.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, Marier; EL-HAJAHMAD, Mohamad; MASSARO, Joseph; MAHALINGAM, Meera. Expression of gelatinases (MMP-2, MMP-9) and gelatinase activator (MMP-14) in actinic keratosis and in in situ and invasive squamous cell carcinoma. **American Journal of Dermatopathology**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1097/DAD.0b013e31824b1ddf.

HUPEL, Mélanie; POUPART, Nathalie; AR GALL, Erwan. Development of a new in vitro method to evaluate the photoprotective sunscreen activity of plant extracts against high UV-B radiation. **Talanta**, [S. l.], v. 86, n. 1, p. 362–371, 2011. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.09.029.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2022**.

KATALINIC, V.; MODUN, D.; MUSIC, I.; BOBAN, M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 140, n. 1, p. 47–52, 2005. DOI: 10.1016/j.cca.2005.01.005.

KATIYAR, Santosh K.; MEERAN, Syed M. Obesity increases the risk of UV radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF- κ B signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 299–310, 2007. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.049.

KAWAGUCHI, Yoshiharu; TANAKA, Hiroshi; OKADA, Tomio; KONISHI, Hiroaki; TAKAHASHI, Masahide; ITO, Masafumi; ASAI, Junpei. The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. **Archives of Dermatological Research**, [S. l.], 1996. DOI: 10.1007/BF02505041.

KEHRER, James P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical Reviews in Toxicology**, [S. l.], 1993. DOI: 10.3109/10408449309104073.

KHAVKIN, Jeannie; ELLIS, David A. F. **Ageing Skin: Histology, Physiology, and Pathology** *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 2011. DOI:

10.1016/j.fsc.2011.04.003.

- KIM, Choon Mee; KANG, Sang Mee; JEON, Ho Jong; SHIN, Sung Heui. Production of *Vibrio vulnificus* metalloprotease VvpE begins during the early growth phase: Usefulness of gelatin-zymography. **Journal of Microbiological Methods**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 96–102, 2007. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.03.016.
- KIM, Hui Seong; SONG, Jae Hyoung; YOUN, Ui Joung; HYUN, Jin Won; JEONG, Woo Seok; LEE, Mi Young; CHOI, Hwa Jung; LEE, Hyeong Kyu; CHAE, Sungwook. Inhibition of UVB-induced wrinkle formation and MMP-9 expression by mangiferin isolated from *Anemarrhena asphodeloides*. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.05.050.
- KIM, Junoh et al. Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], 2011. DOI: 10.1016/j.jep.2011.04.072.
- KOBAYASHI, Makoto; YAMAMOTO, Masayuki. Molecular Mechanisms Activating the Nrf2-Keap1 Pathway of Antioxidant Gene Regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S. l.], v. 7, n. 3–4, p. 385–394, 2005. DOI: 10.1089/ars.2005.7.385. Disponível em: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ars.2005.7.385>.
- KULLAVANIJAYA, Prisana; LIM, Henry W. **Photoprotection Journal of the American Academy of Dermatology**, 2005. DOI: 10.1016/j.jaad.2004.07.063.
- LI, Chunrong; WU, Xiujuan; LIU, Shan; SHEN, Donghui; ZHU, Jie; LIU, Kangding. Role of Resolvins in the Inflammatory Resolution of Neurological Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 11, p. 612, 2020. DOI: 10.3389/FPHAR.2020.00612/BIBTEX.
- LINGNERT, H.; VALLENTIN, K.; ERIKSSON, C. E. MEASUREMENT OF ANTIOXIDATIVE EFFECT IN MODEL SYSTEM. **Journal of Food Processing and Preservation**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 87–103, 1979. DOI: 10.1111/j.1745-4549.1979.tb00574.x.
- LONDON, S. J.; LEHMAN, T. A.; TAYLOR, J. A. Myeloperoxidase genetic polymorphism and lung cancer risk. **Cancer Res**, [S. l.], v. 57, n. 22, p. 5001–5003, 1997. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9371491.
- LUO, Xin; GU, Yun; TAO, Xueshu; SERHAN, Charles Nicholas; JI, Ru-Rong. Resolvin D5 Inhibits Neuropathic and Inflammatory Pain in Male But Not Female Mice:

- Distinct Actions of D-Series Resolvins in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], 2019. DOI: 10.3389/fphar.2019.00745.
- MACHADO ROCHA RIBEIRO, Sonia; HUMBERTO DE QUEIROZ, Jose; DO CARMO GOUVEIA PELUZIO, Maria; MARIA BRUNORO COSTA, Neuza; LUIZ PINTO DA MATTA, Sergio; ELIANA LOPES RIBEIRO DE QUEIROZ, Maria. A formacao e os efeitos das especies reativas de oxigenio no meio biologico. **Bioscience Journal**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 133–149, 2005. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6617>.
- MARTINEZ, R. M. et al. Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. **Journal of Dermatological Science**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2018.04.014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2018.04.014>.
- MARTINEZ, Renata M. et al. Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 78, n. 7, p. 1647–1655, 2015. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00198.
- MAVERAKIS, Emanuel; MIYAMURA, Yoshinori; BOWEN, Michael P.; CORREA, Genevieve; ONO, Yoko; GOODARZI, Heidi. Light, including ultraviolet. **Journal of Autoimmunity**, [S. l.], v. 34, n. 3, 2010. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.11.011.
- NISHISGORI, Chikako. Current concept of photocarcinogenesis. **Photochem. Photobiol. Sci.**, [S. l.], v. 14, n. 9, p. 1713–1721, 2015. DOI: 10.1039/C5PP00185D. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5PP00185D>.
- OGAWA, Narihito; SUGIYAMA, Takuo; MORITA, Masao; SUGANUMA, Yuta; KOBAYASHI, Yuichi. Total Synthesis of Resolvin D5. **Journal of Organic Chemistry**, [S. l.], v. 82, n. 4, p. 2032–2039, 2017. DOI: 10.1021/acs.joc.6b02870.
- ONOUE, Satoshi; KOBAYASHI, Takashi; TAKEMOTO, Yuko; SASAKI, Ichiro; SHINKAI, Hiroshi. Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. **Journal of Dermatological Science**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 105–111, 2003. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2003.08.002.
- PANICH, Uraivan; SITTITHUMCHAREE, Gunya; RATHVIBOON, Natwarath; JIRAWATNOTAI, Siwanon. **Ultraviolet radiation-induced skin aging: The role of DNA damage and oxidative stress in epidermal stem cell damage**

- mediated skin aging *Stem Cells International*, 2016. DOI: 10.1155/2016/7370642.
- PITTAYAPRUEK, Pavidá; MEEPHANSAN, Jitlada; PRAPAPAN, Ornicha; KOMINE, Mayumi; OHTSUKI, Mamitaro. **Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis** *International Journal of Molecular Sciences*, 2016. DOI: 10.3390/ijms17060868.
- POLJŠAK, Borut; DAHMANE, Raja. **Free radicals and extrinsic skin aging** *Dermatology Research and Practice*, 2012. DOI: 10.1155/2012/135206.
- QUAN, Taihao; QIN, Zhaoping; XIA, Wei; SHAO, Yuan; VOORHEES, John J.; FISHER, Gary J. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *In: JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY SYMPOSIUM PROCEEDINGS 2009, Anais [...]. [s.l.: s.n.] p. 20–24.* DOI: 10.1038/jidsymp.2009.8.
- RAJ, Deepak; BRASH, Douglas E.; GROSSMAN, Douglas. **Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease** *Journal of Investigative Dermatology*, 2006. DOI: 10.1038/sj.jid.5700008.
- RECORD, Ian R.; DREOSTI, Ivor E.; KONSTANTINOPOULOS, Mary; BUCKLEY, Reg A. The Influence of Topical and Systemic Vitamin E on Ultraviolet Light-Induced Skin Damage in Hairless Mice. **Nutrition and Cancer**, [S. l.], 1991. DOI: 10.1080/01635589109514160.
- REUTER, Simone; GUPTA, Subash C.; CHATURVEDI, Madan M.; AGGARWAL, Bharat B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.
- ROBBINS, Delira; ZHAO, Yunfeng. The Role of Manganese Superoxide Dismutase in Skin Cancer. **Enzyme Research**, [S. l.], v. 2011, n. 1, 2011. DOI: 10.4061/2011/409295. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3092576/](http://pmc/articles/PMC3092576/). Acesso em: 5 dez. 2021.
- ROBINSON, John M.; OHIRA, Taisuke; BADWEY, John A. **Regulation of the NADPH-oxidase complex of phagocytic leukocytes. Recent insights from structural biology, molecular genetics, and microscopy** *Histochemistry and Cell Biology*, 2004. DOI: 10.1007/s00418-004-0672-2.
- RYU, Ho Cheol; KIM, Cheolmin; KIM, Joo Young; CHUNG, Jin Ho; KIM, Jae Hong.

- UVB radiation induces apoptosis in keratinocytes by activating a pathway linked to BLT2-reactive oxygen species. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], 2010. DOI: 10.1038/jid.2009.436.
- SAITO, Priscila et al. The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], 2018. DOI: 10.3389/fphar.2018.01242.
- SAMPLE, Ashley; HE, Yu Ying. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, [S. l.], n. July, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1111/phpp.12329.
- SCHALLREUTER, Karin U. et al. In Vivo and In Vitro Evidence for Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Accumulation in the Epidermis of Patients with Vitiligo and its Successful Removal by a UVB-Activated Pseudocatalase. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 91–96, 1999. DOI: 10.1038/sj.jidsp.5640189. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087002415302422>.
- SCHWARZ, Agatha; BHARDWAJ, Ranjit; ARAGANE, Yoshinori; MAHNKE, Karsten; RIEMANN, Helge; METZE, Dieter; LUGER, Thomas A.; SCHWARZ, Thomas. Ultraviolet-B-Induced Apoptosis of Keratinocytes: Evidence for Partial Involvement of Tumor Necrosis Factor- α in the Formation of Sunburn Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 104, n. 6, p. 922–927, 1995. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12606202.
- SCOTT, Timothy L.; CHRISTIAN, Perry A.; KESLER, Melissa V.; DONOHUE, Kevin M.; SHELTON, Brent; WAKAMATSU, Kazumasa; SHOSUKE, Ito; D'ORAZIO, John. Pigment-independent cAMP-mediated epidermal thickening protects against cutaneous UV injury by keratinocyte proliferation. **Experimental Dermatology**, [S. l.], v. 21, n. 10, p. 771–777, 2012. DOI: 10.1111/exd.12012.
- SEKI, Hiroyuki; SASAKI, Takaharu; UEDA, Tomomi; ARITA, Makoto. Resolvins as Regulators of the Immune System. **The Scientific World JOURNAL**, [S. l.], v. 10, p. 818–831, 2010. DOI: 10.1100/tsw.2010.72. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2010/371027/abs/>.
- SERHAN, Charles N. **Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology** *Nature*, 2014. DOI: 10.1038/nature13479.
- SERHAN, Charles N.; LEVY, Bruce D. **Resolvins in inflammation: Emergence of the pro-resolving superfamily of mediators** *Journal of Clinical Investigation*,

2018. DOI: 10.1172/JCI97943.

SHANG, Pei; ZHANG, Ying; MA, Di; HAO, Yulei; WANG, Xinyu; XIN, Meiyong; ZHANG, Yunhai; ZHU, Mingqin; FENG, Jiachun. Inflammation resolution and specialized pro-resolving lipid mediators in CNS diseases. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1691525>, [S. l.], v. 23, n. 11, p. 967–986, 2019. DOI: 10.1080/14728222.2019.1691525. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14728222.2019.1691525>. Acesso em: 4 dez. 2021.

SHINDO, Yasuko; WITT, Eric; HAN, Derick; PACKER, Lester. Dose-Response Effects of Acute Ultraviolet Irradiation on Antioxidants and Molecular Markers of Oxidation in Murine Epidermis and Dermis. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 102, n. 4, p. 470–475, 1994. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12373027. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X94967938>.

SOMMER, Claudia; BIRKLEIN, Frank. Resolvins and inflammatory pain. **F1000 medicine reports**, [S. l.], v. 3, n. October, p. 19, 2011. DOI: 10.3410/M3-19. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22003366> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3186038>.

SONG, Jae Hyong et al. t BA: A review of skin ageing and its medical therapy. **Molecular Medicine Reports**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 2937–2944, 2016. DOI: 10.3892/mmr.2016.5655.

SRINIVASAN, Periasamy; SABITHA, Kuruvimalai Ekambaram; SHYAMALADEVI, Chennam Srinivasulu. Attenuation of 4-Nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols. **Life Sciences**, [S. l.], v. 80, n. 12, p. 1080–1086, 2007. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.11.051.

SVOBODOVÁ, Alena Rajnochová; GALANDÁKOVÁ, Adéla; ŠIANSKÁ, Jarmila; DOLEŽAL, Dalibor; LICHNOVSKÁ, Radka; ULRICHOVÁ, Jitka; VOSTÁLOVÁ, Jitka. DNA damage after acute exposure of mice skin to physiological doses of UVB and UVA light. **Archives of Dermatological Research**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1007/s00403-012-1212-x.

SVOBODOVA, Alena; WALTEROVA, Daniela; VOSTALOVA, Jitka. **Ultraviolet light induced alteration to the skin. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, 2006. DOI:

10.5507/bp.2006.003.

T., Gobbetti et al. Protectin D1n-3 DPA and resolvin D5n-3 DPA are effectors of intestinal protection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], 2017.

TEWARI, Angela; GRAGE, Mette M. L.; HARRISON, Graham I.; SARKANY, Robert; YOUNG, Antony R. Human erythema and matrix metalloproteinase-1 mRNA induction, in vivo, share an action spectrum which suggests common chromophores. **Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, [S. l.], v. 12, p. 95–103, 2013. DOI: 10.1039/c2pp25323b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23192740>.

VALKO, Marian; IZAKOVIC, Mario; MAZUR, Milan; RHODES, Christopher J.; TELSER, Joshua. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [S. l.], 2004. DOI: 10.1023/B:MCBI.0000049134.69131.89.

VAYALIL, Praveen K.; ELEMENTS, Craig A.; KATIYAR, Santosh K. **Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin***Carcinogenesis*, 2003. DOI: 10.1093/carcin/bgg025.

VERRI, Waldiceu A.; CUNHA, Thiago M.; PARADA, Carlos A.; POOLE, Stephen; CUNHA, Fernando Q.; FERREIRA, Sérgio H. **Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development?***Pharmacology and Therapeutics*, 2006. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2006.04.001.

VERRI, Waldiceu A.; GUERRERO, Ana T. G.; FUKADA, Sandra Y.; VALERIO, Daniel A.; CUNHA, Thiago M.; XU, Damo; FERREIRA, Sérgio H.; LIEW, Foo Y.; CUNHA, Fernando Q. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 105, n. 7, p. 2723–8, 2008. DOI: 10.1073/pnas.0712116105. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18250323>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2268203>.

WANG, Handong; MAO, Lei; QIAO, Liang; WANG, Xiaoliang. Disruption of Nrf2

- enhances the upregulation of nuclear factor-kappaB activity, tumor necrosis factor- α , and matrix metalloproteinase-9 after spinal cord injury in mice. **Mediators of Inflammation**, [S. l.], v. 2010, 2010. DOI: 10.1155/2010/238321.
- WANG, Zhi Y.; AGARWAL, Rajesh; BICKERS, David R.; MUKHTAR, Hasan. Protection against ultraviolet b radiation-induced photocarcinogenesis in hairless mice by green tea polyphenols. **Carcinogenesis**, [S. l.], v. 12, n. 8, p. 1527–1530, 1991. DOI: 10.1093/carcin/12.8.1527.
- WERZ, Oliver; GERSTMEIER, Jana; LIBREROS, Stephania; DE LA ROSA, Xavier; WERNER, Markus; NORRIS, Paul C.; CHIANG, Nan; SERHAN, Charles N. Human macrophages differentially produce specific resolvin or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity. **Nature Communications**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1038/s41467-017-02538-5.
- WINROW, V. R.; WINYARD, P. G.; MORRIS, C. J.; BLAKE, D. R. Free radicals in inflammation: Second messengers and mediators of tissue destruction. **British Medical Bulletin**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 506–522, 1993. DOI: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072627.
- WITKO-SARSAT, Véronique; RIEU, Philippe; DESCAMPS-LATSCHA, Béatrice; LESAVRE, Philippe; HALBWACHS-MECARELLI, Lise. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. **Laboratory Investigation**, [S. l.], v. 80, n. 5, p. 617–653, 2000. DOI: 10.1038/labinvest.3780067. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/labinvest.3780067>.
- YAGI, Kunio. Lipid peroxides and human diseases. **Chemistry and Physics of Lipids**, [S. l.], v. 45, n. 2–4, p. 337–351, 1987. DOI: 10.1016/0009-3084(87)90071-5.
- YASUI, Hiroyuki; HAKOZAKI, Tomohiro; DATE, Akira; YOSHII, Takashi; SAKURAI, Hiromu. Real-time chemiluminescent imaging and detection of reactive oxygen species generated in the UVB-exposed human skin equivalent model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 347, n. 1, p. 83–88, 2006. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.06.046.
- ZAID, Mohammad Abu; AFAQ, Farrukh; SYED, Deeba N.; DREHER, Mark; MUKHTAR, Hasan. Inhibition of UVB-mediated Oxidative Stress and Markers of Photoaging in Immortalized HaCaT Keratinocytes by Pomegranate Polyphenol Extract POMx. [S. l.], p. 882–888, 2007.