



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Regina Viana de Carvalho Faria

**Efeito da administração de ativadores do Nrf2 no reparo tecidual de
camundongos obesos**

Rio de Janeiro

2023

Regina Viana de Carvalho Faria

**Efeito da administração de ativadores do Nrf2 no reparo tecidual de camundongos
obesos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental,
da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Bruna Romana de Souza

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F224 Faria, Regina Viana de Carvalho.
Efeito da administração de ativadores do Nrf2 no reparo tecidual de camundongos obesos / Regina Viana de Carvalho Faria. – 2023.
55 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Bruna Romana de Souza

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Obesidade – Complicações – Teses. 2. Fator 2 relacionado a NF-E2 – Agonistas. 3. Ferimentos e lesões – Tratamento farmacológico – Teses. I. Souza, Bruna Romana de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616-003.9

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Regina Viana de Carvalho Faria

**Efeito da administração de ativadores do Nrf2 no reparo tecidual de camundongos
obesos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental,
da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 04 de dezembro de 2023.

Orientadora: Prof.^a Dra. Bruna Romana de Souza

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Josiane Sabbadini Neves

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Sandra Barbosa da Silva

Departamento de Anatomia - UERJ

Prof.^a Dra. Vanessa de Souza Mello

Departamento de Anatomia – UERJ

Rio de Janeiro

2023

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas incríveis oportunidades e por me dar forças para finalizar essa grande etapa da minha vida.

Ao meu querido marido, Irving, por todo o apoio e carinho ao longo dos anos ao qual eu não teria metade da força e coragem que tenho hoje.

Aos meus pais, Denise e Fabio, por me acompanharem nesses 26 anos sempre apoiando meus sonhos e por serem meus queridos parceiros de vida.

À professora, orientadora e madrinha de casamento Bruna por me acompanhar há 7 anos, desde a iniciação científica, por todos os ensinamentos, apoio e por ser minha grande inspiração no mundo acadêmico.

Que Deus me dê serenidade para aceitar as coisas que não posso mudar, coragem para mudar as que posso e sabedoria para distinguir entre elas.

Reinhold Niebuhr

RESUMO

FARIA, Regina Viana de Carvalho. **Efeito da administração de ativadores do Nrf2 no reparo tecidual de camundongos obesos**. 2023. 55 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A obesidade é o acúmulo excessivo de gordura no corpo devido ao excesso de nutrientes. Essa condição leva a alterações fisiológicas que comprometem o reparo de lesões. A ativação da via do fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) pode melhorar e acelerar a cicatrização dessas lesões. Entretanto são necessários mais estudos para entender a relação entre essa via e o reparo de lesões. O objetivo desse projeto foi avaliar o efeito da ativação do Nrf2 por meio dos ativadores hidroxitirosol (HT) e dimetil fumarato (DMF) em animais obesos. Camundongos C57BL/6 machos foram alimentados diariamente com uma dieta AIN-93M controle ou uma dieta hiperlipídica (50% de energia de lipídios). Após 10 semanas, os animais foram tratados intraperitonealmente com HT (1 mg/Kg) e DMF (10 mg/Kg). Após 11 semanas foram criadas duas lesões excisionais totais no dorso dos animais. Após 8 dias de lesão, as cicatrizes foram coletadas. Após 10 ou 12 semanas de administração das dietas, o grupo obeso ou obeso+veículo apresentou um aumento significativo na massa corporal, na quantidade de gordura epididimária, no diâmetro dos adipócitos e na intolerância à glicose quando comparado ao grupo controle ou controle+veículo. A administração de DMF, mas não de HT, reduziu a massa corporal dos animais obesos quando comparado aos grupos controles (controle+veículo e obeso+veículo) após 12 semanas de dieta. Houve uma redução significativa no diâmetro dos adipócitos nos grupos obeso+HT e obeso+DMF após 12 semanas. Entretanto, não houve redução na quantidade de gordura epididimária em ambos os grupos após 12 semanas. A administração de HT ou DMF não alterou os efeitos de uma dieta hiperlipídica sobre a intolerância à glicose, mas apenas a administração de DMF reduziu os níveis séricos de glicose. A administração de uma dieta hiperlipídica aumentou os níveis séricos de insulina, triglicerídeos, colesterol e HDL colesterol após 12 semanas. A administração de HT ou DMF reduziu os níveis de insulina, colesterol e HDL colesterol, mas apenas a administração de HT reduziu os níveis de triglicerídeos em animais obesos após 12 semanas. A administração de uma dieta hiperlipídica induziu uma esteatose no fígado dos animais após 12 semanas, e o tratamento com os ativadores de Nrf2 não reverteu esse efeito. Contudo, a administração de HT ou DMF reduziu os níveis de mRNA de genes associados a lipogênese no fígado de animais alimentados com uma dieta hiperlipídica. O grupo obeso+veículo apresentou um aumento na área da lesão e uma redução na área re-epitelizada quando comparado ao grupo controle+veículo após 8 dias (12 semanas de dieta). A administração de HT ou DMF acelerou o fechamento das lesões cutâneas e a sua re-epitelização quando comparado aos grupos controle+veículo e obeso+veículo após 8 dias de lesão (12 semanas de dieta). O grupo obeso+veículo apresentou uma redução no conteúdo de fibras colágenas quando comparado ao grupo controle+veículo após 8 dias de lesão (12 semanas de dieta). Contudo, a administração de HT ou DMF reverteu o efeito da dieta hiperlipídica sobre a deposição de colágeno quando comparado aos grupos controle. O tratamento com HT ou DMF promoveu a translocação e a ligação do Nrf2 ao DNA em lesões cutâneas de animais obesos após 8 dias de lesão (12 semanas de dieta). Além disto, a administração de HT ou DMF reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica na lesão de animais obesos após 8 dias (12 semanas de dieta). Em conclusão, a administração de HT ou DMF promoveu o reparo de lesões cutâneas e atenuou alguns parâmetros obesogênicos.

Palavras-chave: obesidade; reparo tecidual; Nrf2.

ABSTRACT

FARIA, Regina Viana de Carvalho. *Effect of administration of Nrf2 activators in tissue repair of obese mice*. 2023. 55 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Obesity is the excessive accumulation of fat in the body due to excess nutrients. This condition leads to physiological changes that compromise injury repair. Activation of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) pathway can improve and accelerate the healing of these injuries. However, more studies are needed to understand the relationship between this pathway and injury repair. The objective of this project was to evaluate the effect of Nrf2 activation through the activators hydroxytyrosol (HT) and dimethyl fumarate (DMF) in obese animals. Male C57BL/6 mice were fed daily with a control AIN-93M diet or a high-fat diet (50% energy from lipids). After 10 weeks, the animals were treated intraperitoneally with HT (1 mg/kg) and DMF (10 mg/kg). After 11 weeks, two total excisional lesions were created on the animals' backs. After 8 days of injury, the scars were collected. After 10 or 12 weeks of administration of the diets, the obese or obese+vehicle group showed a significant increase in body mass, the amount of epididymal fat, adipocyte diameter and glucose intolerance when compared to the control or control+vehicle group. Administration of DMF, but not HT, reduced the body mass of obese animals when compared to control groups (control+vehicle and obese+vehicle) after 12 weeks of diet. There was a significant reduction in adipocyte diameter in the obese+HT and obese+DMF groups after 12 weeks. However, there was no reduction in the amount of epididymal fat in both groups after 12 weeks. The administration of HT or DMF did not alter the effects of a high-fat diet on glucose intolerance, but only the administration of DMF reduced serum glucose levels. Administration of a high-fat diet increased serum levels of insulin, triglycerides, cholesterol and HDL cholesterol after 12 weeks. Administration of a high-fat diet induced steatosis in the animals' liver after 12 weeks, and treatment with Nrf2 activators did not reverse this effect. However, administration of HT or DMF reduced the mRNA levels of genes associated with lipogenesis in the liver of animals fed a high-fat diet. The obese+vehicle group showed an increase in the lesion area and a reduction in the re-epithelialized area when compared to the control+vehicle group after 8 days (12 weeks of diet). The administration of HT or DMF accelerated the closure of skin lesions and their re-epithelialization when compared to the control+vehicle and obese+vehicle groups after 8 days of injury (12 weeks of diet). The obese+vehicle group showed a reduction in collagen fiber content when compared to the control+vehicle group after 8 days of injury (12 weeks of diet). However, the administration of HT or DMF reversed the effect of the high-fat diet on collagen deposition when compared to the control groups. Treatment with HT or DMF promoted the translocation and binding of Nrf2 to DNA in skin lesions of obese animals after 8 days of injury (12 weeks on diet). Furthermore, the administration of HT or DMF reduced the production of reactive oxygen species and lipid peroxidation in the lesion of obese animals after 8 days (12 weeks of diet). In conclusion, the administration of HT or DMF promoted the repair of skin lesions and attenuated some obesogenic parameters.

Keywords: obesity; tissue repair; Nrf2

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1 -	Composição das dietas segundo recomendação da AIN-93M.....	22
Tabela 2 -	Primers utilizados no qRT-PCR.....	26
Figura 1 –	Massa corporal dos camundongos C57Bl/6.....	28
Figura 2 –	Avaliação da massa da gordura epididimária.....	29
Figura 3 –	Avaliação do diâmetro dos adipócitos no tecido epididimário.....	30
Figura 4 –	Teste oral de tolerância à glicose na semana 0 (basal) e após 10 e 12 semanas.....	31
Figura 5 –	Níveis séricos de triglicerídeos, colesterol e HDL colesterol.....	32
Figura 6 -	Glicemia de jejum e níveis séricos de insulina.....	33
Figura 7 -	Desenvolvimento de esteatose hepática.....	34
Figura 8 -	Níveis de RNAm de marcadores envolvidos na síntese de ácidos graxos.....	35
Figura 9 -	Avaliação do fechamento das lesões.....	36
Figura 10-	Avaliação da re-epitelização de lesões.....	37
Figura 11	Conteúdo de fibras colágenas por análises histológica e bioquímica.....	38
Figura 12	Produção de espécies reativas de oxigênio e dano lipídico.....	39
Figura 13	Ativação da via Nrf2.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -SMA	α -actina de músculo liso
ARE	Elementos de resposta anti-oxidante
ACC1	Acetyl-CoA carboxylase 1
IMC	Índice de massa corpórea
CAT	Catalase
DMF	Dimetil fumarato
FAS	Ácido graxo sintase
GPx	Glutathione peroxidase
HO-1	Heme oxygenase-1
HT	Hidroxitirosol
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
Keap1	Kelch like ECH associated protein 1
NF-kB	Fator nuclear kappa B
Nrf2	Fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2
NQO1	NAD(P)H quinone dehydrogenase 1
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
Rbx1	RING-box protein 1
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SCD1	Stearoyl-CoA desaturase 1
SOD	Superóxido dismutase
SREBP-1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
mg	Miligramma
Kg	Quilograma
g	Grama
β	Beta
mL	Milímetro
cm	Centímetro
dl	Decilitro
α	Alfa
mmol	Milimol
μm	micrómetro
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celcius

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	OBESIDADE	13
2	REPARO TECIDUAL CUTÂNEO.....	14
3	TECIDO ADIPOSEO.....	16
4	REPARO TECIDUAL NA OBESIDADE.....	18
5	VIA DO Nrf2.....	19
6	HIDROXITIROSO E DIMETIL FUMARATO.....	20
7	OBJETIVOS.....	21
7.1	Objetivos específicos.....	21
8	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
8.1	Animais, dieta e tratamento.....	22
8.2	Lesão excisional total.....	23
8.3	Análise macroscópica.....	23
8.4	Teste oral de tolerância à glicose.....	23
8.5	Coleta das amostras.....	24
8.6	Análises histológicas.....	24
8.7	Análises bioquímicas.....	25
8.8	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (q-RT- PCR)	26
8.9	Ativação da via do Nrf2.....	27
8.10	Análise estatística.....	27
9	RESULTADOS.....	28
9.1	Massa corporal.....	28
9.2	Gordura epididimária.....	28
9.3	Tecido adiposo branco.....	29
9.4	Teste oral de tolerância à glicose.....	30
9.5	Níveis séricos de triglicerídeos, colesterol e HDL colesterol.....	31
9.6	Glicemia de jejum e níveis séricos de insulina.....	32
9.7	Análise do desenvolvimento de esteatose hepática.....	33
9.8	Marcadores da síntese de ácidos graxos.....	34
9.9	Avaliação do fechamento das lesões.....	35

9.10	Avaliação histológica da re-epitalização.....	37
9.11	Deposição de fibras colágenas.....	37
9.12	Espécies reativas de oxigênio e danos lipídico.....	38
9.13	Ativação da via Nrf2.....	39
10	DISCUSSÃO.....	41
	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.....	55

INTRODUÇÃO

A obesidade é definida com um acúmulo excessivo ou anormal de tecido adiposo que causa um risco à saúde. Atualmente, uma pessoa com índice de massa corpórea (IMC) igual ou maior a 30 é considerada obesa (DEHGHAN; AKHTAR-DANESH; MERCHANT, 2005). A obesidade é uma doença multifatorial, mas ela está primariamente associada ao balanço energético positivo, falta de atividade física e hábitos alimentares não saudáveis (LIFSHITZ; LIFSHITZ, 2014). A obesidade é o principal fator de risco de diversas doenças crônicas como doenças cardiovasculares, hipertensão, acidente vascular encefálico, diabetes, disfunção renal e certos cânceres. Além disso, a obesidade altera a fisiologia da pele comprometendo o reparo de lesões cutâneas. Em ratos, a indução da obesidade através da administração de uma dieta hiperlipídica aumenta a resposta inflamatória que compromete o fechamento de lesões cutâneas (ROSA et al., 2018). O nosso grupo demonstrou que a obesidade através da administração de uma dieta hiperlipídica causa um aumento na resposta inflamatória (como excessiva infiltração de neutrófilos e macrófagos, síntese exacerbada de citocinas pró-inflamatórias e formação de lipídeos peroxidados e proteínas carboniladas) que comprometem o fechamento de lesões cutâneas em ratos e camundongo (NASCIMENTO et al., 2006)(PAULINO DO NASCIMENTO et al., 2011) (OTRANTO et al., 2013). Poucos trabalhos propõem alvos terapêuticos que revertam ou atenuem os efeitos da obesidade no reparo de lesões cutâneas. Vêm sendo demonstrado que a ativação do fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) através da administração de compostos derivados de produtos naturais como o hidroxitirosol (HT) pode ser uma boa alternativa no tratamento de lesões comprometidas devido ao aumento do dano oxidativo (PENG et al., 2015). O HT é o principal polifenol presente no óleo de oliva extra virgem e possui um efeito protetor contra o dano oxidativo em culturas de fibroblastos dérmicos e células da medula da adrenal devida a sua capacidade de ativar o Nrf2 (PENG et al., 2015) (RIBEIRO et al., 2023). Além disto, a suplementação da dieta com 5 mg de HT é capaz de reduzir o dano oxidativo no tecido adiposo unilocular de camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica através do aumento da ativação do Nrf2 (ILLESCA et al., 2019). Outro promissor alvo terapêutico é o dimetil fumarato (DMF) que também é capaz de estimular a ativação do Nrf2 e a produção de enzimas antioxidantes e proteínas detoxificantes (JASOLIYA et al., 2019) (BLAIR, 2018). O DMF é capaz de atenuar a inflamação e o dano oxidativo em doenças inflamatórias crônicas, como a esclerose múltipla e psoríase (BLAIR, 2018).

1 OBESIDADE

A obesidade é definida como o acúmulo excessivo de gordura ou a distribuição anormal de gordura pelo corpo (PEREZ-CAMPOS MAYORAL et al., 2019). Uma pessoa com IMC maior que 30 é considerada obesa (CABALLERO, 2019). No Brasil, a prevalência de obesos adultos foi de 26,8% em 2019 (IBGE, 2019), e de acordo com a World Obesity Federation (WORLD OBESITY ATLAS, 2023), a prevalência de indivíduos adultos obesos será de 45% em 2035 no Brasil. Isso causará um impacto econômico de mais de 75 milhões de dólares para seu o tratamento. A obesidade aumenta a mortalidade e as chances de desenvolvimento de outras doenças como: diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, hiperlipidemia, hipertensão e esteatose hepática não alcoólica (PICHE; TCHERNOF; DESPRÉS, 2020).

A obesidade é um problema de saúde pública onde devem ser propostos tratamentos para o seu controle. O aumento de casos está relacionado ao grande número de oferta de alimentos ultraprocessados (SWINBURN; SACKS; RAVUSSIN, 2009) e baixos níveis de esforço e atividade física na sociedade (CHURCH et al., 2011). Além disso, o período de 2020 a 2022 foi caracterizado por restrições e “lockdowns” que piorou a qualidade da dieta e aumentou o sedentarismo. Isto indica que a pandemia causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2) agravou a epidemia da obesidade (WORLD OBESITY ATLAS, 2023).

Os tratamentos propõem dietas, programas de atividades físicas, medicamentos e cirurgias. Sabe-se que uma perda de 5% a 10% de massa corporal é suficiente para mitigar a chance do desenvolvimento de diabetes ou doenças cardiovasculares em humanos (HAMMAN et al., 2006) (LEBLANC et al., 2011). Entretanto, dados clínicos demonstram que 26,65% dos pacientes pós-bariátricos submetidos a cirurgias plásticas reparadoras (como abdominoplastia e mastoplastia) apresentam complicações na cicatrização cutânea (CORRÊA ROSA, 2018).

2 REPARO TECIDUAL NORMAL

O reparo tecidual é um processo dinâmico que inclui quatro estágios: homeostase, inflamação, proliferação e remodelação. Para um reparo eficiente, todas essas fases devem ocorrer em sequência e tempos corretos. Os principais eventos que caracterizam um reparo ideal são uma rápida homeostase, inflamação controlada, proliferação, migração de células para a área lesionada, re-epitelização, síntese e remodelamento das fibras colágenas que serão responsáveis pela resistência do novo tecido (WILKINSON; HARDMAN, 2020)

Na fase de homeostase, os vasos sanguíneos lesionados contraem e há a formação de coágulos que permitem a proteção do tecido lesionado. O coágulo é formado por uma agregação de plaquetas em uma rede de fibrina. Essa rede garante a homeostase, impede a entrada de microorganismos e organiza uma matriz celular temporária que permite a migração celular e posterior síntese de fibras colágenas (TALBOTT et al., 2022).

A fase inflamatória é caracterizada pelo grande influxo de neutrófilos nas primeiras 24 horas coincidindo com sintomas de inflamação, como edema e eritema na lesão (GURTNER et al., 2008). Essas células expressam citocinas inflamatórias como a interleucina-1 β (IL-1 β), fatores de crescimento como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e espécies reativas de oxigênio (ROS) que recrutam ainda mais neutrófilos para a área lesionada. Isso permite a destruição da rede de fibrina e expressão de moléculas de adesão que possibilitarão a aderência e direcionamento dos fibroblastos para o local da injúria nas próximas fases do reparo (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007).

A fase de proliferação inclui angiogênese, fibroplasia e re-epitelização. A angiogênese envolve a produção de novos vasos sanguíneos a partir de vasos colaterais através do processo de germinação ou divisão celular, garantindo o transporte de nutrientes e oxigênio para o tecido. A fibroplasia inicia-se com a degradação da matriz de fibrina pelos fibroblastos sintetizando metaloproteinases que substituirão a matriz extracelular por colágeno tipo I, II, III e IV, glicoproteínas, ácido hialurônico e glicosaminoglicanos. Dentre elas está a tenacina-C que possui o importante papel de controlar a migração dos fibroblastos na formação da nova matriz. Estudos *in vitro* demonstraram que fragmentos específicos da tenascina C inibem a migração de fibroblastos (TREBAU; CHAN; MIDWOOD, 2007). Essa nova matriz formada permite o suporte e a migração de mais fibroblastos, que ao chegarem à área lesionada se diferenciam em miofibroblastos (MORETTI et al., 2022) Essas novas células são caracterizadas pela expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) que possibilita o fechamento da lesão (MORETTI et al.,

2022). Ainda na fase de proliferação, as fibras colágenas também são sintetizadas na matriz extracelular pelos fibroblastos e miofibroblastos. Inicialmente elas são formadas em sua maioria pelo colágeno tipo III, fibronectina e ácido hialurônico. Então, a fibra é degradada e substituída por colágeno tipo I com maior força tensil remodelando a matriz extracelular e alterando sua estrutura tridimensional e densidade (WILKINSON; HARDMAN, 2020) (MORETTI et al., 2022).

A fase de remodelação é responsável pelo fechamento da lesão e substituição do tecido afetado pelo original. A superfície da lesão é recoberta por uma camada de queratinócitos e é restabelecida uma nova camada estratificada com lâmina basal subjacente (WILKINSON; HARDMAN, 2020). A sua principal característica é o aumento da deposição de colágeno tipo I de forma organizada, aumento da densidade das fibras de colágeno, degradação do ácido hialurônico e fibronectina. Nesta fase, as fibras colágenas conseguem alcançar até 80% da força do tecido original, porém nunca alcançam a força máxima de um tecido não lesionado (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ; 2009).

3 TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo branco é o maior tecido de depósito de gordura que secreta adipocinas e citocinas. As adipocinas estão envolvidas em cascatas de sinalização e metabolização regulando a sinalização de insulina, ácidos graxos e captação de glicose (AHIMA; LAZAR, 2008). As citocinas regulam o processo de inflamação no reparo tecidual normal contribuindo para a sinalização celular, migração e síntese de fatores de crescimento.

A obesidade influencia o fenótipo do tecido adiposo branco. O consumo excessivo de nutrientes acumula nos depósitos viscerais e subcutâneos, de forma que os adipócitos sofram hiperplasia (aumento do número de células) e hipertrofia (aumento do tamanho celular) (UNAMUNO et al., 2018). Isto causa uma síntese em excesso de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e interleucina-6 (IL-6) (MORETTI et al., 2022). Essas citocinas contribuem para a infiltração excessiva de macrófagos, na promoção de um perfil M1 de macrófagos (pró-inflamatório) e no aumento de células do sistema imunológico. O aumento de células diminui a vascularização tecidual desencadeando hipóxia, fibrose tecidual e morte de adipócitos (UNAMUNO et al., 2018).

A síntese prolongada de citocinas como o TNF- α causa a desfosforilação dos receptores de insulina levando a resistência à insulina pelo indivíduo. Altos níveis de glicose aumentam a geração intracelular de ROS via NADPH oxidase levando a peroxidação lipídica em adipócitos, fígado e músculo esquelético em humanos. Além disso, altos níveis de ROS promovem a ativação de vias como a do fator nuclear kappa B (NF- κ B) que elevam ainda mais a síntese de citocinas pró-inflamatórias (AHMED; SULTANA; GREENE, 2021).

O aumento de depósitos no tecido adiposo branco, inicialmente, aumenta a sua atividade metabólica causando estresse oxidativo. O excesso de lipídios promove um aumento contínuo da produção mitocondrial de ROS. Uma vez não neutralizados por mecanismos enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) ou glutatona peroxidase (GPx), ocorrem alterações nos níveis celulares e moleculares complicando ainda mais o contexto da obesidade (D'ALESSANDRO et al., 2015).

O estresse do retículo endoplasmático foi indicado como fator chave para a obesidade associada à disfunção metabólica. Com o alto consumo, nutrientes e lipídios são acumulados no retículo endoplasmático resultando no estresse da organela e inflamação crônica no tecido adiposo e fígado de camundongos (KAWASAKI et al., 2012). Além disso, a hiperglicemia

também promove o estresse do retículo endoplasmático em hepatócitos e aumenta o acúmulo de lipídios no fígado (ALHUSAINI et al., 2012).

4 REPARO TECIDUAL NA OBESIDADE

A obesidade envolve diversos distúrbios metabólicos, dentre eles a hipertensão, hiperlipidemia, diabetes e esteatose hepática não alcoólica. Essas condições dificultam o reparo tecidual, prolongando a fase inflamatória e postergando a contração da lesão, re-epitelização e formação do tecido de granulação (NASCIMENTO; COSTA, 2006). O aumento dos adipócitos no indivíduo obeso não acompanha um aumento adequado do número de vasos sanguíneos. Esse cenário resulta em diminuição de oxigênio disponível e morte celular com liberação de citocinas pró-inflamatórias e mais infiltração de macrófagos, neutrófilos e células de defesa. Esse longo processo inflamatório pode atrasar a diferenciação de miofibroblastos postergando o fechamento de lesões (NASCIMENTO; COSTA, 2006).

A inflamação crônica causada pela obesidade com altos níveis séricos de IL-6, TNF- α e proteína C reativa (COPPACK, 2001) leva lesões já fechadas a terem características crônicas. Foram encontrados leucócitos polimorfonucleares, miofibroblatos e diminuição na densidade de fibras colágenas mesmo após 21 dias da lesão (NASCIMENTO; COSTA, 2006) (NASCIMENTO et al, 2011) (OTRANTO et al, 2013).

5 VIA DO Nrf2

Em resposta ao dano oxidativo, as células possuem diferentes mecanismos para regular a quantidade de ROS. Em condições basais, o Nrf2 é inibido pelo kelch like ECH associated protein 1 (Keap1) presente no citoplasma celular. O Keap1 está ligado a um complexo de ubiquitinas RING-box protein 1 (Rbx1) que impede a ativação da via do Nrf2 (BUENDIA et al., 2016).

Em condições de estresse celular, moléculas como ROS modificam a estrutura conformacional da Keap1 com a liberação do Nrf2 que é imediatamente translocado para o núcleo. Logo após, o Nrf2 forma um complexo com proteínas MAF ou JUN que se ligam à área promotora da síntese de elementos de resposta anti-oxidante (ARE) (BUENDIA et al., 2016). Essas proteínas controlam a produção de enzimas antioxidantes e proteínas detoxificantes, como NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), heme oxygenase-1 (HO-1), SOD, CAT e GPx (JASOLIYA et al., 2019). Com base no papel antioxidante (ou anti-inflamatório) do Nrf2 é possível que a ativação desta via seja capaz de melhorar a cicatrização em indivíduos obesos.

6 HIDROXITIROSO E DIMETIL FUMARATO

O óleo de oliva extra virgem é composto em sua maior fração (85-75%) por ácido oleico. A menor fração é composta por componentes fenólicos com propriedade antioxidantes como o HT. Sua capacidade antioxidante está relacionada a doação de átomos de hidrogênio pelo o seu grupamento catecol que melhora a estabilidade de átomos de radicais livres. Isto permite a formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular entre os hidrogênios livres do seus grupos hidroxila e seus radicais fonoxila, conseguindo inativar radicais livres por meio de sua estrutura. Além disso, o HT é capaz de modular e ativar vias antioxidantes como a do Nrf2 que produz enzimas com efeitos antioxidantes (ECHEVERRÍA et al., 2017).

A suplementação com HT melhora alterações morfológicas dos adipócitos diminuindo sua hipertrofia e consequentemente, diminuindo níveis séricos de triglicerídeos. Além disso, camundongos suplementados com HT apresentam uma expressão reduzida de TNF- α e IL-6, indicando uma propriedade anti-inflamatória ao reduzir a ativação da via do NF- κ B, assim reduzindo os níveis de citocinas inflamatórias (ILLESCA et al., 2019).

O DMF é um éster de ácido fumárico. Esse composto é muito utilizado para o tratamento da esclerose múltipla e psoríase (BLAIR et al., 2018). O seu principal mecanismo é a redução do estresse oxidativo nos tecidos através da ativação da via do Nrf2 e redução da inflamação através da inibição da via do NF- κ B. A ativação da via do NF- κ B é controlada pelo seu inibidor I κ B α que impede a síntese de citocinas inflamatórias como a TNF- α , IL-1 β e IL-6. O fator de transcrição Nrf2 inibe a ubiquitinação do I κ B α impedindo a síntese de citocinas inflamatórias. O DMF foi capaz de reduzir a inflamação e o dano oxidativo em ratos com hiperfusão cerebral crônica (YAN et al., 2021).

Com base nas ações anti-inflamatórias/antioxidantes do HT e do DMF mediadas pela modulação da via Nrf2 é possível que esses agentes tenham o potencial de melhorar o processo de cicatrização em obesos. Contudo, até o momento ainda não existem estudos que suportem esta hipótese.

7 OBJETIVOS

Avaliar o efeito terapêutico da ativação do Nrf2 através da administração de HT ou DMF no reparo cutâneo de camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica.

7.1 Objetivos específicos

a) Avaliar se a administração de ativadores do Nrf2 pode acelerar a cicatrização de lesões cutâneas promovendo o seu fechamento, re-epitalização e deposição de colágeno em camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica;

b) Avaliar se a administração de ativadores do Nrf2 pode reduzir o dano oxidativo em lipídeos e a produção de ROS em lesões cutâneas de camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica;

c) Confirmar se a administração de ativadores do Nrf2 pode promover a translocação e a ligação do Nrf2 ao DNA em lesões cutâneas de camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica;

d) Avaliar se a administração dos ativadores do Nrf2 pode atenuar os parâmetros associados a obesidade em camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica como: tolerância à glicose, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hiperglicemia, esteatose hepática e aumento na quantidade de tecido adiposo branco, níveis de insulina e de massa corporal.

8 MATERIAL E MÉTODOS

8.1 Animais, dieta e tratamento

O protocolo experimental foi aprovado pelo CEUA-IBRAG-UERJ (nº 012/2020). Camundongos da linhagem C57Bl/6, machos, 12 semanas, foram acondicionados em grupos de 3-5 animais por caixa, com livre acesso a dieta e água filtrada. Inicialmente, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos e alimentados com duas diferentes dietas: uma dieta controle com 14% de energia derivada de proteínas, 76% de energia derivada de carboidratos e 10% de lipídeos; uma dieta hiperlipídica contendo 14% de energia derivada de proteínas, 36% de energia derivada de carboidratos e 50% de energia derivada de lipídeos (Tabela 1). A administração dessas dietas foi mantida até o final do experimento. Estas dietas foram consistentes com as recomendações do American Institute of Nutrition para manutenção de roedores adultos (AIN-93M) (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR, 1993)

Tabela 1 – Composição das dietas segundo recomendação da AIN-93M

Componente	Controle (%)	Hiperlipídico (%)
Amido de Milho	46,57	23,27
Caseína	14,00	17,50
Amido Dextrinizado	15,50	11,50
Sacarose	10,00	10,00
Óleo de Soja	4,00	4,00
Banha	-	23,80
Celulose Microcristalina	5,00	5,00
Mix Mineral AIN-93M	3,50	3,50
Mix Vit AIN-93	1,00	1,00
L cistina	0,18	0,18
Bitartarato de colina	0,25	0,25
BHA	0,0008	0,006

Legenda: BHA, beta-hidroxiácidos.

Fonte: Pragsoluções Biociências, São Paulo, Brasil.

Após 10 semanas de administração das dietas controle e hiperlipídica, os animais foram divididos em seis grupos: grupo controle+salina, grupo obeso+salina, grupo controle+HT, grupo obeso+HT, grupo controle+DMF, e grupo obeso+DMF.

A administração intraperitoneal de DMF ou HT iniciou-se na décima semana e se manteve diariamente até a coleta das amostras. A dose de DMF (10 mg/Kg) foi escolhida devido a sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo em camundongos. A dose de HT (1 mg/Kg) foi calculada com base na dose diária recomendada pelo painel da European Food Safety Authority para humanos.

Os animais foram pesados semanalmente até o final do experimento para a massa corporal.

8.2 Lesão excisional total

Após 11 semanas da administração das dietas, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/Kg, via intraperitoneal) e xilazina (10 mg/Kg, via intraperitoneal). O pelo do dorso dos animais foi removido e limpo com álcool isopropílico, em seguida, duas lesões excisionais totais com 6 mm de diâmetro foram criadas no dorso dos animais expondo o tecido muscular. A lesão não foi suturada ou coberta com curativo e cicatrizou-se por segunda intenção (AMADEU;COSTA, 2006). As lesões foram fotografadas no dia da sua realização e após 3 e 8 dias para acompanhar o seu fechamento.

8.3 Análise macroscópica

Para avaliar o fechamento da lesão, a área total foi medida nas imagens capturadas no dia de sua realização (dia zero) e após 3 e 8 dias com o auxílio do software Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA). Os resultados do fechamento da lesão foram expressos pela porcentagem da área lesada original.

8.4 Teste oral de tolerância à glicose

No início do experimento (semana 0) e após 10 e 12 semanas de dieta foi realizado o teste oral de tolerância à glicose. Para isto, os animais foram submetidos a 6-8 horas de jejum antes do teste. Em seguida, os níveis séricos de glicose foram medidos com auxílio de glicosímetro (Accu-Chek Active; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) (0 minutos). Posteriormente, os animais foram tratados com uma solução hipertônica de glicose a 25% por gavagem com uma dose de 1 g/Kg de peso corporal e os níveis séricos de glicose foram medidos com auxílio de glicosímetro (Accu-Chek Active) após 5, 15, 30, 60 e 120 minutos. A área sob a curva foi calculada (CAO KEL, et al. 2014).

8.5 Coleta das amostras

Após 8 dias de lesão os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/Kg, via intraperitoneal) e xilazina (10 mg/Kg, via intraperitoneal) e, uma hora após, foram eutanasiados. O sangue periférico foi coletado, e o soro separado e congelado a -80°C. Cinco a sete cicatrizes por grupo foram fixadas em formalina tamponada (pH 7,2), processadas e incluídas em parafina para análises histológicas. Três cicatrizes por grupo foram congeladas a -80°C para dosagem de hidroxiprolina. O fígado também foi coletado e pesado e fixado em formalina tamponada (pH 7,2) para avaliar a formação de esteatose. Alguns fragmentos do fígado (três por grupo) foram embebidos em RNALater® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, EUA) para a extração de RNA. Além disto, a gordura epididimária foi coletada, pesada com o auxílio de balança analítica (OHAUS, Tamboré, Brasil) e alguns fragmentos foram fixados em formalina tamponada (pH 7,2) para análise histológica. O peso da gordura epididimária foi corrigido pelo comprimento da tíbia (YIN et al., 1982).

8.6 Análises histológicas

Após a fixação, os tecidos coletados foram processados para microscopia de luz. Para isto, eles foram desidratados com crescentes concentrações de álcool etílico, embebidos em parafina e seccionados.

Para medir a re-epitelização, os cortes histológicos (5 μm) foram corados com hematoxilina e eosina e posteriormente digitalizados com o auxílio de escâner de lâminas (3Dhistech Ltd., Budapeste, Hungria). Os cortes digitalizados foram analisados com o software de imagem Pannoramic Viewer (3DHISTECH Ltd.) que foi previamente calibrado usando uma escala. A área não re-epitelizada foi definida como a distância entre extremidades de línguas epiteliais migratórias. A largura total do tecido de granulação foi definida como a distância entre as margens das lesões. A área re-epitelizada foi estimada através da diferença entre a largura total do tecido de granulação e área não re-epitelizada (SAGUIE et al., 2017) (DONATO-TRANCOSO et al., 2023).

Para avaliar o conteúdo de fibras colágenas, os cortes histológicos (5 μm) foram corados com vermelho de Picrosirius. Em seguida, imagens foram capturadas com o auxílio de um sistema de videomicroscopia com luz polarizada. As fibras colágenas avermelhadas, amareladas e esverdeadas foram medidas com o auxílio do software ImageJ (Hiebert et al., 2018).

Para avaliar o diâmetro dos adipócitos do tecido epididimário, cortes histológicos (5 μm) foram corados com hematoxilina e eosina. Em seguida imagens foram capturadas com o auxílio de um sistema de videomicroscopia com luz branca. O maior e o menor diâmetro de 10 adipócitos por imagem foram medidos com o auxílio de software de imagens.

Para avaliar a formação de esteatose hepática, cortes histológicos do fígado (5 μm) foram corados com hematoxilina e eosina e o acúmulo de gotículas lipídicas nos hepatócitos foi estimada com um sistema teste de 42 pontos e sistema de videomicroscopia com luz branca (BARROSO et al., 2017).

8.7 Análises bioquímicas

Os níveis sorológicos de insulina foram medidos por ELISA utilizando um kit comercial (Thermo Scientific, Waltham, MS, EUA). Além disto, os níveis sorológicos de colesterol, triglicerídeos e HDL colesterol totais foram medidos através de kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil).

Para avaliar a deposição de colágeno os níveis de hidroxiprolina foram quantificados. Fragmentos congelados das cicatrizes foram desidratados e os lipídeos foram removidos com

auxílio de solventes orgânicos. Em seguida, as amostras foram secas, pesadas, hidrolisadas em ácido clorídrico 6N e neutralizadas em hidróxido de sódio 6N (Proquimios, Rio de Janeiro, Brasil). O conteúdo de hidroxiprolina nas amostras foi medido como previamente descrito (WOESSNER, 1961). Os resultados foram expressos em nanogramas de hidroxiprolina por miligrama de tecido.

Fragmentos congelados de cicatrizes foram macerados em tampão RIPA e os níveis totais de proteínas foram estimados com o auxílio de um kit comercial baseado na reação com ácido bincincônico (Thermo Scientific). Os níveis de lipídeos peroxidados foram medidos no lisado tecidual a partir do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme descrito anteriormente (DRAPER; HADLEY, 1990). Os resultados foram expressos em μM de malondialdeído por mg total de proteína. A produção de ROS também foi medida no lisado tecidual através de um ensaio colorimétrico baseado na reação do sal azul nitrotetrazolium com espécies reativas de oxigênio conforme descrito anteriormente (CHOI et al., 2006).

8.8 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)

A expressão gênica de mediadores envolvidos na lipogênese (sterol regulatory element binding transcription factor 1 [SREBP1], stearyl-CoA desaturase 1 [SCD1], acetyl-CoA carboxylase 1 [ACC1] e ácido graxo sintase [FAS]) foi estimada no fígado (Tabela 2). Os dados foram normalizados com a expressão de GAPDH. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando o StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MS, EUA). O método de quantificação usado foi o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para isto, o cDNA foi obtido a partir do RNA total das amostras utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

Tabela 2 – Primers utilizados no qRT-PCR

Nome	Alvo	Primer senso	Primer anti-senso
Acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1)	Mouse	5'- ACATTCCGAGCAAGGGA TAAG-3'	5'- GGGATGGCAGTAAGG TCAAA-3'
Fatty acid synthase (FAS)	Mouse	5'- AGACCCGAAGTCCAAGTT ATTG-3'	5'- GCAGCTCCTTGTATAC TTCTCC-3'

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Mouse	5'-AACAGCAACTCCCACTCTTC-3'	5'-CCTGTTGCTGTAGCCGTATT-3'
Sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1)	Mouse	5'-CATCGACTACATCCGCTTCTT-3'	5'-CACCAGGTCCTTCAGTGATTT-3'
Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1)	Mouse	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA-3'	5'-GGTTCAGAGGATGGACAGAAAG-3'

Legenda: Todos os primers foram fornecidos por Integrated DNA Technologies IDT (Coralville, IA, EUA).
Fonte: A Autora, 2023.

8.9 Ativação da via do Nrf2

Para estimar a ativação do Nrf2, o extrato nuclear foi obtido utilizando um kit comercial (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A atividade do Nrf2 foi subsequentemente determinada usando um kit Nrf2 Transcription Factor Assay (Cayman Chemical Company), que é um método sensível e não radioativo para detectar atividade de ligação de DNA de fator de transcrição específico em extratos nucleares, seguindo as instruções do fabricante (RIBEIRO et al, 2023).

8.10 Análise estatística

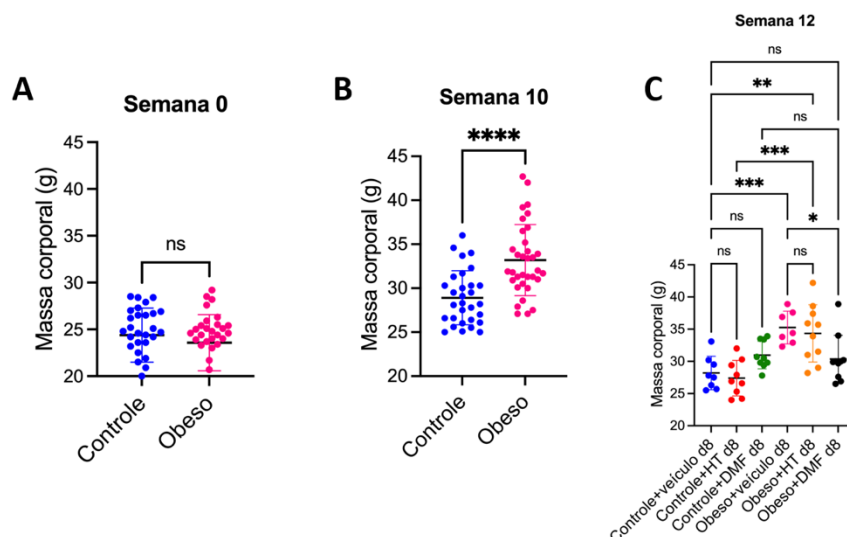
Em todos os experimentos, os dados foram expressos como média e desvio padrão. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. A comparação dos dados de três ou mais grupos foi realizada através de one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Boston, MA, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

9 RESULTADOS

9.1 Massa corporal

Após 10 semanas da administração das dietas foi observado um aumento significativo da média da massa corporal do grupo obeso (Figura 1A e B). Na 12ª semana foi possível observar uma redução na média da massa corporal no grupo obeso+DMF quando comparado ao grupo obeso+veículo e controle+veículo (Figura 1C). Entretanto, isso não foi observado no grupo obeso+HT (Figura 1C).

Figura 1 - Massa corporal dos camundongos C57BL/6



Legenda: A: Comparação entre a massa corporal (g) dos animais controles e obesos na semana 0. B: Comparação entre a massa corporal (g) dos animais controles e obesos na semana 10. C: Efeito da administração de HT ou DMF na massa corporal dos animais controles e obesos após 12 semanas. Dados: n= 7 - 10 animais por grupo, os resultados foram expressos por média $\pm$ desvio padrão, One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Nota: g: gramas, d: dias, ns: não significativo, HT: hidroxitirosol, DMF: dimetil fumarato.

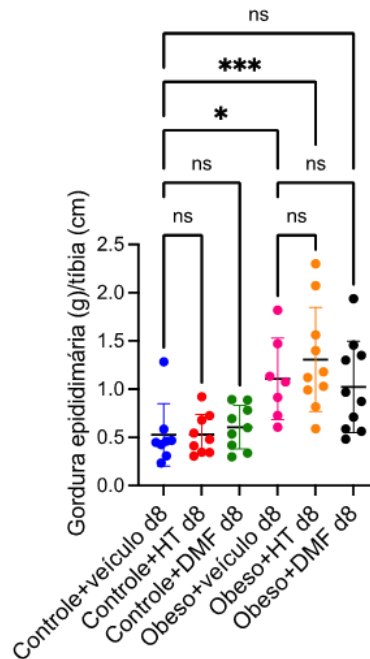
Fonte: A autora, 2023.

9.2 Gordura epididimária

A administração de uma dieta hiperlipídica aumentou a quantidade do tecido adiposo epididimário após 12 semanas (Figura 2). A administração de HT ou DMF não foi capaz de

alterar a massa de gordura epididimária nos grupos obeso+HT e obeso+DMF quando comparado ao obeso+veículo (Figura 2).

Figura 2 - Avaliação da massa da gordura epididimária



Legenda: Massa da gordura epididimária em g corrigida pelo comprimento da tíbia em cm dos animais controles ou obeso após 12 semanas de dieta (8 dias de lesão). Dados: n= 5 - 7 animais por grupo, os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

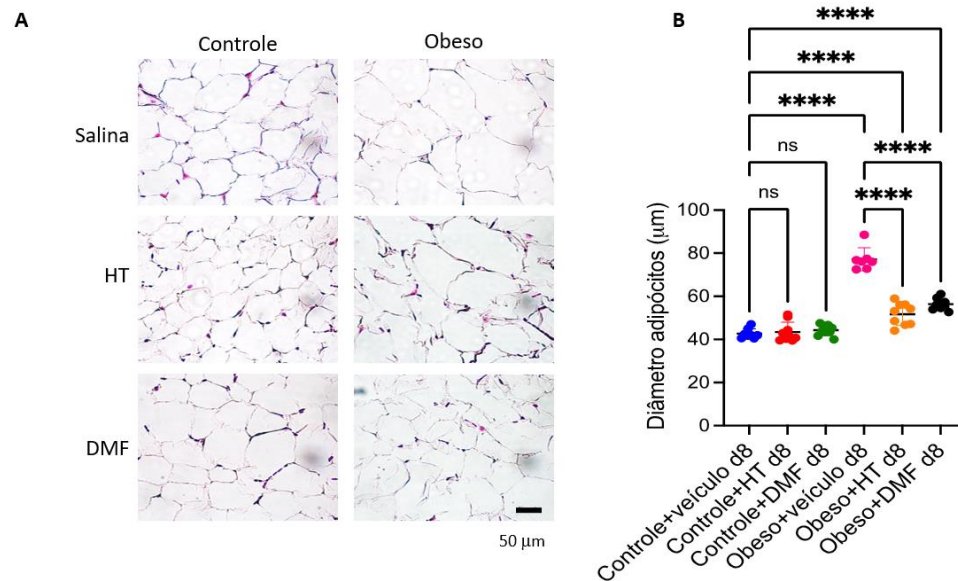
Nota: d: dias, ns: não significativo, HT: hidroxitirosol, DMF: dimetil fumarato.

Fonte: A autora, 2023.

9.3 Tecido adiposo branco

A administração de uma dieta hiperlipídica aumentou o diâmetro dos adipócitos no tecido epididimário dos animais após 12 semanas de dieta (Figura 3A e B). A administração de HT e DMF foi capaz de reduzir o diâmetro dos adipócitos no tecido epididimário de animais obesos quando comparado ao grupo obeso+veículo e controle+veículo após 12 semanas de dieta (Figura 3A e B).

Figura 3 – Avaliação do diâmetro dos adipócitos no tecido epididimário



Legenda: A: Imagens representativas do tecido adiposo epididimário dos animais controles e obesos após 12 semanas de dieta (8 dias após a lesão). Coloração de hematoxilina e eosina. Escala = 50 μ m. B: Análise morfométrica do diâmetro dos adipócitos no tecido epididimário após 12 semanas de dieta (8 dias após a lesão). Dados: n= 5 – 7 animais por grupo, os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

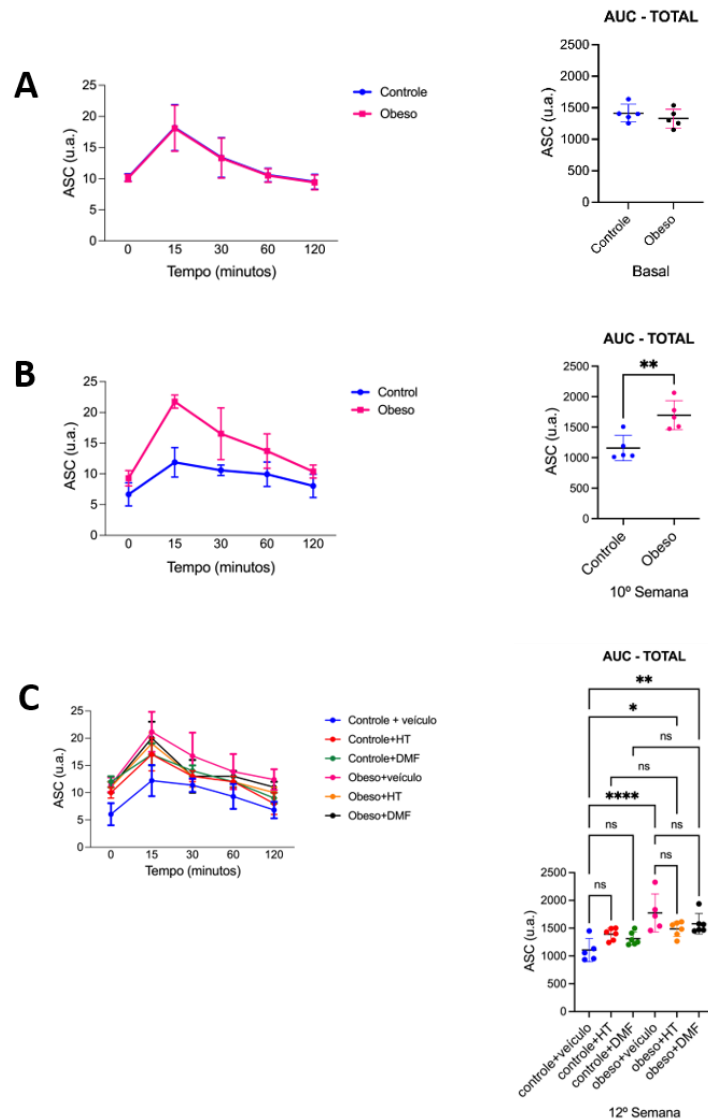
Nota: d: dias, ns: não significativo, HT: hidroxitirosol, DMF: dimetil fumarato.

Fonte: A autora, 2023

9.4 Teste oral de tolerância à glicose

Após 10 semanas da administração das dietas foi observado um aumento da área sobre a curva no teste oral de tolerância à glicose quando comparado ao grupo controle+veículo (Figura 4A e B). Após 12 semanas não foi observada uma redução na área sob a curva nos grupos obeso+HT e obeso+DMF quando comparado ao grupo obeso+veículo e controle+veículo (Figura 4C).

Figura 4 - Teste oral de tolerância à glicose na semana 0 (basal) e após 10 e 12 semanas



Legenda: A: Teste oral de tolerância à glicose antes da administração das dietas (semana 0 ou basal) dos animais controles e obesos. B: Teste oral de tolerância à glicose após 10 semanas de dietas. C: Teste oral de tolerância à glicose após 12 semanas de dieta. Dados: $n = 5 - 7$ animais por grupo, os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

Nota: ASC: área sob a curva, u.a.: unidade arbitrária, ns: não significativo, HT: hidroxitirosol, DMF: dimetil fumarato.

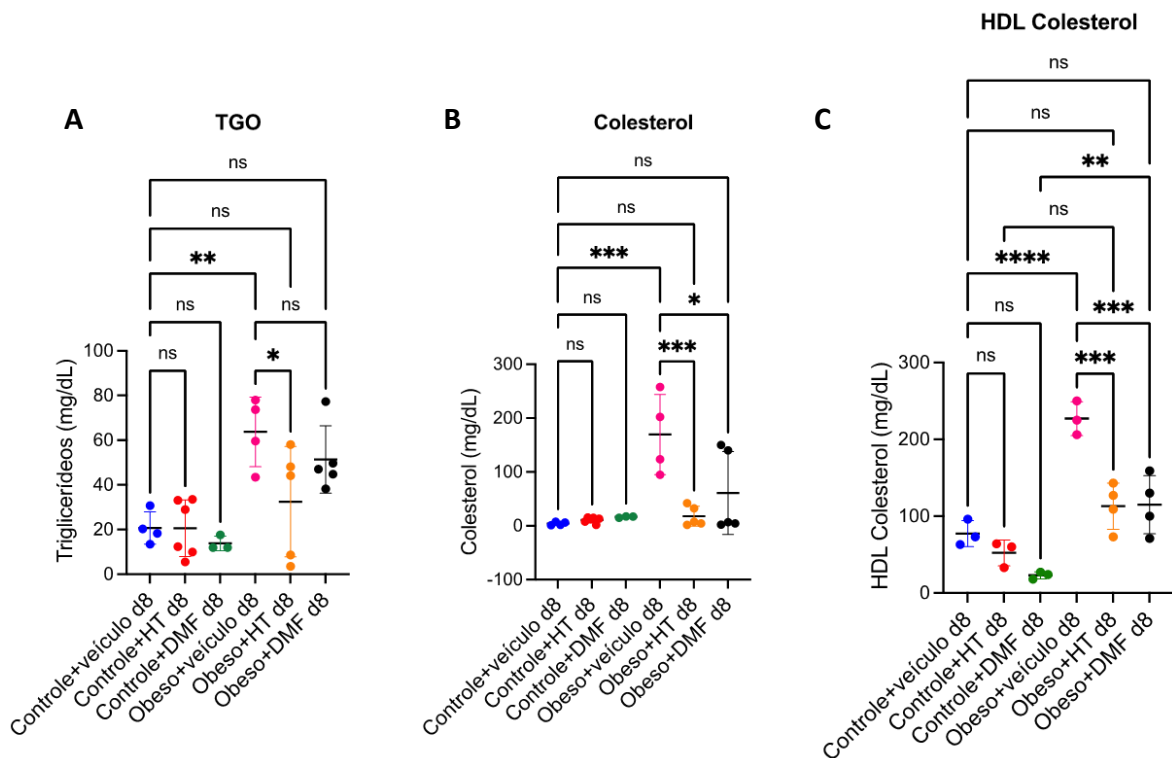
Fonte: A autora, 2023.

9.5 Níveis séricos de triglicerídeos, colesterol e HDL colesterol

A administração de uma dieta hiperlipídica aumentou os níveis séricos de triglicerídeos, colesterol e HDL colesterol quando comparado ao grupo controle+veículo após 12 semanas de dieta (Figura 5A, B e C). A administração de HT reduziu os níveis séricos de triglicerídeos,

colesterol e HDL colesterol nos animais obesos quando comparado aos grupos obeso+veículo e controle+veículo (Figura 5A, B e C) após 12 semanas de dieta. A administração de DMF reduziu os níveis séricos de colesterol e HDL colesterol nos animais obesos quando comparado aos grupos obeso+veículo (Figura 5A, B e C) após 12 semanas de dieta.

Figura 5 - Níveis séricos de triglicerídeos, colesterol e HDL colesterol



Legenda: A: Níveis séricos de triglicerídeos em mg/dL nos grupos controle e obeso após 12 semanas de dieta (8 dias após a lesão). B: Níveis séricos de colesterol em mg/dL nos animais controles e obesos após 12 semanas de dieta (8 dias após a lesão). C: Níveis séricos de HDL colesterol em mg/dL nos animais controles e obesos após 12 semanas de dieta (8 dias após a lesão). Dados: n= 3 - 6 animais por grupo, os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Nota: d: dia, ns: não significativo, TGO: triglicerídeo, HT: hidroxitirosol, DMF: dimetil fumarato.

Fonte: A autora, 2023.

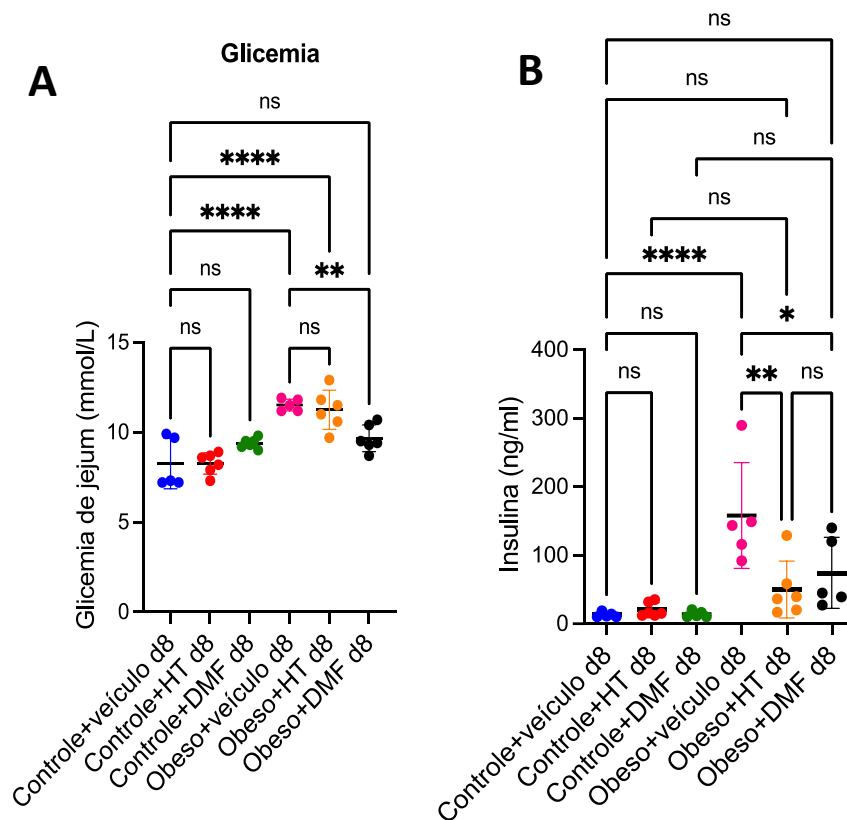
9.6 Glicemia de jejum e níveis séricos de insulina

A administração de uma dieta hiperlipídica aumentou a glicemia de jejum quando comparado ao grupo controle+veículo (Figura 6A) após 12 semanas de dieta. A administração

de DMF, mas não a de HT, reduziu a glicemia de jejum nos animais obesos quando comparado ao grupo obeso+veículo e controle+veículo (Figura 6A) após 12 semanas de dieta.

Os animais alimentados com uma dieta hiperlipídica apresentaram um aumento nos níveis séricos de insulina quando comparado ao grupo controle+veículo (Figura 6B) após 12 semanas de dieta. A administração de HT ou DMF não alterou os níveis séricos de insulina nos animais obesos quando comparado ao grupo obeso+veículo (Figura 6B) após 12 semanas de dieta.

Figura 6 - Glicemia de jejum e níveis séricos de insulina



Legenda: A: Avaliação da glicemia de jejum em mmol/L nos grupos controle e obeso após 12 semanas de dieta (8 dias após a lesão). B: Níveis séricos de insulina em ng/mL nos animais controles e obesos após 12 semanas de dieta (8 dias após a lesão). Dados: n= 4 - 6 animais por grupo, os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

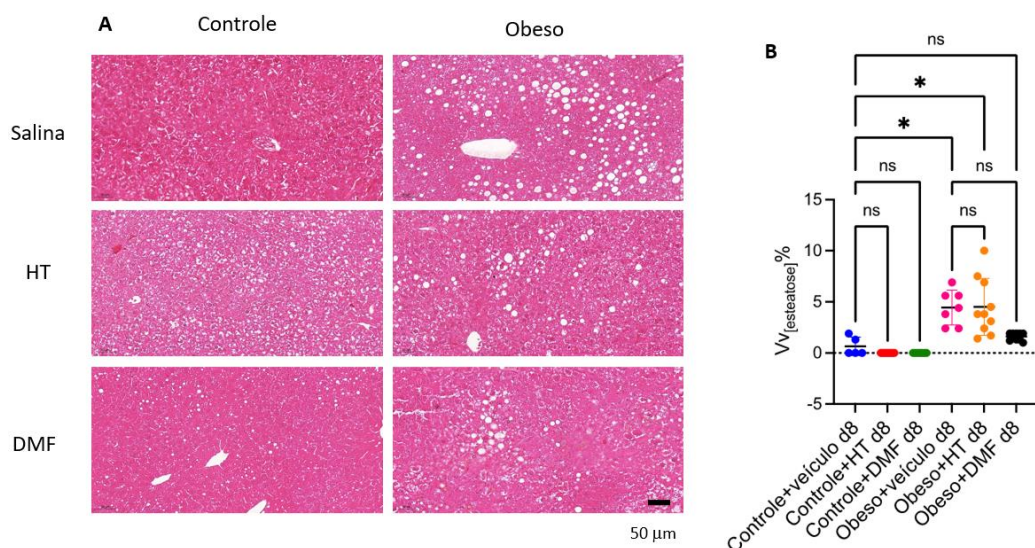
Nota: d: dia, ns: não significativo, HT: hidroxitirosol, DMF: dimetil fumarato.

Fonte: A autora, 2023.

9.7 Análise do desenvolvimento de esteatose hepática

Foi possível observar uma maior quantidade de gotículas lipídicas no citoplasma de hepatócitos no fígado de animais alimentados com uma dieta hiperlipídica quando comparado ao grupo controle+veículo (Figura 7A e B) após 12 semanas de dieta. A administração de HT não alterou o efeito da dieta hiperlipídica na esteatose hepática após 12 semanas de dieta (Figura 7A e B). Não houve diferença significativa no acúmulo de gotículas lipídicas no tecido hepático entre os grupos controle+veículo, obeso+veículo e obeso+DMF após 12 semanas de dieta (Figura 7A e B).

Figura 7 - Desenvolvimento de esteatose hepática



Legenda: A: Imagens representativas do parênquima hepático nos grupos controle e obeso após 12 semanas de dieta (8 dias após a lesão). Coloração de hematoxilina e eosina. Escala = 50 μ m. B: Densidade de volume de gotículas lipídicas no citoplasma de hepatócitos nos grupos controle e obeso expressa em porcentagem (%) após 12 semanas de dieta (8 dias após a lesão). Dados: n= 5 - 10 animais por grupo, os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

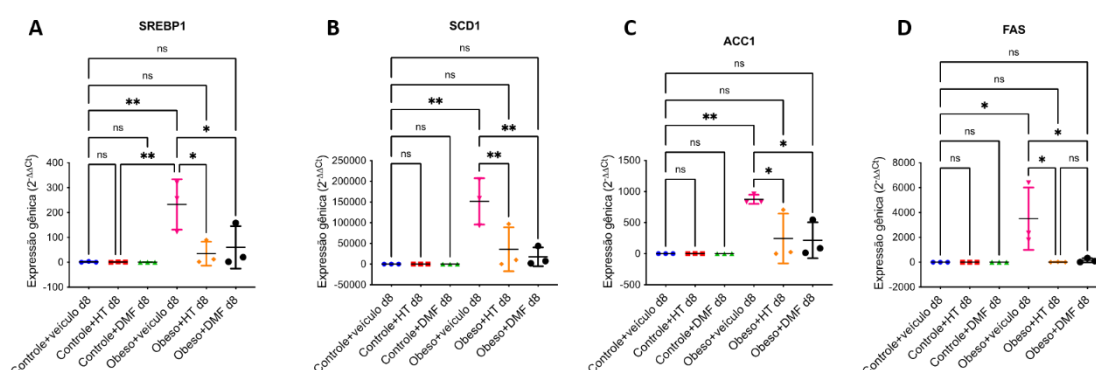
Nota: d: dia, ns: não significativo, Vv: densidade de volume, HT: hidroxitirosol, DMF: dimetil fumarato.

Fonte: A autora, 2023.

9.8 Marcadores da síntese de ácidos graxos

Os níveis de RNAm de SREBP1, SCD1, ACC1 e FAS estavam aumentados no fígado dos animais alimentados com uma dieta hiperlipídica quando comparado ao grupo controle+veículo após 12 semanas de dieta (Figura 8A-D). A administração de HT ou DMF reduziu os níveis de SREBP1, SCD1, ACC1 e FAS no fígado de animais obesos quando comparado aos grupos obeso+veículo e controle+veículo após 12 semanas de dieta (Figura 8A-D).

Figura 8 - Níveis de RNAm de marcadores envolvidos na síntese de ácidos graxos



Legenda: A-D: Níveis de RNAm de sterol regulatory element binding transcription factor 1 (SREBP1), stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1), acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1) e ácido graxo sintase (FAS) no fígado de animais controles e obesos por rRT-PCR após 12 semanas de dieta (8 dias após a lesão). Dados: n= 3 animais por grupo, os resultados foram expressos como média ± desvio padrão, One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

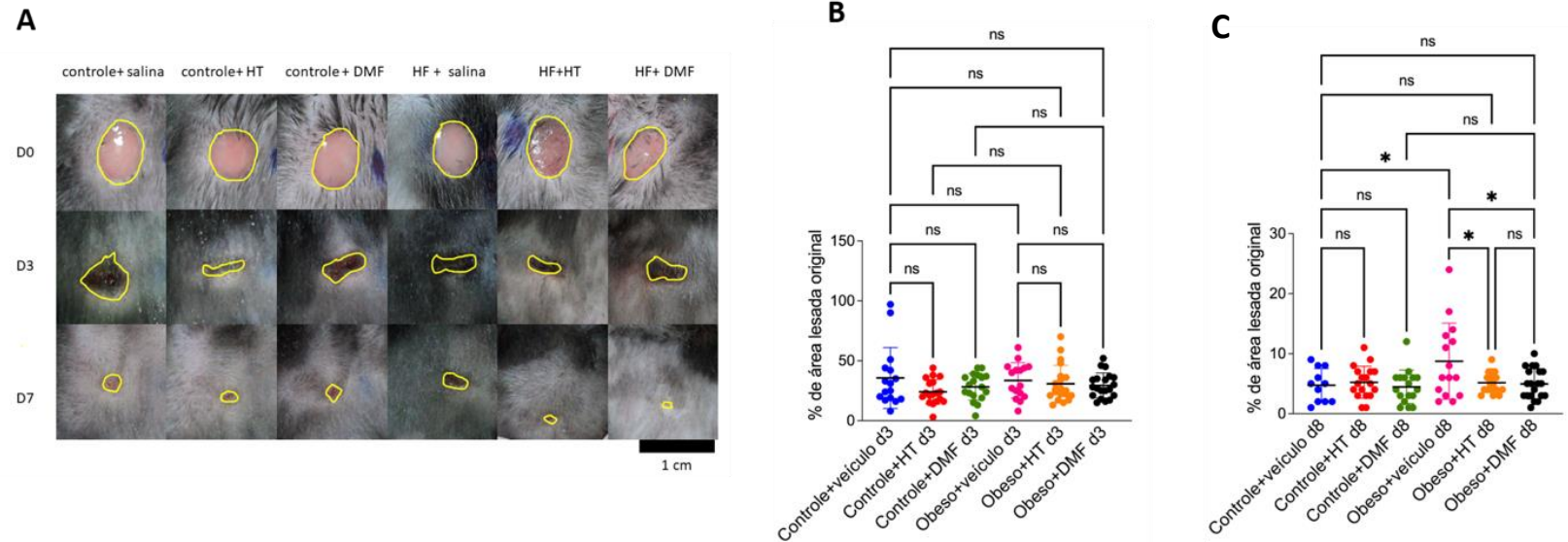
Nota: d: dia, ns: não significativo, HT: hidroxitirosol, DMF: dimetil fumarato.

Fonte: A autora, 2023.

9.9 Avaliação do fechamento das lesões

A administração de uma dieta hiperlipídica comprometeu o fechamento de lesões cutâneas em camundongos quando comparado ao grupo controle+veículo após 8 dias de lesão (Figura 9A-C). A administração de HT ou DMF reverteu o efeito da dieta hiperlipídica sobre o fechamento da lesão quando comparado aos grupos obeso+veículo e controle+veículo após 8 dias de lesão (Figura 9A-C).

Figura 9 - Avaliação do fechamento das lesões



Legenda: A: Imagens representativas das lesões dos animais controles e obesos no dia da realização da lesão (dia 0) e após 3 e 7 dias. Escala = 1 cm. B: Porcentagem de área lesada original após 3 dias de lesão. C: Porcentagem de área lesada original após 8 dias de lesão. Dados: n= 14 – 20 lesões por grupo, os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

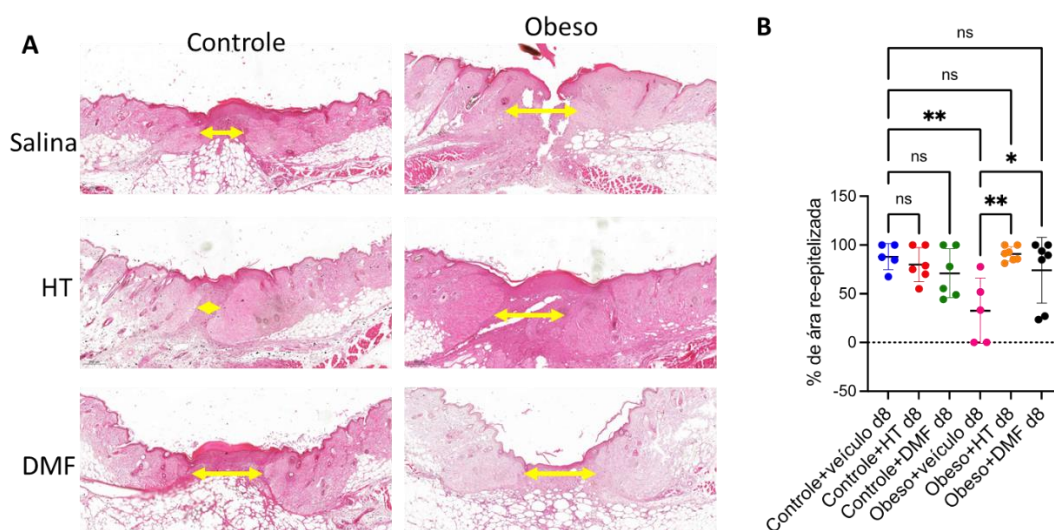
Nota: d ou D: dia, ns: não significativo, HT: hidroxitirosol, DMF: dimetil fumarato.

Fonte: A autora, 2023.

9.10 Avaliação histológica da re-epitalização

A administração de uma dieta hiperlipídica comprometeu a re-epitelização em lesões cutâneas em camundongos quando comparado ao grupo controle+veículo após 8 dias de lesão (Figura 10A-B). A administração de HT ou DMF reverteu o efeito da dieta hiperlipídica sobre a re-epitelização quando comparado aos grupos obeso+veículo e controle+veículo após 8 dias de lesão (Figura 10A-C).

Figura 10 - Avaliação da re-epitelização de lesões



Legenda: A: Imagens representativas da área lesada re-epitelizada nos animais controles e obesos após 8 dias de lesão. Escala = 200 μ m. B: Porcentagem de área lesada re-epitelizada após 8 dias de lesão. Dados: n= 5 – 7 animais por grupo, os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Nota: d: dia, ns: não significativo, HT: hidroxitirosol, DMF: dimetil fumarato.

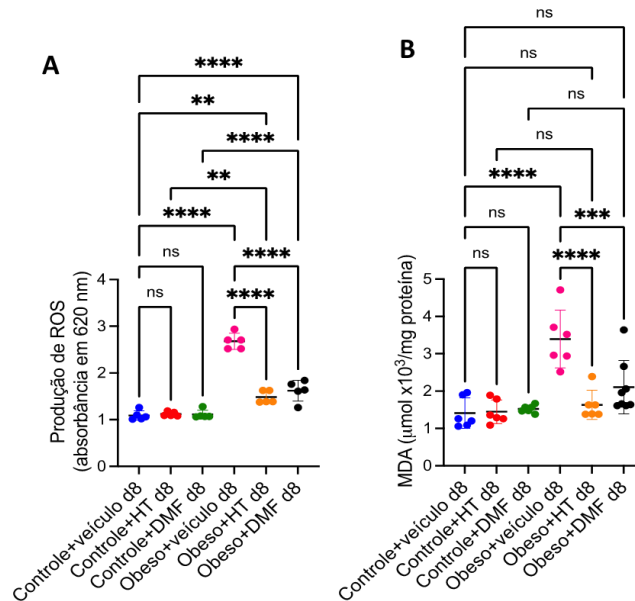
Fonte: A autora, 2023

9.11 Deposição de fibras colágenas

A administração de uma dieta hiperlipídica comprometeu a deposição de fibras colágenas na área lesada de camundongos quando comparado ao grupo controle+veículo após 8 dias de lesão (Figura 11A-B). A administração de HT ou DMF reverteu o efeito da dieta hiperlipídica sobre a deposição de fibras colágenas quando comparado aos grupos

A administração de HT ou DMF reverteu o efeito da dieta hiperlipídica sobre o dano lipídico na área lesada dos animais quando comparado aos grupos controle+veículo e obeso+veículo após 8 dias de lesão (Figura 12B).

Figura 12 – Produção de espécies reativas de oxigênio e dano lipídico



Legenda: A: Produção de espécies reativas de oxigênios (ROS) na área lesada após 8 dias. B: Quantificação de malondialdeído (MDA) para avaliar o dano lipídico na área lesada após 8 dias. Dados: n= 3 - 7 animais por grupo, os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

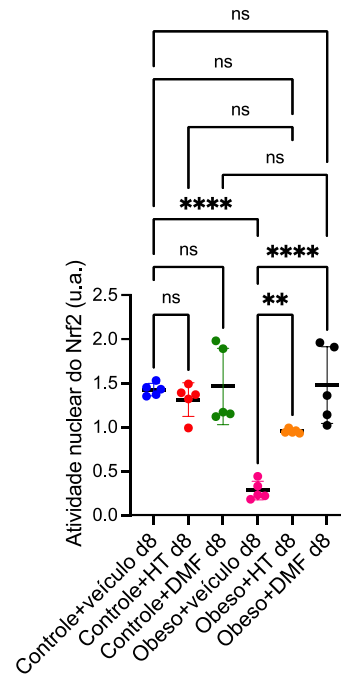
Nota: d: dia, ns: não significativo, HT: hidroxitirosol, DMF: dimetil fumarato.

Fonte: A autora, 2023.

9.13 Ativação da via Nrf2

A administração de uma dieta hiperlipídica reduziu ativação do Nrf2 na lesão de camundongos quando comparado ao grupo controle+veículo após 8 dias de lesão (Figura 13). Contudo, a administração de HT ou DMF promoveu a ativação do Nrf2 na lesão de camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica comparado aos grupos obeso+veículo e controle+veículo após 8 dias de lesão (Figura 13)

Figura 13 – Ativação da via Nrf2



Legenda: A: Ativação do Nrf2 na área lesada nos grupos controle e obeso após 8 dias de lesão. Dados: n= 3 - 7 animais por grupo, os resultados foram expressos como média ± desvio padrão, One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Nota: d: dia, ns: não significativo, HT: hidroxitirosol, DMF: dimetil fumarato.

Fonte: A autora, 2023.

10 DISCUSSÃO

No presente estudo camundongos C57BL/6 foram submetidos a um protocolo de obesidade que consistiu na oferta de uma dieta hiperlipídica. Além disto, parte dos animais alimentados com uma dieta hiperlipídica foram tratados com ativadores da via Nrf2 (HT ou DMF). Após 10 semanas foi observado o desenvolvimento da obesidade. Esse modelo é apropriado para o estudo da obesidade (BARRETT et al., 2016). O camundongo C57Bl/6 é suscetível a dieta hiperlipídica quando comparado com outras linhagens de camundongos geneticamente manipulados e desenvolve características típicas a síndrome metabólica em humanos, como: obesidade, resistência à insulina, intolerância à glicose, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, esteatose hepática não alcoólica e intolerância à glicose (GLASTRAS et al., 2016).

A obesidade está associada ao consumo em excesso de nutrientes com o aumento da massa corporal (PEREZ-CAMPOS MAYORAL et al., 2019). Após 10 semanas da administração de uma dieta hiperlipídica os animais desenvolveram obesidade, resistência a insulina, hiperlipidemia, esteatose hepática não alcoólica e intolerância à glicose.

O tratamento do grupo obeso com HT não causou diminuição na massa corpórea e glicemia. Outros trabalhos apresentaram o mesmo resultado administrando doses de HT mais baixas (5 mg/Kg) (ILLESCA et al. , 2019) ou 10 mg/Kg (WANG et al., 2018). Estudos que conseguiram reverter a massa corporal utilizaram doses mais altas: 20 mg/Kg (POUDYAL, et al. 2017) e 50mg/kg (CAO KEL, et al. 2014). O HT é um fármaco com efeito dose dependente e não tóxico (VELLOTI; BERNINI, 2023), entretanto, no presente estudo a dose de 1 mg/Kg foi escolhida por ser a dose fisiológica recomendada pela *European Food Safety Authority*. Portanto, essa dose menor poderia explicar a não redução da massa corporal com o tempo de administração do HT de apenas 2 semanas, e por consequência, a não redução da gordura epididimária. Entretanto, outros estudos administraram doses por 4 semanas (GONZÁLEZ-SANTIAGO et al, 2004) e 16 semanas (JEMAI et al, 2008) e não foi possível observar alteração na massa corporal no modelo com dieta hiperlipídica. Limitações quanto à forma de administração e posologia dos estudos dificulta as conclusões do HT sobre a massa corporal dos animais. O tecido adiposo branco estoca o excesso de nutrientes nos adipócitos que sofrem hiperplasia (aumento do número de adipócitos) e hipertrofia (aumento do diâmetro dos adipócitos). Os grupos obesos tratados com HT e DMF conseguiram reduzir estatisticamente o diâmetro dos adipócitos. Outros estudos já observaram a redução da hipertrofia pelo HT

(STEFANON; COLITTI, 2016), (DRIRA et al., 2011). A hipertrofia dos adipócitos está associada com estresse mitocondrial, redução de adenosina trifosfato (ATP) e diminuição da expressão de subunidades do complexo mitocondrial (PEYROL et al., 2017). O HT promove biogênese mitocondrial via ativação do receptor PGC-1 α (SCODITTI et al., 2019), principal regulador da fosforilação oxidativa e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (RIUS-PÉREZ et al., 2020). Além disso, causa o aumento da lipólise e bloqueio de genes que regulam a via da adipogênese, incluindo o SREBP1 (STEFANON; COLITTI, 2016). No presente estudo, o grupo HT reduziu a expressão do SREBP1 e os níveis de triglicerídeos, isso indica que a lipólise no tecido adiposo e a liberação de triglicerídeos na circulação sanguínea foi diminuída pelo HT.

A esteatose hepática não alcoólica é definida como um acúmulo excessivo de triglicerídeos nos hepatócitos. Na obesidade, esse acúmulo leva a respostas inflamatórias, estresse do retículo endoplasmático hepático, apoptose celular e fibrose (WANG et al., 2018) (ECHEVERRÍA et al., 2018). O SREBP1 é conhecido por estar envolvido na síntese de colesterol e ácidos graxos. No animal obeso, com o estímulo lipogênico, o SREBP1c é translocado para o núcleo e ativa genes alvo como FAS, ACC1 e SCD1 (CAO KEL, et al. 2014). Esses marcadores regulam a síntese de ácidos graxos no fígado e sua expressão aumenta na obesidade, auxiliando no acúmulo de gordura hepática. O HT regula negativamente a ativação desses genes (WANG et al., 2018) (PRIORE, SICULELLA, GNONI, 2018). O grupo obeso+HT reduziu significativamente a expressão do SREBP1 e de seus alvos, causando a redução significativa dos níveis de triglicerídeos, HDL colesterol e colesterol total. Esperava-se uma redução da esteatose como consequência do tratamento, porém o grupo HT e DMF não reverteram a esteatose hepática. Esse resultado é conflitante com outros trabalhos que conseguiram reverter a esteatose (WANG et al., 2018) (ECHEVERRÍA et al., 2018) (HERNÁNDEZ-RODAS et al., 2017), entretanto, todos utilizavam uma posologia maior de HT e o utilizavam apenas como suplemento e não como tratamento.

O DMF é um terapêutico aprovado pelo FDA para o tratamento de esclerose múltipla (ROSITO M., et al. 2020). Ele também é um ativador da via Nrf2. A ativação dessa via pode inibir a lipogênese. O estudo de Meakin et al, observou que camundongos bloqueados para a via do Nrf2 apresentaram níveis aumentados da expressão de genes reguladores da síntese de triglicerídeos ACC, FAS e SREBP1 (MEAKIN, et al. 2014). No presente estudo, o grupo tratado com DMF reduziu significativamente a expressão destes genes. Isso explica a redução de colesterol e HDL pelo grupo tratado, gerando perda de peso, redução da gordura epididimária e redução do tecido adiposo conforme apresentado. Outros estudos (VANANI, A.R. et al, 2021)

também observaram a redução da expressão do SREBP1 com doses maiores de DMF (30 mg/kg e 100 mg/kg) entretanto, a mesma dose utilizada no presente trabalho (10 mg/kg) não reduziu a expressão.

A resistência à insulina é uma consequência da obesidade. Ela reduz a lipólise e dificulta a saída de ácidos graxos dos adipócitos, dificultando a perda de massa e redução de triglicerídios (SMITH et al., 2016). É sugerido que a produção excessiva de ROS e fatores pró inflamatórios na obesidade esteja associado à resistência a insulina. O excesso de células inflamatórias no tecido adiposo leva ao aumento de citocinas pró-inflamatórias que ativam a via do NF- κ B no tecido adiposo e fígado (SHIRI, 2020). A proteína IRS1 atua como um intermediário entre o receptor de insulina e a ativação de vias intracelulares que controlam a absorção da glicose. Sua superfosforilação é um marcador para a resistência a insulina (WANG et al, 2018). A ativação da via pró-inflamatória do NF- κ B causa a fosforilação da IRS1 que bloqueia a sinalização da insulina e, consequentemente, causa a sua resistência (SHIRI, 2020). O HT reverteu, no grupo obeso, a resistência à insulina, avaliada através do teste oral de tolerância à glicose e os níveis de insulina. O HT é um ativador da via antioxidante do Nrf2. Estudos observaram que a ativação da via do Nrf2 em adipócitos diminuiu a resistência a insulina com a ativação de genes antioxidantes e redução de ROS celular (XUE et al., 2013).

O grupo obeso tratado com DMF conseguiu melhorar os níveis de glicemia em jejum e insulina. Embora o tratamento tenha melhorado a captação de glicose pelas células, não conseguiu reverter totalmente, visto que os camundongos continuaram resistentes à insulina. Isto explica a não reverção significativa das áreas de esteatose hepática. Em condições normais, após o consumo de alimentos, o nível de insulina aumenta promovendo glicogênese e inibindo a lipólise (KITADE H., et al, 2017). A resistência a insulina promove uma constante lipogênese e, consequentemente um aumento na inibição da lipólise. Isto causa um contínuo acúmulo excessivo de triglicerídeos levando ao estresse do retículo endoplasmático e deposição de gordura em locais ectópicos como o fígado (KITADE H., et al, 2017). Esse mecanismo é confirmado pela não redução dos níveis de triglicerídeos pelo grupo DMF e consequente não redução significativa da esteatose hepática no presente estudo. Outros estudos conseguiram reduzir a resistência a insulina pelo tratamento com DMF (MIN L. et al., 2019) e reverter o estado de esteatose hepática (VANANI A.R, et al., 2021) Entretanto, foram utilizadas doses maiores (15 mg/kg, 30 mg/kg ou 100 mg/kg) e administradas por maior período de tempo (2 semanas).

A obesidade é uma condição crônica que aumenta demasiadamente a fase inflamatória do reparo tecidual, aumentando o tempo de cicatrização. No presente estudo, o grupo obeso+veículo, após 3 dias da lesão, ainda possuía uma área lesionada maior do que o grupo controle+veículo. Isso pode ser explicado pelo excesso de citocinas pró-inflamatórias como $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 que impedem a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos impedindo o fechamento da lesão (NASCIMENTO, COSTA, 2006). Além disso, a obesidade está frequentemente ligada a resistência a insulina. Essa condição reduz a mobilidade celular e diferenciação de fibroblastos (DANG, 2017), prolongando ainda mais o reparo tecidual. Já no grupo obeso tratado com HT ou DMF foi possível observar uma diminuição da área lesionada após 8 dias. Na obesidade, o contínuo estresse do retículo endoplasmático gera ROS. Tanto o HT quando o DMF são ativadores da via Nrf2. Esse fator de transcrição, quando translocado para o núcleo, promove a síntese de enzimas antioxidantes como NQO1, HO-1, SOD, CAT e GPx (JASOLIYA et al., 2019). O fechamento das lesões após 8 dias pode ser explicado pela ativação dessa via e, consequentemente, redução de ROS e danos oxidativos em lipídios e proteínas. Isso permitiu que houvesse na fase reparadora, maior deposição de fibras colágenas no grupos obesos tratados com HT e DMF.

Em condições normais, a sinalização antioxidante é ativada em resposta ao ROS permitindo controle da inflamação, eliminação do dano oxidativo e fechamento da lesão (YING L. et al, 2018). Entretanto, na obesidade, há uma alta produção de ROS produzindo níveis excessivos de radicais livres (SANCHEZ F. A. et.al, 2011) que excedem a capacidade de sua eliminação pelo Nrf2. Este efeito leva ao atraso da cicatrização (YIN L. et al, 2018). O tratamento com DMF ativou a via e foi capaz de reduzir as espécies reativas de oxigênio significativamente, assim como o dano lipídico. Com a redução de danos ao tecido, houve uma melhora na regeneração tecidual confirmada pelo aumento de deposição de fibras colágenas e síntese de hidroxiprolina. Outros estudos observaram a melhora do reparo tecidual pelo tratamento com DMF como ativador da via do Nrf2 em camundongos diabéticos (MIN L. et al., 2019) (YING L. et al, 2018)

Já foi demonstrado que o excesso das ROS em indivíduos obesos estimula a proliferação de pré-adipócitos, diferenciação de adipócitos e o aumento de adipócitos maduros (SHIRI et al, 2020). Isto contribui para o prolongamento da obesidade. No presente estudo, a redução de ROS nos grupos obeso+HT via ativação do Nrf2 explica a redução na hipertrofia dos adipócitos. Como o tratamento com HT é dose dependente, uma dose maior do composto poderia também reduzir a massa da gordura epididimária (gordura visceral) e, consequentemente, a massa total dos animais.

A principal diferença entre o presente estudo e outros trabalhos que observaram melhora nos parâmetros da obesidade é a dose administrada. Os trabalhos utilizam uma dose muito maior do que a recomendada pela *European Food Safety Authority* para humanos (JALOYA et al, 2019), como 1 mg por dia (WANG et al, 2018; POUDYAL, et al. 2017). No presente estudo, o tratamento durante 1 semana foi necessário para observar o fechamento da lesão e conseguir realizar a coleta do material. Essa dose e o período de tempo de administração foi suficiente para acelerar a cicatrização, mas não para reverter alguns parâmetros da obesidade como esteatose hepática e massa corporal. Entretanto, foi possível verificar melhora na hipertrofia dos adipócitos e expressão gênica da síntese de triglicerídeos.

CONCLUSÃO

Os ativadores da via do Nrf2 (HT e DMF) conseguiram ativar a via antioxidante e reduzir a quantidade de ROS na área lesionada. Além disso, acelerou o reparo tecidual em camundongos obesos diminuindo a área lesionada após 8 dias, aumentando a área re-epitelizada e deposição de fibras colágenas.

Apenas o HT também conseguiu reduzir os níveis de triglicerídios, HDL colesterol e colesterol em camundongos obesos indicada pela redução dos níveis de expressão dos genes SREBP1, SCD1, ACC1 e FAS. Portanto, foi possível reverter a hipertrigliceridemia característica da obesidade.

Por outro lado, os ativadores não reverteram indicadores obesogênicos como aumento da massa corporal, resistência à insulina, esteatose hepática e aumento de tecido adiposo branco. Isso indica que o tratamento com HT e DMF foi capaz de melhorar a cicatrização de lesões cutâneas em camundongos obesos e atenuou os principais parâmetros relacionados à obesidade.

REFERÊNCIAS

- A EMING, Sabine; KRIEG, Thomas; M DAVIDSON, Jeffrey. Inflammation in wound repair molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*, [s. l.], v. 127, ed. 3, 2007. DOI 10.1038/sj.jid.5700701. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17299434/>. Acesso em: 7 jul. 2023.
- AHIMA, Rexford S.; LAZAR, Mitchell A. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Mol Endocrinol* 22: Mol Endocrinol. , [s. l.], v. 22, ed. 5, p. 1023–1031, 2008. DOI 10.1210/me.2007-0529. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2366188/>. Acesso em: 8 jul. 2023.
- AHMED, Bulbul; SULTANA, Rifat; W. GREENE, Michael. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomed Pharmacother*, [s. l.], 2021. DOI 10.1016/j.biopha.2021.111315. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33561645/>. Acesso em: 8 jul. 2023.
- ALHUSAINI, Saif *et al.* Lipopolysaccharide, high glucose and saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress in cultured primary human adipocytes: Salicylate alleviates this stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [s. l.], p. 472-478, 2012. DOI <https://doi.org/10.1038/srep00799>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X10010685>. Acesso em: 8 jul. 2023.
- AMADEU, Thaís P.; COSTA, Andréa M. A. Nitric oxide synthesis inhibition alters rat cutaneous wound healing Nitric oxide synthesis inhibition alters rat cutaneous wound healing. *J Cutan Pathol*, [s. l.], p. 465-73, 2006. DOI 10.1111/j.1600-0560.2006.00472.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16872468/>. Acesso em: 15 ago. 2023.
- AVOLA, R *et al.* Hydroxytyrosol from olive fruits prevents blue-light-induced damage in human keratinocytes and fibroblasts. *Journal Cell Physiol*, [s. l.], v. 234, ed. 6, 2019. DOI 10.1002/jcp.27584. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30367495/>. Acesso em: 11 maio 2023.
- BARRETT, Perry *et al.* Preclinical models for obesity resea. *Dis Model Mech*, [s. l.], v. 9, ed. 11, 2016. DOI <https://doi.org/10.1242/dmm.026443>. Disponível em: <https://journals.biologists.com/dmm/article/9/11/1245/20120/Preclinical-models-for-obesity-research>. Acesso em: 7 jul. 2023.
- BARROSO, Marina Valente *et al.* Propolis reversed cigarette smoke-induced emphysema through macrophage alternative activation independent of Nrf2. *Bioorg Med Chem.*, [s. l.], p. 5557-5568, 2017. DOI 10.1016/j.bmc.2017.08.026. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28886998/>. Acesso em: 10 set. 2023.
- BLAIR, HA. Dimethyl Fumarate: A Review in Moderate to Severe Plaque Psoriasis. *Drugs*, [s. l.], v. 78, ed. 1, 2018. DOI 10.1007/s40265-017-0854-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29236231/>. Acesso em: 3 jul. 2023.
- BUENDIA, Izaskun *et al.* Nrf2–ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative disease. *Pharmacology & Therapeutics*, [s. l.], p. 84-104, 2016. DOI <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.11.003>. Disponível

em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0163725815002168?via%3Dihub>. Acesso em: 7 jul. 2023.

- CABALLERO, Benjamin. Humans against Obesity: Who Will Win?. *Adv Nutr.*, [s. l.], 2019. DOI 10.1093/advances/nmy055. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30721956/>. Acesso em: 17 set. 2023.
- CAO, Ke *et al.* Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radic Biol Med.*, [s. l.], 2014. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.029. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24316371/>. Acesso em: 15 set. 2023.
- CHOI, Hyung Sim *et al.* A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J. Immunoassay Immunochem.*, [s. l.], p. 31-44, 2006. DOI <https://doi.org/10.1080/15321810500403722>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15321810500403722?journalCode=ljii20>. Acesso em: 10 set. 2023.
- CHURCH, TS *et al.* Trends over 5 decades in U.S. occupation-related physical activity and their associations with obesity. *PLoS One*, [s. l.], v. 6, ed. 5, 2011. DOI 10.1371/journal.pone.0019657. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.20394#bib12>. Acesso em: 7 jul. 2023.
- COPPACK SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc*, v. 60, ed. 3, p. 349–356, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11681809/#:~:text=Cytokines%20appear%20to%20be%20major,preadipocyte%20and%20other%20cell%20types>.
- CORRÊA ROSA, SIMONE. Perfil antropométrico e clínico de pacientes pós-bariátricos submetidos a procedimentos em cirurgia plástica. *Rev. Col. Bras. Cir.*, [s. l.], v. 45, ed. 2, p. 1453- 1456, 2018. DOI 10.1590/0100-6991e-20181613. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rcbc/a/X3sVghNHRsFHXXzqXK6JKRK/?lang=pt>. Acesso em: 7 jul. 2023.
- D'ALESSANDRO, María Eugenia *et al.* Time course of adipose tissue dysfunction associated with antioxidant defense, inflammatory cytokines and oxidative stress in dyslipemic insulin resistant rats. *Food Funct*, [s. l.], v. 6, ed. 4, p. 1299-309, 2015. DOI 10.1039/c4fo00903g. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25765549/>. Acesso em: 7 jul. 2023.
- DANG, Loan Thi-Tung; PHAN, Ngoc Kim; TRUONG, Kiet Dinh. Mesenchymal stem cells for diabetes mellitus treatment: new advances. *Biomedical Research and Therapy*, v. 4, n. 1, p. 1062-1081, 2017.
- DEHGHAN, Mahshid; AKHTAR-DANESH, Noori; MERCHANT, Anwar T. Childhood obesity, prevalence and prevention. *Nutr J.*, [s. l.], 2005. DOI 10.1186/1475-2891-4-24. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16138930/>. Acesso em: 15 ago. 2023.
- DONATO-TRANCOSO, Aline *et al.* Dual effects of extra virgin olive oil in acute wounds. *Wound Repair Regen.*, [s. l.], p. 338-348, 17 set. 2023. DOI 10.1111/wrr.13082. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/wrr.13082?af=R>. Acesso em: 17 set. 2023.

- DRAPER, H H; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, [s. l.], p. 421-31, 1990. DOI 10.1016/0076-6879(90)86135-i. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2233309/>. Acesso em: 15 ago. 2023.
- DRIRA, Riadh *et al.* Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3 T3-L1 cells. *Life Sci.*, [s. l.], 2011. DOI 10.1016/j.lfs.2011.08.012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21945192/>. Acesso em: 15 set. 2023.
- ECHEVERRÍA, Francisca *et al.* SettingsOrder Article Reprints Open AccessReview Hydroxytyrosol and Cytoprotection: A Projection for Clinical Interventions. *Int. J. Mol. Sci.*, [s. l.], v. 18, ed. 5, 2017. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms18050930>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/5/930>. Acesso em: 7 jul. 2023.
- EMING, Sabine A; KRIEG, Thomas; DAVIDSON, Jeffrey M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.*, [s. l.], p. 514-25, 2007. DOI 10.1038/sj.jid.5700701. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17299434/>. Acesso em: 15 ago. 2023.
- ECHEVERRÍA, Francisca *et al.* Attenuation of High-Fat Diet-Induced Rat Liver Oxidative Stress and Steatosis by Combined Hydroxytyrosol- (HT-) Eicosapentaenoic Acid Supplementation Mainly Relies on HT. *Oxid Med Cell Longev.*, [s. l.], 2018. DOI 10.1155/2018/5109503. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6051008/>. Acesso em: 16 set. 2023.
- GLASTRAS, Sarah J. *et al.* Mouse Models of Diabetes, Obesity and Related Kidney Disease. *PLOS ONE*, [s. l.], 2016. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162131>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27579698/>. Acesso em: 7 jul. 2023.
- GONZÁLEZ - SANTIAGO, M *et al.* One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis*, [s. l.], v. 188, ed. 1, p. 35-42, 2006. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2005.10.022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16300770/>. Acesso em: 15 fev. 2023.
- GURTNER, G *et al.* Wound repair and regeneration. *Nature*, [s. l.], p. 314–321, 2008. DOI 10.1038/nature07039. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature07039>. Acesso em: 7 jul. 2023.
- HAMMAN, RF *et al.* Effect of weight loss with lifestyle intervention on risk of diabetes. *Diabetes Care*, [s. l.], v. 29, p. 2102- 2107, 2006. DOI 10.2337/dc06-0560. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16936160/>. Acesso em: 3 jul. 2023.
- HERNÁNDEZ-RODAS, María C *et al.* Supplementation with Docosahexaenoic Acid and Extra Virgin Olive Oil Prevents Liver Steatosis Induced by a High-Fat Diet in Mice through PPAR- α and Nrf2 Upregulation with Concomitant SREBP-1c and NF-kB Downregulation. *Mol Nutr Food Res.*, [s. l.], 2017. DOI 10.1002/mnfr.201700479. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28940752/>. Acesso em: 16 set. 2023.
- HIEBERT, Paul *et al.* Nrf2-Mediated Fibroblast Reprogramming Drives Cellular Senescence by Targeting the Matrisome. *Dev Cell.*, [s. l.], p. 145-161, 2018. DOI 10.1016/j.devcel.2018.06.012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30016619/>. Acesso em: 15 ago. 2023
- ILLESCA, P *et al.* Hydroxytyrosol supplementation ameliorates the metabolic disturbances in white adipose tissue from mice fed a high-fat diet through recovery of transcription

- factors Nrf2, SREBP-1c, PPAR-gamma and NF-kappaB. *Biomed Pharmacother*, [s. l.], 2019. DOI 109:2472-81. Disponível em: pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30551508/. Acesso em: 11 maio 2023.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa nacional de saúde: 2019: percepção do estado de saúde, estilos de vida, doenças crônicas e saúde bucal: Brasil e grandes regiões. IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE; 2020
- JASOLIYA , M *et al.* Dimethyl fumarate dosing in humans increases frataxin expression: Dimethyl fumarate dosing in humans increases frataxin expression. *PLoS One*, [s. l.], v. 14, ed. 6, 2019. DOI 10.1371/journal.pone.0217776. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31158268/>. Acesso em: 3 jul. 2023.
- JEMAI, Hedyia *et al.* Lipid-Lowering and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Its Triacetylated Derivative Recovered from Olive Tree Leaves in Cholesterol-Fed Rats. *J. Agric. Food Chem*, [s. l.], v. 56, p. 2630-2636, 2008. DOI 10.1021/jf072589s. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18380465/>. Acesso em: 15 fev. 2023.
- KAWASAKI, Noritaka *et al.* Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Nature*, [s. l.], 2012. DOI <https://doi.org/10.1038/srep00799>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33561645/>. Acesso em: 8 jul. 2023.
- KITADE, Hironori *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments. *Nutrients*, [s. l.], 2017. DOI 10.3390/nu9040387. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5409726/>. Acesso em: 15 ago. 2023.
- LEBLANC, Erin S *et al.* Effectiveness of primary care-relevant treatments for obesity in adults: a systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*, [s. l.], v. 155, ed. 7, 2011. DOI 10.7326/0003-4819-155-7-201110040-00006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21969342/>. Acesso em: 7 jul. 2023.
- LI, Min *et al.* Nrf2 Suppression Delays Diabetic Wound Healing Through Sustained Oxidative Stress and Inflammation. *Front Pharmacol.*, [s. l.], 2019. DOI 10.3389/fphar.2019.01099. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6763603/>. Acesso em: 15 ago. 2023.
- LI, Ying *et al.* Dimethyl fumarate accelerates wound healing under diabetic conditions. *Journal of Molecular Endocrinology*, [s. l.], v. 61, ed. 4, p. 163-172, 2018. DOI <https://doi.org/10.1530/JME-18-0102>. Disponível em: <https://jme.bioscientifica.com/view/journals/jme/61/4/JME-18-0102.xml>. Acesso em: 7 jul. 2023.
- LIFSHITZ, F; LIFSHITZ, JZ. Globesity: the root causes of the obesity epidemic in the USA and now worldwide. *Pediatr Endocrinol Rev.*, [s. l.], v. 12, ed. 1, p. 17-34, 2014
- MEAKIN, P.J. *et al.* Susceptibility of Nrf2-null mice to steatohepatitis and cirrhosis upon consumption of a high-fat diet is associated with oxidative stress, perturbation of the unfolded protein response, and disturbance in the expression of metabolic enzymes but not with insulin resistance. *Mol. Cell. Biol.*, [s. l.], p. 3305–3320, 2014. DOI 10.1128/MCB.00677-14. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24958099/>. Acesso em: 15 ago. 2023.
- MORETTI, Leandro *et al.* The interplay of fibroblasts, the extracellular matrix, and inflammation in scar formation. *J Biol Chem.*, [s. l.], 2022. DOI

- 10.1016/j.jbc.2021.101530. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8784641/>. Acesso em: 17 set. 2023.
- NASCIMENTO , AP *et al.* Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. *Br J Nutr*, [s. l.], v. 96, ed. 6, 2006. DOI 10.1017/bjn20061955. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17181882/>. Acesso em: 11 maio 2023.
- OTRANTO , M *et al.* Insulin resistance impairs cutaneous wound healing in mice. *Wound Repair Regen.*, [s. l.], v. 21, ed. 3, 2013. DOI 10.1111/wrr.12042. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23627416/>. Acesso em: 11 maio 2023.
- PAULINO DO NASCIMENTO , A *et al.* Both obesity-prone and obesity-resistant rats present delayed cutaneous wound healing. *Br J Nutr*, [s. l.], v. 106, ed. 4, 2011. DOI 10.1017/S0007114511000468. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21806853/>. Acesso em: 11 maio 2023.
- PENG , S *et al.* Dual protection of hydroxytyrosol, an olive oil polyphenol, against oxidative damage in PC12 cells. *Food & Function.*, [s. l.], v. 6, ed. 6, 2015. DOI 10.1039/C5FO00097A. Disponível em:
pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/fo/c5fo00097a. Acesso em: 11 maio 2023
- PEREZ-CAMPOS MAYORAL, Laura *et al.* Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *Indian J Med Res.*, [s. l.], v. 151, ed. 1, 2019. DOI 10.4103/ijmr.IJMR_1768_17. Disponível em:
www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7055173/. Acesso em: 3 jul. 2023.
- PEYROL, Julien *et al.* Hydroxytyrosol in the Prevention of the Metabolic Syndrome and Related Disorders. *Nutrients.*, [s. l.], 2017. DOI 10.3390/nu9030306. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5372969/>. Acesso em: 15 set. 2023.
- PICHÉ, Marie-Eve; TCHERNOF, André; DESPRÉS, Jean-Pierre. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circ Res.*, [s. l.], p. 1477-1500, 2020. DOI 10.1161/CIRCRESAHA.120.316101. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32437302/>. Acesso em: 17 set. 2023.
- POUDYAL, Hemant *et al.* Hydroxytyrosol ameliorates metabolic, cardiovascular and liver changes in a rat model of diet-induced metabolic syndrome: pharmacological and metabolism-based investigation. *Pharmacological Research*, [s. l.], v. 117, p. 32-45, 2017. DOI 10.1016/j.phrs.2016.12.002. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27940206/>. Acesso em: 15 fev. 2023.
- PRIORE, Paola; SICULELLA, Luisa; GNONI , Gabriele Vincenzo. Extra virgin olive oil phenols down-regulate lipid synthesis in primary-cultured rat-hepatocytes. *J Nutr Biochem.*, [s. l.], 2018. DOI 10.1016/j.jnutbio.2014.01.009. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24742469/>. Acesso em: 7 jul. 2023.
- REEVES, P G; NIELSEN, F H; FAHEY JR, G C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN76A rodent die. *J Nutr.*, [s. l.], p. 1939–1951, 1993. DOI 10.1016/0076-6879(90)86135-i. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8229312/>. Acesso em: 10 set. 2023.
- RIBEIRO, Bianca C de S *et al.* Olive oil promotes the survival and migration of dermal fibroblasts through Nrf2 pathway activation. *Lipids.*, [s. l.], 2023. DOI 10.1002/lipd.12363. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36289559/>. Acesso em: 15 ago. 2023.

- RIUS-PÉREZ, Sergio *et al.* PGC-1 α , Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism. *Oxid Med Cell Longev* ., [s. l.], 2020. DOI 10.1155/2020/1452696. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32215168/>. Acesso em: 15 set. 2023.
- ROSA , DF *et al.* High-Fat Diet and Alcohol Intake Promotes Inflammation and Impairs Skin Wound Healing in Wistar Rats. *Mediators Inflamm*, [s. l.], 2018.
- ROSITO, Maria *et al.* Exploring the Use of Dimethyl Fumarate as Microglia Modulator for Neurodegenerative Diseases Treatment. *Antioxidants (Basel)*., [s. l.], 2020. DOI 10.3390/antiox9080700. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17299434/>. Acesso em: 15 ago. 2023.
- SAGUIE, Bianca O *et al.* Exercise prior to, but not concomitant with, stress reverses stress-induced delayed skin wound healing. *Wound Repair Regen.*, [s. l.], v. 25, ed. 4, 2017. DOI 10.1111/wrr.12556. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28628259/>. Acesso em: 10 set. 2023.
- SÁNCHEZ, Alba Fernández *et al.* Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *Int J Mol Sci.*, [s. l.], p. 3117–3132., 2011. DOI 10.3390/ijms12053117. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3116179/>. Acesso em: 15 ago. 2023.
- SCODITTI, Egeria *et al.* Hydroxytyrosol Modulates Adipocyte Gene and miRNA Expression Under Inflammatory Condition. *Nutrients* ., [s. l.], 2019. DOI 10.3390/nu11102493. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6836288/>. Acesso em: 15 set. 2023.
- SHIRI , Li *et al.* The Role of the Nrf2 Signaling in Obesity and Insulin Resistance. *Int J Mol Sci.*, [s. l.], v. 21, ed. 18, 2020. DOI 10.3390/ijms21186973. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7555440/>. Acesso em: 19 jun. 2023.
- SMITH, U *et al.* Adipose tissue regulates insulin sensitivity: Role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. *J. Intern. Med*, [s. l.], p. 465–475, 2016. DOI 10.1111/joim.12540. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/joim.12540>. Acesso em: 16 set. 2023.
- STEFANON, Bruno; COLITTI , Monica. Hydroxytyrosol, an ingredient of olive oil, reduces triglyceride accumulation and promotes lipolysis in human primary visceral adipocytes during differentiation. *Exp Biol Med (Maywood)*, [s. l.], 2016. DOI 10.1177/1535370216654226. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27287014/>. Acesso em: 15 set. 2023.
- SWINBURN , B; SACKS , G; RAVUSSIN , E. Increased food energy supply is more than sufficient to explain the US epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*, [s. l.], p. 1453- 1456, 2009. DOI 10.1371/journal.pone.0019657. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002916523265673?pes=vor>. Acesso em: 7 jul. 2023.
- TALBOTT, Heather E. *et al.* Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis. *Cell Stem Cell* ., [s. l.], n. 8, ed. 29, p. 1161-1180, 2022. DOI 10.1016/j.stem.2022.07.006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9357250/>. Acesso em: 17 set. 2023.
- TOMASEK, James *et al.* Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* , [s. l.], v. 3, ed. 5, 2002. DOI 10.1038/nrm809. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11988769/>. Acesso em: 7 jul. 2023.

- TREBAU, A; CHAN, E.K.; MIDWOOD, K.S. Regulation of fibroblast migration by tenascin-C. *Biochemical Society*, [s. l.], v. 35, ed. 4, p. 695-697, 2007. DOI 10.1042/BST0350695. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17635125/>. Acesso em: 7 jul. 2023.
- UNAMUNO, Xabier *et al.* Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *European Journal of Clinical Investigation*, [s. l.], v. 48, ed. 9, 2018. DOI 10.1111/eci.12997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29995306/>. Acesso em: 8 jul. 2023.
- VANANI, Atefeh Raesi *et al.* Dimethyl fumarate reduces oxidative stress, inflammation and fat deposition by modulation of Nrf2, SREBP-1c and NF- κ B signaling in HFD fed mice. *Life Sci.*, [s. l.], 2021. DOI 10.1016/j.lfs.2021.119852. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34332979/>. Acesso em: 15 ago. 2023.
- VELLOTI, Francesca; BERNINI, Roberta. Hydroxytyrosol Interference with Inflammaging via Modulation of Inflammation and Autophagy. *Nutrients*, [s. l.], v. 15, ed. 7, 2023. DOI 10.3390/nu15071774. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10096543/>. Acesso em: 15 set. 2023.
- VELNAR, Tomaz; BAILEY, T; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*, [s. l.], p. 1528-42, 2009. DOI 10.1177/147323000903700531. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19930861/>. Acesso em: 15 ago. 2023.
- WANG, Ningning *et al.* Hydroxytyrosol ameliorates insulin resistance by modulating endoplasmic reticulum stress and prevents hepatic steatosis in diet-induced obesity mice. *Free Radic Biol Med*, [s. l.], 2018. DOI 10.1016/j.jnutbio.2018.03.018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29747118/>. Acesso em: 7 jul. 2023.
- WILKINSON, Holly N.; HARDMAN, Matthew J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol.*, [s. l.], v. 10, ed. 9, 2020. DOI 10.1098/rsob.200223. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7536089/>. Acesso em: 17 set. 2023.
- WITTE, M; BARBUL, A. General principles of wound healing. *Surg Clin*, [s. l.], v. 77, p. 509-528, 1997.
- WOESSNER, J.F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys*, [s. l.], v. 93, p. 440-447, 1961. DOI 10.1016/0003-9861(61)90291-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13786180/>. Acesso em: 9 set. 2023.
- WORLD OBESITY FEDERATION, 2023. (i) World Obesity Atlas 2023. <https://www.worldobesity.org/resources/resource-library/world-obesity-atlas-2023>
- XUE, P *et al.* Adipose deficiency of Nrf2 in ob/ob mice results in severe metabolic syndrome. *Diabetes*, [s. l.], 2013. DOI 10.2337/db12-0584. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23238296/>. Acesso em: 16 set. 2023.
- YAN, Nao *et al.* Dimethyl fumarate improves cognitive deficits in chronic cerebral hypoperfusion rats by alleviating inflammation, oxidative stress, and ferroptosis via NRF2/ARE/NF- κ B signal pathway. *International Immunopharmacology*, [s. l.], 2021. DOI 10.1016/j.intimp.2021.107844. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34153667/>. Acesso em: 7 jul. 2023.

YIN, F C *et al.* Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. Am J Physiol, [s. l.], v. 6, ed. 246, 1982. DOI 10.1152/ajpheart.1982.243.6.H941. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6216817/>. Acesso em: 9 set. 2023.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética


**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**EFEITO DE DIFERENTES DIETAS NO PROCESSO DE REPARO CUTÂNEO E NA PELE**", registrada com o nº 012/2020, sob a responsabilidade de **Bruna Romana de Souza** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 01/12/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/12/2024
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	96
Peso/Idade	20 gramas / 8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 01 de Dezembro de 2020.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ