

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUIZA MARTINS LONGARETTI

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MELATONINA SOBRE
PARÂMETROS GENOTÓXICOS, BIOQUÍMICOS E INFLAMATÓRIOS
EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA CAFETERIA**

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2021

LUIZA MARTINS LONGARETTI

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MELATONINA SOBRE
PARÂMETROS GENOTÓXICOS, BIOQUÍMICOS E INFLAMATÓRIOS
EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA CAFETERIA**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profª Drª Vanessa Moraes de Andrade.

Coorientadora: Drª Adriani Paganini Damiani.

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

L849e Longaretti, Luiza Martins.

Efeito da suplementação de melatonina sobre parâmetros genotóxicos, bioquímicos e inflamatórios em camundongos alimentados com dieta cafeteria / Luiza Martins Longaretti. - 2021.
124 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2021.

Orientação: Vanessa Moraes de Andrade.

Coorientação: Adriani Paganini Damiani.

1. Obesidade. 2. Dieta de cafeteria. 3. Melatonina - Efeito colateral. 4. Estresse Oxidativo. 5. Antioxidante. I. Título.

CDD 23. ed. 616.398

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



unesc

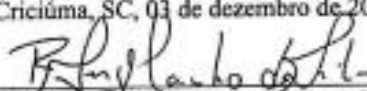
UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

PARECER

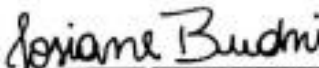
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de **DOUTORADO** apresentada pela candidata **LUIZA MARTINS LONGARETTI**, sob o título **“EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MELATONINA SOBRE PARÂMETROS GENOTÓXICOS, BIOQUÍMICOS E INFLAMATÓRIOS EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA CAFETERIA”** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Tese.

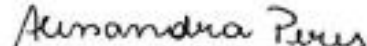
Criciúma, SC, 03 de dezembro de 2021.



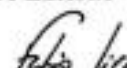
Prof. Dr. RICARDO ANDRÉZ MACHADO DE ÁVILA
Membro Relator – UNESC



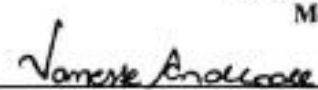
Profa. Dra. JOSIANE BUDNI
Membro Interno – UNESC



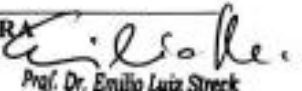
Profa. Dra. ALESSANDRA PERES
Membro Externo – UFCSPA



Prof. Dr. FÁBIO SANTOS DE LIRA
Membro Externo – UNESP



Profa. Dra. Vanessa de Moraes Andrade
Orientadora



Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo a Resolução N.07/2015 do Colegiado do PPGCS/UNESC, que aprova elementos mínimos a constar na versão final de teses de doutorado e dissertações de mestrado. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biomedicina Translacional do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) em colaboração com o Laboratório de Fisiopatologia, do PPGCS da UNESC.

*Dedico este trabalho aos meus tios, Bibianna e Augusto. Vocês se fizeram presentes e me acolheram como filha sempre que precisei.
Muito obrigada!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus, pois mais uma vez Ele me ajudou a chegar ao fim desse desafio.

Agradeço aos meus avós, Adão e Maria Luiza, por me ensinarem valores que jamais esquecerei. Vocês moldaram quem eu sou. “A medida do amor é amar sem medida”.

Agradeço aos meus tios, Bibi e Guto, que sempre acreditaram na minha capacidade de voar alto. “Não são os laços de sangue, mas os compromissos sentimentais que determinam o valor de uma família”.

Agradeço ao meu primo ~~preferido~~ Augusto, por se preocupar comigo, ser um irmão que a vida me deu e por todos os momentos de alegria, diversão e ~~briga~~ brigas. Te amo. “Ter um irmão é como ter um guardião das suas melhores recordações”.

Agradeço ao Michael por sempre ter me apoiado ao longo de toda essa trajetória. “Aquilo que o coração ama, se torna eterno”.

Agradeço aos meus sogros, Bethe e Sérgio, aos meus cunhados, Yuri, Lui, Nath e Roger, pelos momentos de descontração e carinho em mim depositados. “Um gesto de carinho não tem preço, mas tem o maior valor do mundo”.

Agradeço à minha mãe, Regina, pelo dom da vida e ao meu irmão, Lorenzo, pelos laços de sangue. “Grandes pessoas se formam a partir de grandes exemplos”.

Agradeço à minha orientadora, Profª Drª Vanessa Andrade, foram muitos anos caminhando juntas, compartilhando conhecimento. Você me viu crescer profissionalmente e como cientista. Obrigada por fazer parte de mais esse capítulo da minha vida e pelas palavras de apoio. “Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Agradeço a Adri, minha coorientadora por dividir seu tempo e conhecimento comigo. Obrigada pela parceria ao longo desses anos, cresci como profissional e você fez parte disso. “Companheirismo é mais do que ser motivo de sorrisos ensolarados. É permanecer ao lado nos dias de olhos nublados e chuvosos”.

Agradeço à Marina por contribuir com minha tese, sem você este trabalho não seria possível, você foi essencial para que eu esteja aqui hoje. Muito obrigada. “Trabalhar em equipe é unir várias formas de pensar para um objetivo só”.

Agradeço imensamente à Isa, que me ajudou com o desenvolvimento dessa pesquisa. “Reciprocidade, é isso que faz as coisas darem certo”.

Agradeço à minha amiga Ângela por ter sido a minha companheira ao longo desse período, por ter cuidado de mim sempre que precisei e por não me deixar desistir nunca. “Amigos são como estrelas: nem sempre podemos ver, mas temos certeza que estão sempre lá”.

Agradeço à minha amiga Giulia. Você sempre foi a primeira da fila para me mostrar que eu era capaz e não poderia estar mais feliz de te mostrar que eu consegui. Obrigada por acreditar em mim. “Um amigo que compreende suas lágrimas é muito mais valioso do que aquele que só admira seus sorrisos”. Agradeço também ao Diogo pelos momentos de risada e alegria.

Agradeço à minha amiga Samanta. Amizade que a biomedicina me deu e que hoje é o meu ponto de paz e de rir sem medida. “Um amigo verdadeiro é capaz de largar tudo, menos a sua mão”.

Agradeço à minha amiga Sinthia. Você é a minha amiga mais antiga e juntas vivemos muitas coisas, poderia agradecer pela sua amizade de anos mas quando achei que não faltava nada no nosso relacionamento, você me deu uma afilhada, Ana Liz, e ela veio para trazer luz às nossas vidas. Muito obrigada, minha amiga. “Vocês são o arco-íris em meio à tempestade”.

Agradeço aos meus amigos Maria Paula e Felipe pelos anos de amizade e por serem pessoas tão especiais na minha vida.

Agradeço a Schellen por este último ano, pelos momentos de descontração e pela parceria. “Toda a rotina fica mais divertida com a sua companhia”.

Agradeço ao Benjamin por se fazer presente nos últimos anos e pelo apoio.

Agradeço a todos os alunos de iniciação científica do GPGTOX, em especial a Carla, Catharina e Lígia, por terem executado da melhor forma possível todas as atividades pertinentes para que este trabalho pudesse se tornar real.

Agradeço ao grupo da Profª Drª Alessandra Peres, especialmente ao Gilson, pela parceria nesta pesquisa.

Agradeço ao grupo do Prof. Dr. Paulo Lock, especialmente ao Gustavo, por suas contribuições para que este trabalho se tornasse mais completo

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Andrez, Profª Drª Josiane Budni, Prof. Dr. Fábio Lira e Profª Drª Alessandra Peres por terem aceitado o convite para contribuir com este trabalho e partilhar os seus conhecimentos.

Agradeço ao grupo do Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol, especialmente à Monique, por ter contribuído com a minha formação.

Agradeço à Pauline pela ajuda e suporte.

Agradeço à Profª Drª Fernanda Rabaioli pelas aulas e contribuição para que esta pesquisa se tornasse ainda mais completa.

Agradeço aos funcionários do Centro de Experimentação Animal, Deivid, Heron e Sandra, pela paciência e ajuda durante a elaboração deste trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro no desenvolvimento do meu doutorado.

Por fim, agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram e ainda contribuem para que eu me torne uma pessoa melhor pessoal e profissionalmente. A todos vocês minha eterna gratidão. *“Não há no mundo exagero mais belo do que a gratidão”.*

*“Uma mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

O sobrepeso e a obesidade estão aumentando drasticamente nos últimos anos, devido ao aumento do consumo de *fast foods*. Indivíduos obesos apresentam uma diminuição das defesas antioxidantes, podendo levar a danos ao DNA. Dessa forma, estudos estão sendo conduzidos a fim melhorar as complicações ocasionadas pela obesidade. Para tanto, pesquisas em animais estão utilizando a dieta cafeteria (CAF) como modelo de indução de obesidade, uma vez que ela é baseada no consumo de alimentos ultraprocessados. Atualmente tem se estudado estratégias dietéticas complementares para prevenir e/ou melhorar as complicações causadas pela obesidade, como compostos naturais com efeitos antiobesidade. Dentre esses compostos, a melatonina (MEL) vem se destacando devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação de melatonina sobre parâmetros bioquímicos, genotóxicos e perfil inflamatório em camundongos alimentados com CAF. Para tanto, foram utilizados 60 camundongos machos Swiss, divididos em seis grupos experimentais (n=10): Dieta Padrão (DP) – alimentados apenas com ração padrão (21 semanas); DP + MEL – alimentados apenas com ração padrão e suplementados com melatonina (24 semanas); CAF – alimentados com CAF (21 semanas); CAF + MEL – alimentados com CAF e suplementados com melatonina; CAF / CAF + MEL – alimentados com CAF nas primeiras 17 semanas e nas últimas quatro semanas continuaram o consumo de CAF e iniciaram o consumo de melatonina, totalizando 17 semanas; CAF + MEL / CAF – alimentados com CAF e suplementados com melatonina nas primeiras 17 semanas e nas últimas quatro semanas pararam o consumo de melatonina, totalizando 21 semanas. Foram realizadas coletas de sangue dos animais em 17 e 21 semanas afim de avaliar danos ao DNA, perfil lipídico (triglicerídeos, colesterol total e HDL), hepático (ALT e AST), perfil inflamatório (TNF- α e IL-10), glicemia de jejum e realização do teste de tolerância à insulina dos animais nos seis grupos experimentais. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados e o fígado, rim, gordura e medula óssea foram retirados para realização dos demais testes: Ensaio Cometa, Teste de Micronúcleo, estresse oxidativo e *Western Blot*. Dessa forma, pode-se observar que a CAF induziu a um quadro inflamatório com aumento de TNF- α e diminuição de IL-10, acompanhando de alteração no perfil lipídico e hepático, além disso levou a danos ao DNA nos tecidos avaliados e resistência à insulina, quando os animais foram suplementados com MEL durante 17 semanas pode-se observar que houve uma reversão destas alterações. Nas últimas quatro semanas de experimentação observou-se que a CAF levou ao estresse oxidativo e danos em fígado, rim e medula óssea. A MEL foi eficaz para atenuar essas alterações presentes nos camundongos obesos, sendo que o principal mecanismo pelo qual a MEL atua na redução de danos ao material genético seria através da modulação das proteínas envolvidas com o processo de reparo do DNA na recombinação homóloga e não-homóloga. Em conclusão, os resultados demonstram que a MEL é um eficiente antioxidante, podendo ser um candidato a reduzir alterações bioquímicas e genéticas presente na obesidade.

Palavras-chave: Dieta cafeteria; Melatonina; Obesidade; Genotoxicidade; Estresse Oxidativo; Antioxidante.

ABSTRACT

Overweight and obesity are increasing dramatically in recent years, due to the increase in consumption of fast foods. Obese individuals have a decrease in antioxidant defenses, which can lead to DNA damage. Thus, studies are being conducted in order to improve complications caused by obesity. Therefore, animal research is using the cafeteria diet (CAF) as a model for inducing obesity, since it is based on the consumption of ultra-processed foods. Complementary dietary strategies are currently being studied to prevent and/or improve complications caused by obesity, such as natural compounds with anti-obesity effects. Among these compounds, melatonin (MEL) has been standing out due to its antioxidant and anti-inflammatory properties. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of melatonin supplementation on biochemical, genotoxic and inflammatory profile parameters in CAF-fed mice. For that, 60 male Swiss mice were used, divided into six experimental groups (n=10): Standard Diet (SD) – fed only with standard chow (21 weeks); DP + MEL – fed only standard chow and supplemented with melatonin (24 weeks); CAF – fed with CAF (21 weeks); CAF + MEL – fed with CAF and supplemented with melatonin; CAF / CAF + MEL – fed with CAF in the first 17 weeks and in the last four weeks continued the consumption of CAF and started the consumption of melatonin, totaling 21 weeks; CAF + MEL / CAF - fed with CAF and supplemented with melatonin in the first 17 weeks and in the last four weeks they stopped the consumption of melatonin, totaling 21 weeks. Blood samples were taken from the animals at 17 and 21 weeks in order to evaluate DNA damage, lipid profile (triglycerides, total cholesterol and HDL), liver (ALT and AST), inflammatory profile (TNF- α and IL-10), blood glucose of fasting and performance of the insulin tolerance test of the animals in the six experimental groups. At the end of the experiment, the animals were euthanized and the liver, kidney, fat and bone marrow were removed to perform the other tests: Comet Assay, Micronucleus Test, oxidative stress and Western Blot. Thus, it can be observed that CAF induced an inflammatory condition with an increase in TNF- α and a decrease in IL-10, accompanied by an alteration in the lipid and liver profile, in addition to leading to DNA damage in the tissues evaluated and resistance to insulin, when the animals were supplemented with MEL for 17 weeks, it can be seen that there was a reversal of these changes. In the last four weeks of experimentation, it was observed that CAF led to oxidative stress and liver, kidney and bone marrow damage. MEL was effective in attenuating these changes present in obese mice, and the main mechanism by which MEL acts to reduce damage to genetic material would be through the modulation of proteins involved in the DNA repair process in homologous and non-homologous recombination. homologous. In conclusion, the results demonstrate that MEL is an efficient antioxidant and may be a candidate to reduce the biochemical and genetic alterations present in obesity.

Keywords: Cafeteria diet; Melatonin; Obesity; Genotoxicity; Oxidative Stress; Antioxidant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mecanismos fisiológicos da inibição e liberação de melatonina.....	27
Figura 2. Desenho experimental..	37
Figura 3: Linha do tempo do experimento.	34
Figura 4: Exemplo de uma rede biológica..	42
Figura 5: Teste de tolerância à insulina e área sob a curva (ASC) dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina na semana 17 (A) e 21 (B).	52
Figura 6: Índice de adiposidade..	58
Figura 7: TNF- α em soro de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina avaliadas na semana 17 e 21	59
Figura 8: TNF- α (A), IL-10 (B) e razão de TNF- α /IL-10 (C) em fígado de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina	60
Figura 9: Níveis de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) no fígado de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina.	62
Figura 10: Avaliação do dano oxidativo por meio do conteúdo de sulfidril no fígado de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina.	63
Figura 11: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e da glutatona (GSH) no fígado de camundongos alimentados com ração padrão e/ou dieta cafeteria e suplementados com melatonina.	64
Figura 12: <i>Tail intensity</i> (%) de células de sangue periférico dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina e avaliados na semana 17 e 21.....	65
Figura 13: <i>Tail intensity</i> (%) de células de fígado dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina e avaliados na semana 21	66
Figura 14: <i>Tail intensity</i> (%) de células de rim dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina na semana 21.....	67
Figura 15: Níveis de OGG1 (A) e APE 1 (B) no fígado de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina.....	70
Figura 16: Níveis de NRF2 no fígado de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina..	71
Figura 17: Níveis de GLUT4 no tecido adiposo branco inguinal (A) e mesentérico (B) de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina.....	72
Figura 18: Rede biológica: os círculos são os nós da rede, e estes representam proteínas humanas. (a) a rede de interação químico-proteica, contendo 818 nós e 45717 conectores, onde podemos encontrar todos os <i>clusters</i> . (b) nós que compõem o <i>Cluster 2</i> , em branco.	73
Figura 19: Gráfico de hubs-gargalos (HG) mostrando os nós mais importantes da rede..	76
Figura 20: Modelo molecular do mecanismo de ação no reparo do dano ao DNA induzido pela obesidade.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cardápio semanal dos animais que foram alimentados com dieta cafeteria.	35
Tabela 2. Composição das dietas.	36
Tabela 3: Consumo alimentar (g/dia/camundongo), energético (kcal/dia), de líquidos (mL/dia) e melatonina (mg/dia) dos animais alimentados com ração padrão e/ou dieta cafeteria e suplementados com melatonina.	47
Tabela 4: Média do peso corporal (g) dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina.	49
Tabela 5: Glicemia de jejum (mg/dL) dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina na semana 17 e 21.	51
Tabela 6: Perfil lipídico avaliado através do triglicerídeos, colesterol total, HDL-c e índice de Castelli avaliados no soro dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina nas semanas 17 e 21.	54
Tabela 7: Perfil hepático avaliado através da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST) no soro dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina, nas semanas 17 e 21.	56
Tabela 8: Teste de micronúcleo avaliado através do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) em amostras de medula óssea de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina.	68
Tabela 9: Análise de ontologia gênica, evidenciando o <i>cluster</i> em que ocorre, o valor de significância e as proteínas envolvidas.	75

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

4-HNE - 4-hidroxinonenal (do inglês *4-hydroxynonenal*)

8-OHdG - Derivado oxidado da desoxiguanosina (do inglês *8-Oxo-2'-deoxyguanosine*)

Abeso - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica

AFMK - Metabólito da melatonina (do inglês *N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina*)

AGEs - Produtos finais da glicação avançada (do inglês *Advanced Glycation Endproducts*)

AKT - Proteína quinase B

ALT - Alanina aminotransferase

ANOVA - Análise de variância

AP - Apurínico/Apirimidínico

AP-1 - Proteína ativadora 1

APE 1 - Endonuclease apurínica 1 (do inglês *Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1*)

ASC - Área sob a curva

AST - Aspartato aminotransferase

ATP - Adenosina trifosfato

BER - Reparo por excisão de bases (do inglês *base excision repair*)

BiNGO - *plug-in Biological Network Gene Ontology*

CACC - Carcinogênese do cólon

CAF - Dieta cafeteria

CAT - Catalase

CEA - Centro de Experimentação Animal

Cidea - Ativador de morte celular

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX-2 - Ciclo-oxigenase

DCFH - 2,7-diclorofluoresceína

DM2 - Diabetes mellitus tipo 2

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

DNA-PK - Proteína quinase dependente de DNA

DP - Dieta padrão

DTNB - Ácido 5,5-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico)

EC - Ensaio cometa

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

EM - Erro padrão da média

ENC - Eritrócitos normocromáticos

EO - Estresse oxidativo

EPC - Eritrócitos policromáticos

EPCMn - Eritrócitos policromáticos micronucleados

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FOXO1 - Do inglês *forkhead Box O1*

GLP-1 - Peptídeo 1 semelhante ao glucagon

GLUT4 - Transportador de glicose 4

GPx - Glutathione peroxidase (do inglês *glutathione peroxidase*)

GSH - Glutathione reduzida (do inglês *reduced glutathione*)

GSSG - Glutathione oxidada

GST - Glutathione S-transferase

GT - Gama glutamil transferase

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HDL-c - do inglês *high-density lipoprotein cholesterol*

HO-1 - Heme oxigenase 1 (do inglês *heme oxygenase-1*)

HR - Reparo de quebras duplas por recombinação homóloga (do inglês *homologous recombination*)

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IGF1 - Fator de crescimento tipo insulina I

IL-10 - Interleucina 10

IL-6 - Interleucina 6

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IMC - Índice de Massa Corporal

iNOS - Óxido nítrico-sintase induzida

IRS1 - Substrato 1 do receptor de insulina

ITT - Teste de tolerância à insulina

JNK - Do inglês *c-Jun N-terminal cinase*

LDL-c - Do inglês *low-density lipoprotein*

LPS - Lipopolissacarídeo

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês *mitogen-activated protein kinase*)

MAPKKK - Proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno (do inglês *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*)

MCODE - *plug-in Molecular Complex Detection*

MDA - Malondialdeído

MEK - Proteína quinase quinase ativada por mitógeno (do inglês *mitogen-activated protein kinase kinase*)

MEL - Melatonina

MMR - Reparo de erros de emparelhamento entre bases (do inglês *mismatch repair*)

MN - Micronúcleos

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MT1 - Receptor de melatonina 1

MT2 - Receptor de melatonina 2

mTOR - Alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês *mammalian target of rapamycin*)

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NER - Reparo por excisão de nucleotídeos (do inglês *nucleotide excision repair*)

NF-κB - Fator de transcrição nuclear kappa B (do inglês *factor nuclear kappa B*)

NHEJ - Reparo de quebras duplas reparação não homóloga (do inglês *non-homologous end joining*)

N-HG - Nó hub-gargalo

NLRP3 - NLR receptor do tipo NOD - *NLR family, pyrin domain containing 3*

NO - Óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*)

NOS - Óxido nítrico sintase

NOX4 - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidase 4

NQO1 - NADPH desidrogenase [quinona] 1

NRF2 - Fator nuclear eritróide-2

NSQ - Núcleo supraquiasmático

O₂⁻ - Radical superóxido

OGG1 - DNA glicosilase de 8-oxoguanina (do inglês *8-oxoguanine DNA glycosylase*)

OH - Hidroxila

OMS - Organização Mundial da Saúde

p21 - Proteína p21

p53 - Proteína p53

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PGC1 α - Do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha*

PI3k - Fosfatidilinositol 3-quinase

PKC - Proteína quinase C

Pol β - DNA polimerase β

PRKCB - Proteína quinase C Beta

PVDF - Membrana de Difluoreto de Polivinilideno

RNA - Ácido ribonucleico

SBEM - Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia

SCFAs - Ácidos graxos de cadeia curta (do inglês *short chain fatty acids*)

SCGE - Eletroforese em gel de célula única (do inglês *single cell gel electrophoresis*)

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

-SH - Grupo tiol

SIRT-1 - Sirtuína 1

SOD - Superóxido dismutase

TAB - Tecido adiposo branco

TAM - Tecido adiposo marrom

TNB - Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Top1 - DNA topoisomerase 1

UCP1 - Do inglês *Uncoupling Protein 1*

UNASAU - Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

Vigitel - Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

VLDL – Do inglês *Very low-density lipoprotein*

WHO - *World Health Organization*

Xpf - Proteína de reparo do DNA

ZFP516 - *Zinc finger protein 516*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBESIDADE	19
1.1.1 Inflamação, estresse oxidativo e danos ao DNA na obesidade.....	21
1.2 MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DE OBESIDADE: CAF.....	24
1.3 MELATONINA.....	25
1.3.1 Obesidade, melatonina e danos ao DNA	28
1.4 JUSTIFICATIVA.....	31
2 OBJETIVO GERAL	33
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 CRITÉRIOS ÉTICOS	34
3.1.1 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	34
3.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DA MELATONINA.....	34
3.3 MODELO DE INDUÇÃO DE OBESIDADE	35
3.3.1 Dieta Cafeteria.....	35
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL.....	36
3.5 CONSUMO ALIMENTAR E GANHO DE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS	35
3.6 CONSUMO DE LÍQUIDOS	35
3.6.1 Cálculo do consumo de melatonina.....	35
3.7 GLICEMIA DE JEJUM E TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA.....	35
3.8 PERFIL LIPÍDICO E HEPÁTICO.....	36
3.9 ÍNDICE DE ADIPOSIDADE CORPORAL	36
3.10 PERFIL INFLAMATÓRIO.....	36
3.11 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	36
3.11.1 – Conteúdo de proteínas.....	37
3.11.2 – Produção de oxidantes	37
3.11.2.1 – Diclorofluoresceína DCFHDA	37
3.11.3 – Marcador de dano oxidativo	37
3.11.3.1 – Conteúdo de Sulfidrilas	38
3.11.4 – Defesas antioxidantes	38
3.11.4.1 – Superóxido Dismutase (SOD)	38
3.11.4.2 – Glutathione (GSH)	38
3.12 ENSAIO DE GENOTOXICIDADE	38
3.12.1 Ensaio Cometa.....	39

3.12.2 Teste de Micronúcleos (MN)	40
3.13 NÍVEIS DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	40
3.14 ANÁLISE DA BIOLOGIA DE SISTEMAS	41
3.14.1 Construção da rede de interações	43
3.14.2 Análise Topológica	43
3.14.3 Análise de ontologia gênica	44
3.14.4 Análise de centralidade	44
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 RESULTADOS	46
4.1 CONSUMO ALIMENTAR, LÍQUIDOS E MELATONINA	46
4.2 PESO CORPORAL	48
4.3 GLICEMIA DE JEJUM E TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA	50
4.4 PERFIL LÍPIDICO E HEPÁTICO	53
4.4.1 Perfil lipídico	53
4.4.2 Perfil hepático	55
4.5 ÍNDICE DE ADIPOSIDADE CORPORAL	57
4.6 PERFIL INFLAMATÓRIO	59
4.6.1 Citocinas pró e anti-inflamatórias	59
4.7 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO	61
4.7.1 Produção de oxidantes	61
4.7.2 Marcador de dano oxidativo	63
4.7.3 – Defesas antioxidantes	63
4.8 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE	64
4.8.1 Ensaio Cometa	64
4.8.2 Teste de Micronúcleo	67
4.9 TÉCNICA DE <i>WESTERN BLOT</i>	70
4.9.1 Níveis de APE 1 e OGG1 em fígado de animais alimentados com dieta cafeteria e/ou ração padrão e suplementados com melatonina	70
4.9.2 Níveis de NRF2 em fígado de animais alimentados com dieta cafeteria e/ou ração padrão e suplementados com melatonina	71
4.9.3 Níveis de GLUT4 em tecido adiposo branco de animais alimentados com dieta cafeteria e/ou ração padrão e suplementados com melatonina ..	72
4.10.4 Biologia de sistemas	73
5 DISCUSSÃO	77
6 CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS	97

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM ANIMAIS123

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE

A obesidade e as comorbidades metabólicas associadas são um problema de saúde pública em todo o mundo (Hill et al., 2018). De acordo com a pesquisa do Ministério da Saúde em capitais brasileiras (Vigitel, 2019), o excesso de peso está presente em 55,7% e a obesidade em 19,8% da população adulta. Projeções realizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (2018) relatam que a previsão para 2025 seja de aproximadamente 2,3 bilhões de adultos com sobrepeso e 700 milhões com obesidade.

O principal critério para definir o sobrepeso e a obesidade está relacionado com o Índice de massa corporal (IMC) que leva em consideração o peso e a altura do indivíduo (WHO, 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2018) um indivíduo é considerado com sobrepeso quando o IMC for maior ou igual a 25 e obeso quando o IMC maior ou igual a 30.

Uma vez considerado um problema apenas em países de alta renda, o excesso de peso e a obesidade estão aumentando dramaticamente nos países de baixa e média renda, particularmente nas áreas urbanas (WHO, 2018), onde o consumo frequente de alimentos hipercalóricos e hiperlipídicos, conhecidos como *fast food*, tem aumentado bastante nos últimos anos. Estes alimentos são ricos em ácidos graxos saturados, ácidos graxos trans, açúcar e sódio (Piernas e Popkin, 2010; Macedo et al., 2012; Jaworowska et al., 2013) e estão normalmente associados a uma menor ingestão de fibras, vitaminas e minerais (Jaworowska et al., 2013; Martin et al., 2013), o que contribui para os quadros de obesidade e síndrome metabólica.

Alguns pesquisadores têm estudado a relação do consumo de alimentos *fast food* com a obesidade (Sampey et al., 2011; Macedo et al., 2012; Cobb et al., 2015; Ginés et al., 2018). Cobb et al. (2015), realizaram uma revisão sistemática e observaram que houve uma associação positiva entre a qualidade do ambiente alimentar com a obesidade.

Os maus hábitos de vida que levam ao sobrepeso e obesidade ocorrem a partir de um desequilíbrio entre as calorias consumidas e as calorias gastas, uma vez que associado ao consumo de alimentos ricos em energia está o sedentarismo. Quando este quadro está presente na rotina de um indivíduo (WHO, 2018), ocorre o

que é chamado de superávit calórico ou equilíbrio energético positivo (Monteiro et al., 2009).

Um estado de equilíbrio energético positivo, com acúmulo de gordura ao longo do tempo, exige plasticidade do tecido adiposo, que inclui a formação de novos adipócitos e também a adesão física dos espaços anatômicos para a expansão do tecido adiposo (Monteiro et al., 2009). Caso contrário, ocorrem dois fenômenos deletérios: crescimento hipertrófico de adipócitos, que se romperão mais frequentemente; e deposição de gordura em órgãos diferentes do tecido adiposo (Sethi e Vidal-Puig, 2007), principalmente no fígado, com doenças locais, como a esteatose hepática e, doenças sistêmicas, tal como a resistência à insulina (Hegele et al., 2007).

Nesse contexto, a OMS e várias autoridades nacionais fizeram recomendações acerca da limitação do consumo diário de carboidratos, mais especificamente de amidos e açúcares rapidamente digeríveis (Brouns, 2018). Estas recomendações desempenham um papel fundamental na redução dos riscos de obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (Hauner et al., 2012; DeSalvo et al., 2016), uma vez que a manutenção da quantidade “normal” de tecido adiposo é essencial, pois o aumento deste tecido pode ocasionar sérios problemas de saúde (Favero et al., 2015).

O peso corporal excessivo aumenta significativamente o risco e o prognóstico de síndrome metabólica (WHO, 2015). Um consenso da International Diabetes Federation e da American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute identifica os critérios da síndrome metabólica como: obesidade abdominal, colesterol HDL (do inglês *high-density lipoprotein cholesterol*) reduzido, triglicerídeos elevados, intolerância à glicose e hipertensão, sendo que o diagnóstico exige que três dos cinco critérios estejam presentes (Alberti et al., 2009).

A incidência crescente da síndrome metabólica em todo o mundo acompanha a adoção do chamado estilo de vida ocidental moderno (Carnethon et al., 2004; Wilsgaard e Jacobsen, 2007). As principais características negativas deste estilo de vida incluem estresse em longo prazo e contínuo e também estresse psicológico, equilíbrio energético positivo (consumo excessivo de energia e baixa atividade física) e alimentos de baixa qualidade (pobres em micronutrientes) (Azevedo et al., 2009). Dessa forma, a principal causa da síndrome metabólica é um estilo de vida não saudável, em especial uma dieta altamente processada, rica em gordura,

açúcar e sódio (Lutsey et al., 2008), combinada com inatividade física (Gennuso et al., 2015).

1.1.1 Inflamação, estresse oxidativo e danos ao DNA na obesidade

Há décadas vem se estudando a relação da obesidade com a inflamação, onde descobriu-se que o excesso de peso está associado ao desenvolvimento da inflamação sistêmica crônica de baixo grau no tecido adiposo. Esta condição é influenciada pela ativação do sistema imune inato no tecido adiposo que promove o estado pró-inflamatório e o estresse oxidativo, provocando uma resposta sistêmica de fase aguda. Como citado anteriormente, várias doenças crônicas são provenientes da obesidade, por exemplo, síndrome metabólica, diabetes mellitus, doenças hepáticas e cardiovasculares e câncer, todas essas doenças estão associadas ao aumento de estresse oxidativo (Alberti e Zimmeti, 1998). Portanto, tem-se a hipótese de que a inflamação do tecido adiposo em pacientes obesos desempenha um papel crítico na patogênese das complicações relacionadas à obesidade (Xu et al., 2003).

O tecido adiposo é um órgão endócrino e de armazenamento necessário para a homeostase energética. Este tecido, composto principalmente de adipócitos, também contém outras células (dentre elas fibroblastos, células endoteliais e imunes) (Cristancho e Lazar, 2011), hormônios secretores e citocinas (adipocinas ou adipocitocinas) que exercem a ação endócrina, parácrina e autócrina sobre o corpo inteiro (Fernández-Sánchez et al., 2011).

O tecido adiposo pode ser classificado em três tipos de acordo com suas funções, vascularização e estrutura: tecido adiposo marrom (TAM), tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo bege (Frigolet e Guitérrez-Aguilar, 2020).

O TAM possui adipócitos de menor tamanho, multiloculares, maior número de mitocôndrias e expressão da proteína UCP-1 (do inglês *Uncoupling Protein 1*). Os adipócitos deste tecido têm alta capacidade de absorção de nutrientes, porém não evidencia alta capacidade hipertrófica, pois os ácidos graxos são utilizados para a produção de calor no processo de termogênese (Warner e Mittag, 2015).

Com relação ao TAB, sua principal função é no controle da homeostase energética por meio do armazenamento e liberação de lipídeos em resposta às necessidades nutricionais e metabólicas sistêmicas. A expansão do TAB ocorre por hipertrofia (aumento no tamanho dos adipócitos por acúmulo de lipídeos) e/ou

hiperplasia (aumento no número de adipócitos – através da adipogênese) (Zwisch et al., 2018). O TAB é distribuído no corpo através de diversos depósitos, incluindo viscerais (Wajchenberg, 2000), e seu acúmulo está relacionado principalmente a distúrbios metabólicos, tais como diabetes e doenças cardiovasculares (Shuster et al., 2012) e subcutâneos que contribui com efeitos benéficos ao metabolismo (Kwok et al., 2016).

O terceiro tipo de tecido adiposo, chamado de bege, tem a morfologia intermediária entre o de adipócitos brancos e marrons (Young et al., 1984; Cousin et al., 1992). Apesar das semelhanças com os adipócitos marrons, os adipócitos bege podem sofrer um fenótipo termogênico ou de armazenamento, dependendo das condições ambientais (Zoico et al., 2019).

A expansão aumentada do tecido adiposo está relacionada com a ativação da via do NF- κ B que regula negativamente o gene *SLC2A4*. Esse gene codifica o transportador de glicose 4 (GLUT4) em TAB e TAM e também em músculo esquelético e cardíaco. A presença de tecido adiposo em excesso é fonte de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) -1 β , IL-6 e anti-inflamatórias, tais como a IL-10 (Fonseca-Alaniz et al., 2007).

O TNF- α é uma citocina que tem influência na resposta inflamatória, no sistema imunológico, na apoptose das células adiposas, no metabolismo lipídico, no aumento da lipogênese hepática e na sinalização da insulina (Chandel et al., 2001). A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) também pode ser induzida pelo TNF- α através da ligação de receptores específicos e na promoção da sinalização do NF- κ B (Chandel et al., 2001). Estudos relatam que os níveis séricos de TNF- α estão aumentados na obesidade e diminuem com a perda de peso. O TNF- α favorece a resposta sistêmica de fase aguda através da liberação de IL-6 (Wang e Trayhurn, 2006).

De uma forma geral, o tecido adiposo acumulado induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6, que promovem o aumento da geração de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) por macrófagos e monócitos (Fonseca-Alaniz et al., 2007). As ERO induzem a liberação adicional de citocinas pró-inflamatórias e expressão de moléculas de adesão e fatores de crescimento (por exemplo, fator de crescimento de tecido conjuntivo, fator de crescimento de insulina-1 (IGF-I), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e molécula de adesão de células vasculares (Lavrovsky et al., 2000) através de fatores

de transcrição, particularmente NF- κ B e a via da fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase (Shoelson et al., 2007).

Há uma forte relação entre os processos pró-inflamatórios e o estresse oxidativo (Redman e Sargent, 2003), uma vez que tanto em condições fisiológicas quanto em condições patológicas, as citocinas induzem a produção de ERO, gerando uma produção maior e irregular de outras citocinas (Fernández-Sánchez et al., 2011).

A suscetibilidade ao dano oxidativo é ainda maior em indivíduos obesos devido a depleção das defesas antioxidantes, incluindo a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT) (Amirkhizi et al., 2007). Em comparação com pacientes com peso normal, a atividade da SOD em indivíduos obesos é significativamente menor (Ozata et al., 2002). Além disso, foi demonstrado que a suplementação com antioxidantes, tais como vitamina A, E e C e β -caroteno (Amirkhizi et al., 2007), pode reduzir o estresse oxidativo, ERO, risco de complicações relacionadas à obesidade e restaurar a expressão de adipocinas (citocinas anti-inflamatórias) (Furukawa et al., 2004).

Além do exposto, a obesidade está relacionada com danos causados ao DNA, como demonstrado no estudo de Al-Aubaidy et al. (2011) onde foi observado um dano oxidativo maior em indivíduos obesos e com sobrepeso quando comparados com indivíduos magros. O sobrepeso e a obesidade também estão relacionados com danos oxidativos em macromoléculas, tais como o DNA, avaliados através da 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG), e lipoperoxidação, avaliada através do malondialdeído (MDA) (Karbownik-Lewinska et al., 2012).

Em um estudo de Elwakkad et al. (2011), a concentração sérica de 8-OHdG em adolescentes com obesidade severa foi maior que em adolescentes com obesidade menos acentuada, sendo que houve uma correlação altamente positiva entre o IMC e a concentração sérica de 8-OHdG.

Setayeshi et al. (2018) identificaram 18 estudos em que os efeitos do excesso de peso afetaram a estabilidade do DNA em células somáticas de camundongos. Da mesma forma, outros autores demonstraram resultados semelhantes obtidos através do ensaio cometa (EC) em roedores, indicando que há a presença de instabilidade genômica em diferentes tecidos, tais como em rim, fígado, cérebro e sangue (De Sibio et al., 2013; Tenorio et al., 2013; Leffa et al., 2014; Sinha et al., 2014; Setayesh et al., 2017; Gutzkow et al., 2016; Remely et al., 2017a; Remely et al., 2017b).

Um estudo conduzido por Leffa et al. (2014), avaliou o efeito da uma dieta cafeteria (CAF) hipercalórica em relação aos danos no DNA, sendo que essa CAF era rica em alimentos industrializados e bebidas açucaradas. Dessa forma, foi observado que houve dano genotóxico ao DNA, avaliado através do EC no grupo CAF significativamente maior que o grupo dieta padrão, em sangue periférico, rim, fígado e cérebro e também foi observado dano mutagênico, avaliado pelo teste de micronúcleo (MN) na medula óssea dos animais do grupo CAF.

O dano genotóxico também está aumentado em pacientes com síndrome metabólica, como observado em um estudo realizado com pessoas portadoras dessa doença. Neste estudo, pode-se observar que a presença de síndrome metabólica aumentou os danos ao DNA, avaliados através do EC e teste de MN, em relação ao grupo controle saudável (Karamana et al., 2015). Esses resultados também estão correlacionados com características da síndrome metabólica, como circunferência abdominal, IMC, triglicerídeos plasmáticos e níveis de HDL-c (Mitjavila et al., 2013). Os danos genotóxicos podem ter sido causados pelo excesso de ERO e o estresse oxidativo (Konat, 2003).

Da mesma forma, um estudo realizado em humanos demonstrou que 81 crianças com sobrepeso e obesidade, com idade média de 10 anos, tiveram uma frequência de MN significativamente maior em relação ao grupo controle com crianças saudáveis. Este resultado pode ser explicado pela inflamação causada pelo excesso de peso, que aumenta o estresse oxidativo e assim causa danos às macromoléculas, tal como o DNA (Scarpato et al., 2011).

1.2 MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DE OBESIDADE: CAF

A CAF é um modelo confiável de indução de obesidade em animais, que mimetiza a obesidade dietética em seres humanos, promovendo hiperfagia voluntária, ganho de peso corporal, expansão exacerbada do tecido adiposo, hiperglicemia, hiperinsulinemia e processos inflamatórios no fígado e tecido adiposo (Sampey et al., 2011).

A CAF fornece aos animais uma seleção variada de alimentos ultraprocessados, tais como salgadinhos, bolachas, salsicha, chocolates e *marshmallow* (Shafat et al., 2009; Sampey et al., 2011; Leffa et al., 2014) e dessa forma reflete com maior precisão a comorbidade das doenças humanas (Sampey et

al., 2011; Higa et al., 2014). Como pode ser observado no estudo conduzido por Gomez-Smith et al. (2016), a CAF é capaz de gerar síndrome metabólica em ratos, com aumento do tecido adiposo visceral, dislipidemia e resistência à insulina. Além desses efeitos periféricos, a inflamação também esteve presente no hipocampo dos ratos alimentados com CAF. Notavelmente, os distúrbios metabólicos e a neuroinflamação do hipocampo foram totalmente resolvidas ao mudar a dieta dos animais, para uma dieta saudável durante um mês. Além disso, outro importante resultado encontrado foi que, mesmo em curto prazo, a exposição à CAF induziu um estado pró-inflamatório, efeito este que pode ser prejudicial com o avanço da idade ou associado a lesões, como acidente vascular cerebral (Gomez-Smith et al., 2016).

Beilharz et al. (2014) demonstraram que a CAF, quando combinada com uma solução de sacarose 10%, pode aumentar rapidamente a expressão de mRNA de marcadores neuroinflamatórios como TNF- α e IL1 β no hipocampo. Estes marcadores, por sua vez, podem estar relacionados a danos cognitivos e, de fato, Holloway et al. (2011) relataram que adultos saudáveis que comeram uma dieta com 70% de gordura por 5 dias apresentaram pior desempenho em tarefas que medem a atenção e a velocidade de recuperação em relação ao período anterior à dieta.

Estudo conduzido por Dias et al. (2014), avaliou uma CAF, que consistia em alimentos conhecidos como *fast food*, que incluíam salgadinhos, bolachas, mortadela, salsicha, entre outros, sendo que esses alimentos foram fornecidos aos camundongos durante 13 semanas, ao final foi observado que a mesma foi capaz de aumentar o peso corporal desses animais em comparação com o grupo dieta padrão, aumento de triacilgliceróis e TNF- α . Já no estudo de Leffa et al. (2014), foi possível observar que esse modelo de CAF induziu intolerância à glicose em relação ao grupo alimentado apenas com ração padrão.

1.3 MELATONINA

A obesidade e o excesso de peso são considerados problemas multifatoriais e a determinação da sua origem contribui para determinar, desta forma, as melhores soluções para reduzir sua incidência. Portanto, estratégias dietéticas complementares, como compostos naturais com efeitos antiobesidade, poderiam ser um suporte adjuvante às terapias atuais e reforçar os tratamentos de obesidade (Ginés et al., 2018). A melatonina (MEL) se encaixa neste cenário por possuir efeitos

antioxidantes e anti-inflamatórios e estar envolvida na regulação do tecido adiposo (Tan et al., 2011; Jimenéz-Aranda et al., 2014).

A MEL (N-acetil-5-metoxitriptamina) é produzida principalmente pela glândula pineal, mas é também produzida em menor quantidade em outros órgãos, como o trato gastrointestinal, pele, retina e medula óssea (Acuña-Castroviejo et al., 2014; Slominski et al., 2018). Além do ciclo de luz claro-escuro, os níveis desse hormônio são controlados pelas estações do ano, gênero, idade e condições fisiológicas (Rondanelli et al., 2013). O controle do ritmo circadiano é apenas uma das muitas funções da MEL, que também tem função imunomodulatória (Reiter et al., 2010a), anti-inflamatória, antioxidante, de vasorregulação (Galano et al., 2011; Mauriz et al., 2013) e atividade oncostática (Bonnefont-Rousselot e Collin, 2010; Reiter et al., 2010b; Fernández-Mar et al., 2012), atuando através da eliminação de radicais livres (Galano et al., 2013; Favero et al., 2014).

A produção de MEL pela glândula pineal não está sujeita a mecanismos de retroalimentação, dessa forma a sua concentração plasmática não regula sua própria produção (SBEM, 2017). Os receptores de MEL podem ser encontrados em diversos locais, tais como no cérebro, gônadas, glândula adrenal, coração, pulmões, artérias, rins, pele, músculo, tecido adiposo, intestino e entre outros (Johnston e Skene, 2015).

O mecanismo pelo qual a glândula pineal é estimulada a produzir MEL, ocorre quando não há a presença de luminosidade. Dessa forma, a ligação entre a glândula pineal e a luz se inicia na retina quando a mesma envia sinais luminosos através do trato retino-hipotalâmico para o núcleo supraquiasmático, que é um oscilador circadiano no cérebro (Kalsbeek et al., 2006).

Durante as horas de luz do dia, os neurônios no núcleo supraquiasmático são altamente ativados e enviam sinais inibitórios para a glândula pineal através da medula espinhal, dessa forma, a produção de MEL é inibida. À noite, o núcleo supraquiasmático envia sinais à glândula pineal que, por sua vez, inicia a produção de MEL para indução do sono (Figura 1) (Ackermann e Stehle, 2006).

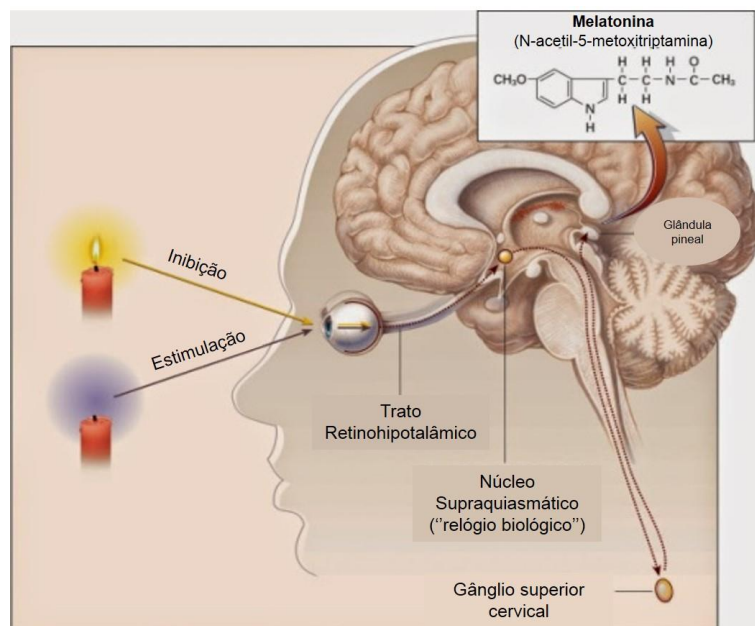


Figura 1: Mecanismos fisiológicos da inibição e liberação de MEL (Adaptado de Brzezinski, 1997). A glândula pineal é estimulada a produzir MEL durante a noite ou na ausência de luminosidade. A ausência de luz estimula o trato retinohipotalâmico que envia sinais inibitórios para o núcleo supraquiasmático e, por sua vez, os sinais inibidores são direcionados para a glândula pineal que inicia a produção de MEL para indução do sono (Ackermann e Stehle, 2006).

A produção de MEL sistêmica é exclusiva da glândula pineal, no entanto, não é a maior produtora deste hormônio, pois o intestino e a pele são os responsáveis pela maior produção desse hormônio (Huether, 1993; Slominski et al., 2008). A regulação da produção extrapineal de MEL (exceto para a retina) utiliza mecanismos diferentes daqueles da glândula pineal. Nesses órgãos, a produção não responde ao ciclo claro/escuro, sendo regulada pelas demandas dos tecidos locais (Tan et al., 2015).

O fígado é o principal local para o metabolismo da MEL circulante. O primeiro passo é mediado pelas monooxigenases do citocromo P450 e envolve a hidroxilação da MEL na posição C6. Este passo é seguido pela conjugação do produto com sulfato para produzir 6-sulfatoximelatonina (Claustrat et al., 2005). O metabolismo da MEL também envolve reações não enzimáticas que ocorrem em todas as células e extracelularmente. Nessas reações, a MEL é convertida em 3-hidroximelatonina cíclica após a eliminação de 2 radicais hidroxila (Srinivasan et al., 2008). O principal metabólito, a 6-sulfatoximelatonina, é inativo e sua excreção urinária reflete as concentrações plasmáticas de MEL (Fideleff et al., 2006).

A MEL foi primeiramente identificada como um captador de radicais livres há mais de duas décadas (Tan et al., 1993) e desde então muitos artigos estão sendo publicados afim de comprovar a habilidade deste hormônio antioxidante em proteger

o DNA de danos causados por esses radicais (Galano et al., 2013), melhora do perfil lipídico (Kozirog et al., 2011), diminuição de citocinas pró-inflamatórias (Tengattini et al., 2008) e melhora das defesas antioxidantes (She et al., 2009).

1.3.1 Obesidade, melatonina e danos ao DNA

A MEL é uma molécula pequena, altamente lipofílica e hidrofílica capaz de atravessar todas as barreiras morfológicas e além de atuar em todas as células, também atua em todos os compartimentos subcelulares (Rodriguez et al., 2004). Essas atividades levaram à sugestão de que ela pode ser usada clinicamente em doenças onde seus níveis circulantes são reduzidos, como em doenças cardiovasculares (Reiter et al., 2010a) e diabetes (Peschke, 2008), além do câncer (Srinivasan et al., 2008).

O papel da MEL na regulação do peso corporal foi claramente demonstrado pela observação de que a redução da MEL circulante em ratos pinealectomizados foi seguida por um aumento no peso corporal e a administração intraperitoneal deste hormônio a esses animais pinealectomizados reverteu o ganho de peso corporal (Prunet-Marcassus et al., 2003).

Estudos epidemiológicos sugerem que um aumento na secreção de MEL reduz o risco de desenvolvimento de hipertensão e diabetes tipo 2 (Forman et al., 2010; McMullan et al., 2013). Obayashi et al. (2015) encontraram níveis mais baixos de leucócitos, que são biomarcadores da inflamação sistêmica, em uma grande população geral de idosos, quando a excreção urinária de 6-sulfatoximetatonina foi maior. Esses achados levam à hipótese de que níveis mais altos de MEL endógena estão associados a menor inflamação sistêmica (Obayashi et al., 2015).

A MEL é um potente antioxidante e atua eliminando ERO e de nitrogênio (Galano et al., 2013; Zhang e Zhang, 2014), estimulando os sistemas de defesa antioxidante através de receptores e aumentando a síntese de enzimas antioxidantes, tais como a SOD e reduzindo estresse oxidativo, avaliado através de produção de MDA (She et al., 2009). Vários estudos experimentais em humanos relataram que a administração repetida de MEL reduziu o estresse oxidativo e também contribuiu para uma diminuição nas citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-6 (Galano et al., 2011; Kozirog et al., 2011; Mannino et al., 2019). Um estudo epidemiológico relatou que níveis mais altos de MEL endógena foram associados significativamente com

níveis mais baixos de IL-6 em mulheres idosas (Rodriguez et al., 2004; Tengattini et al., 2008).

Um estudo conduzido por Favero et al. (2015), avaliou o efeito de oito semanas de suplementação com MEL, disponibilizada na água de beber, para camundongos magros e obesos. Como resultado, observaram que a MEL melhorou o baixo grau de inflamação do tecido adiposo associado à obesidade.

Além das propriedades expostas acima, a MEL também influencia vários hormônios envolvidos nas vias metabólicas, como insulina e glucagon (Galano et al., 2011; Peschke et al., 2015). Como pode ser observado em alguns estudos, o tratamento de quatro semanas com MEL leva a uma atenuação da resistência à insulina, uma melhora das enzimas hepáticas, tais como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), Gama glutamil transferase (GT), fosfatase alcalina, e melhora também no perfil lipídico, que incluem as análises de triglicerídeos e colesterol em portadores de esteatose hepática (Gonciarz et al., 2013). Além disso, a MEL aumentou significativamente a glutathione e atenuou o estresse oxidativo em ratos com esteatose hepática submetidos a uma dieta rica em gordura (Hatzis et al., 2013).

Kozirog et al. (2011) avaliaram que um mês de administração de MEL em pacientes com síndrome metabólica reduziu o IMC, pressão arterial (PA) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, que avalia peroxidação lipídica. Além disso, após 2 meses de tratamento, houve outras melhorias significativas na PA e no estado antioxidante, conforme indicado por uma elevada atividade da CAT e uma diminuição nos níveis de LDL-c (Kozirog et al., 2011).

Trabalho de Zanquetta et al. (2003) verificou que 30 dias de restrição calórica ou suplementação de MEL em ratos pinealectomizados foram acompanhados por aumento do conteúdo de proteína GLUT4 na membrana plasmática do tecido adiposo branco em valores semelhantes aos do grupo controle. Outro estudo, observou que a MEL protege contra o dano oxidativo e restaura a expressão do gene GLUT4 no coração de ratos com hipertireoidismo, estabelecendo a capacidade deste hormônio antioxidante em reverter alterações metabólicas mediadas pelo estresse oxidativo (Ghosh et al., 2007).

Este hormônio produzido pela glândula pineal potencializa a ação da insulina, devido à regulação da expressão de GLUT4 ou desencadeando a via de sinalização da insulina. Assim, induz, via seus receptores de membrana acoplados à

proteína G, a fosforilação do receptor de insulina e de seus substratos intracelulares (Cipolla-Neto et al., 2014). Estudos já demonstraram que os tecidos sensíveis à insulina (tecido adiposo branco, marrom, músculos esqueléticos e cardíacos) de animais pinealectomizados exibem uma redução no RNA mensageiro de GLUT4 (Das, 2005; Ghosh et al., 2007; Srivastava e Krishna, 2010).

Além do exposto, a MEL tem efeitos protetores contra o dano oxidativo ao DNA, uma vez que os níveis elevados de ERO estão entre as principais causas de danos ao DNA, sendo que a proteção exercida pela MEL foi amplamente atribuída à sua capacidade antioxidante (Majidinia et al., 2017). A capacidade da MEL pode ocorrer de forma direta, ou seja, por meio de sua atividade de eliminação de radicais livres e também indiretamente por meio de seus metabólitos (Galano et al., 2016a; Galano et al., 2016b), por estimulação de enzimas antioxidantes (Reiter et al., 2010c) ou pela modulação das vias de reparo de DNA (Majidinia et al., 2017; Sliwinski et al., 2007).

Erenberk et al. (2014) investigaram os efeitos da MEL na prevenção de danos ao DNA associados ao consumo de fenitoína sódica, droga utilizada para convulsões epiléticas que leva à formação de ERO e consequente dano ao DNA. Ao final verificaram que a MEL (e/ou seus metabólitos) reverteu o dano ao DNA induzido por este composto, sendo que esse resultado pode estar diretamente associado à atividade de eliminação de ERO da MEL.

Além disso, a MEL pode prevenir danos ao DNA causados por condições hiperglicêmicas, eliminando o excesso de ERO, uma vez que a administração de 10 mg/kg de MEL ao longo de seis semanas tem efeitos benéficos para ratos diabéticos. Tal tratamento diminuiu os parâmetros de estresse oxidativo, como % de DNA na cauda (*tail intensity*) (Sekkin et al., 2015). Também há evidências de que a MEL tem efeitos protetores contra a genotoxicidade induzida pela ciclofosfamida (Shokrzadeh et al., 2014), um medicamento utilizado na quimioterapia e para suprimir o sistema imunológico. Embora o mecanismo exato de tal proteção não tenha sido totalmente elucidado, ele foi atribuído às capacidades antioxidantes e de eliminação de radicais livres da MEL (Galano et al., 2018).

A MEL também está relacionada com a diminuição de danos ao DNA induzido por estresse oxidativo em espermatozoides (Espino et al., 2010), óvulos (Liang et al., 2017), pele (Kulms et al., 2002) – através de danos causados por

radiação ultravioleta, contra danos causados por pesticidas (Hsu et al., 2002), no envelhecimento (Damiani et al., 2020) e câncer de pele (Longaretti et al., 2020).

Os efeitos antioxidantes da MEL não se limitam apenas a sua forma circulante, mas também da sua produção intestinal (Ferreira et al., 2019), uma vez que também há a sua produção nas células entero-endócrinas, que pode ser até 400 vezes maior do que a produção pela glândula pineal (Chojnacki et al., 2013).

Diversos estudos já demonstraram o efeito da MEL sobre a microbiota intestinal (Park et al., 2020; Gao et al., 2020; Ly et al., 2020; Song et al., 2020; Zhang et al., 2021), dessa forma, a MEL tem demonstrado um grande efeito protetor do trato gastrointestinal (Ferreira et al., 2020).

Resumidamente, a MEL tem como função ser um eliminador de ERO, sendo que evidências científicas provaram que ela é um antioxidante indireto que executa essa ação por meio de vários mecanismos, tais como: (1) ativação de enzimas antioxidantes, (2) proteção de enzimas antioxidantes do dano oxidativo, (3) estimulação da síntese de glutathiona, (4) aumento das atividades de outros antioxidantes, (5) inibição de enzimas pró-oxidantes através de mecanismos epigenéticos e (6) aumento da eficiência da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, diminuindo assim o vazamento de elétrons e reduzindo a geração de radicais livres (Reiter et al., 2003; Reiter et al., 2016). Como resultado dessas múltiplas ações, a MEL previne e/ou repara o dano ao DNA em resposta ao estresse oxidativo (Majidinia et al., 2017).

1.4 JUSTIFICATIVA

A obesidade é um problema de saúde pública e a cada ano o número de pessoas obesas, sejam crianças ou adultos, vem aumentando em todo o mundo devido ao acesso a alimentos altamente processados, ricos em corantes, açúcares e sódio, conhecido como *fast food*. Devido aos inúmeros problemas de saúde acarretados por esta patologia, tais como doenças cardiovasculares, esteatose hepática, diabetes entre outros, a MEL encaixa-se neste cenário por possuir propriedades antioxidantes capazes de reverter as alterações ocasionadas pela obesidade em nível molecular. Porém, não há muitos estudos relacionando os efeitos da MEL sobre a obesidade em nível de dano ao DNA. Sendo assim, ressalta-se a

importância de realizar um estudo que avalie os efeitos da MEL em nível de danos em DNA, além de alterações moleculares, bioquímicas e perfil inflamatório na obesidade.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de MEL sobre parâmetros genotóxicos, bioquímicos e perfil inflamatório em camundongos alimentados com uma dieta cafeteria (CAF).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Investigar se a CAF altera consumo alimentar e peso corporal e se a MEL é capaz de reverter estes efeitos;
- 2) Avaliar o perfil lipídico, hepático e a resposta glicêmica em sangue de camundongos machos que receberam CAF e/ou MEL;
- 3) Avaliar parâmetros de estresse oxidativo em fígado de camundongos que receberam a CAF e/ou MEL;
- 4) Analisar se a CAF altera parâmetros de genotoxicidade em sangue periférico, rim e fígado, e mutagenicidade em medula óssea dos camundongos e se a suplementação de MEL é capaz de reverter estas alterações;
- 5) Avaliar o índice de adiposidade corporal dos camundongos submetidos à CAF e os efeitos da suplementação com MEL nestes animais;
- 6) Avaliar perfil inflamatório, TNF- α e IL-10, nos camundongos submetidos à CAF e/ou suplementados com MEL;
- 7) Avaliar os níveis proteicos de APE-1, OGG1 e NRF2 em fígado e GLUT4 em tecido adiposo branco de camundongos alimentados com a CAF e/ou suplementados com MEL.
- 8) Investigar através de ensaios *in silico*, utilizando ferramentas de biologia de sistemas, a ação da MEL no processo de reparo do DNA na obesidade e quais proteínas estão envolvidas nessa via.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CRITÉRIOS ÉTICOS

Foram utilizados 60 camundongos machos Swiss (20 - 30g), com 30 dias de idade. Os animais foram obtidos do Centro de Experimentação (CEA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e alojados em caixas de polietileno, com comida e água *ad libitum* e mantidos em um ciclo de 12 horas luz-escuro (a luz é ligada às 7h da manhã), com temperatura ambiente controlada de 22±1°C.

3.1.1 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (protocolo número 0004/2018-2), conforme Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008 da cidade de Criciúma – SC. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), lei Arouca nº11.794/2008. Cuidados foram tomados de modo a evitar o mínimo de desconforto e sofrimento para os animais.

3.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DA MELATONINA

O preparo da solução de MEL (Sigma Aldrich, Brasil) foi feito no escuro e foi ofertada aos animais em uma concentração de 2 mg/L para animais, diluído em etanol absoluto em uma concentração final de 0,04% (Anisimov et al., 2003). A solução de MEL foi colocada em garrafas de água protegidas da luz que foram trocadas por uma solução fresca duas vezes por semana (Corrales et al., 2014), nas segundas e sextas-feiras. É importante ressaltar que a MEL não alterou as propriedades organolépticas da água ofertada aos animais, uma vez que um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa avaliou o efeito da suplementação de MEL em camundongos durante o processo de envelhecimento (21 meses de suplementação) o consumo de líquidos se mostrou constante durante todo o período experimental (Damiani et al., 2020).

3.3 MODELO DE INDUÇÃO DE OBESIDADE

3.3.1 Dieta Cafeteria

A dieta cafeteria (CAF) é altamente palatável, com alto teor calórico e glicídico e foi escolhida devido à sua semelhança com os padrões modernos de consumo alimentar humano e devido a sua trajetória de sucesso na indução de obesidade em animais magros (Estadella et al., 2004; Kumar et al., 2011). A CAF foi adaptada a partir de uma dieta previamente descrita por Shafat et al. (2009) e foi composta de alimentos como *wafer*, bolachas de chocolate, mortadela, salsichas, salgadinhos de queijo, bacon e Doritos®, paçoca de amendoim, geleia de abóbora com coco (sobre o pão), chocolate ao leite, doce leite (sobre o pão), pão, bolacha salgada, barrinha de cereal e bolo. O fornecimento de alimentos de ambas as dietas, Dieta Padrão (DP) e CAF foi renovado nas segundas, quartas e sextas-feiras até complementarem as 21 semanas de experimento. Os animais que receberam a CAF também tiveram acesso a DP, composta apenas pela ração padrão proveniente do CEA da UNESC. O cardápio semanal da dieta CAF está apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Cardápio semanal dos animais que foram alimentados com dieta cafeteria.

Dias da semana	Alimentos
Segunda-feira e terça-feira	Geleia de coco e abóbora, goma, salsicha, bolo, pão, salgadinho de bacon, <i>marshmallow</i> e biscoito amanteigado.
Quarta-feira e quinta-feira	Doce de leite, goma, goiabada, <i>wafer</i> de morango, Mortadela, pão, salgadinho de queijo, barrinha de cereal.
Sexta-feira, sábado e domingo	Bolacha recheada, geleia de coco e abóbora, paçoca, bolacha salgada, Salgadinho de queijo nacho, <i>marshmallow</i> , chocolate ao leite, pão e salgadinho de bacon.

A composição de cada dieta, CAF e padrão, está descrita na tabela 2 e os cálculos dos macronutrientes foram calculados de acordo com as informações fornecidas pelos fabricantes a partir dos rótulos das embalagens dos alimentos industrializados que constituíram a CAF e também da ração padrão.

Tabela 2. Composição das dietas.

	Dieta padrão		Dieta cafeteria	
	(3,36 kcal/g)		(3,83 kcal/g)	
	g/100g	kcal/100g	g/100g	kcal/100g
Proteínas	22	88	6	24
Carboidratos	53	212	65	260
Gordura	4	36	11	99

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenho experimental consistiu em 21 semanas totais de experimento, sendo composto por 6 grupos experimentais com 10 ou 20 animais (figura 2).

Os grupos são: grupo DP: 10 animais que foram alimentados com dieta padrão nas 21 semanas experimentais; grupo DP + MEL: 10 animais que foram alimentados com dieta padrão e consumo de MEL na água de beber durante as 21 semanas; grupo CAF: 10 animais que foram alimentados com dieta cafeteria nas 21 semanas, grupo CAF + MEL: 10 animais que consumiram dieta cafeteria durante as 21 semanas de experimento com a suplementação de MEL disponibilizada na água de beber desses animais; grupo CAF / CAF + MEL – 10 animais que consumiram a dieta cafeteria durante 21 semanas e foram suplementados com MEL nas últimas 4 semanas; grupo CAF + MEL / CAF – 10 animais que consumiram dieta cafeteria durante 21 semanas e foram suplementados com MELs nas primeiras 17 semanas e pararam o consumo nas últimas 4 semanas experimentais.

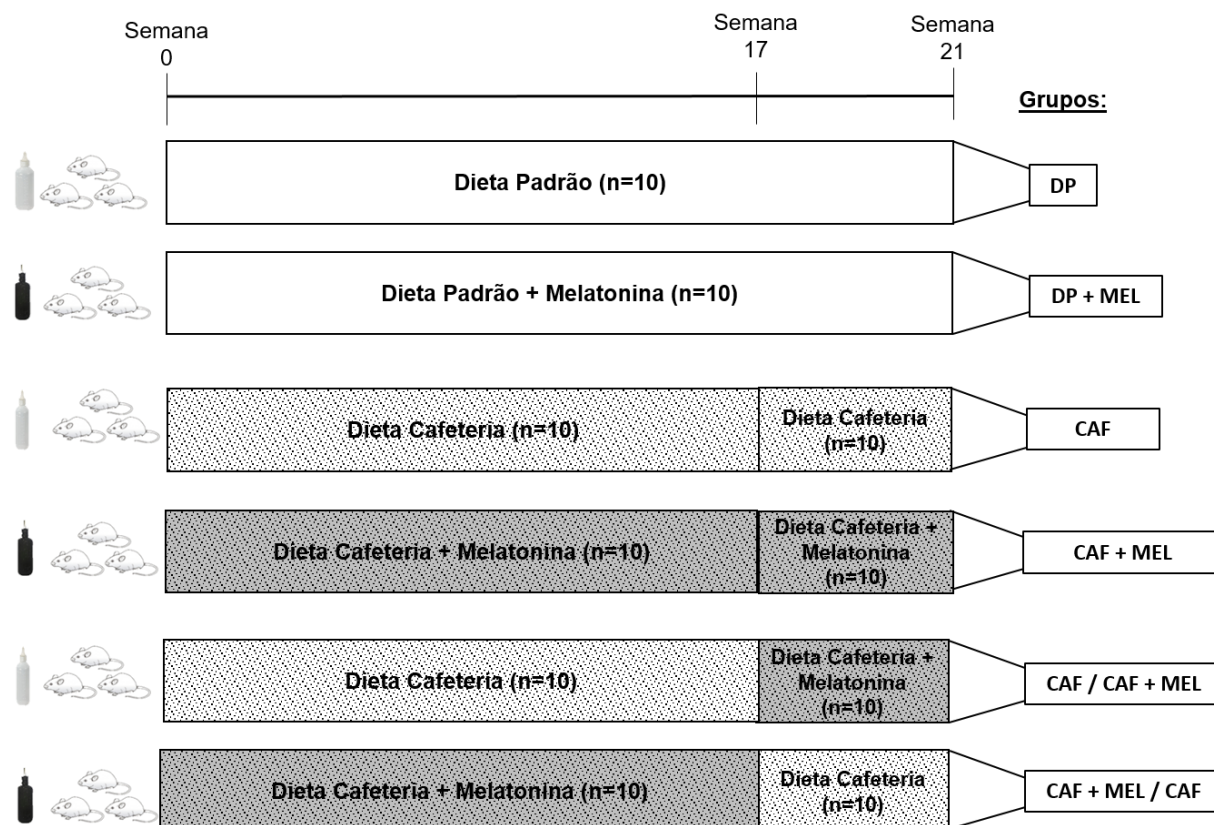


Figura 2. Desenho experimental. DP: Dieta Padrão. CAF: Dieta Cafeteria. MEL: Melatonina.

No grupo CAF / CAF + MEL objetivou-se avaliar se a suplementação de quatro semanas de MEL seria eficaz em reverter as alterações causadas pela dieta cafeteria, já no grupo CAF + MEL / CAF o objetivo era avaliar se a descontinuação do consumo de MEL após 17 semanas de suplementação permitiria manter os benefícios nos animais mesmo com a continuação do consumo de alimentos ultraprocessados.

Todos os animais passaram por duas coletas de sangue: a primeira coleta ocorreu na 17ª semana de experimentação, essa amostra foi retirada com o objetivo de dosar a glicemia de jejum, resistência à insulina (ambos através do teste de tolerância à glicose – ITT), verificar danos ao DNA através do Ensaio Cometa (EC), perfil inflamatório, perfil lipídico e hepático. Na 21ª semana do experimento foi realizada a segunda coleta de sangue para as mesmas análises citadas previamente. Após a eutanásia dos animais, retiraram-se cinco tipos de gorduras (epididimal, inguinal, mesentérica, retroperitoneal e perirrenal), fígado, rim e medula óssea. As coletas e os testes estão melhor exemplificados na linha do tempo abaixo (figura 3).

LINHA DO TEMPO

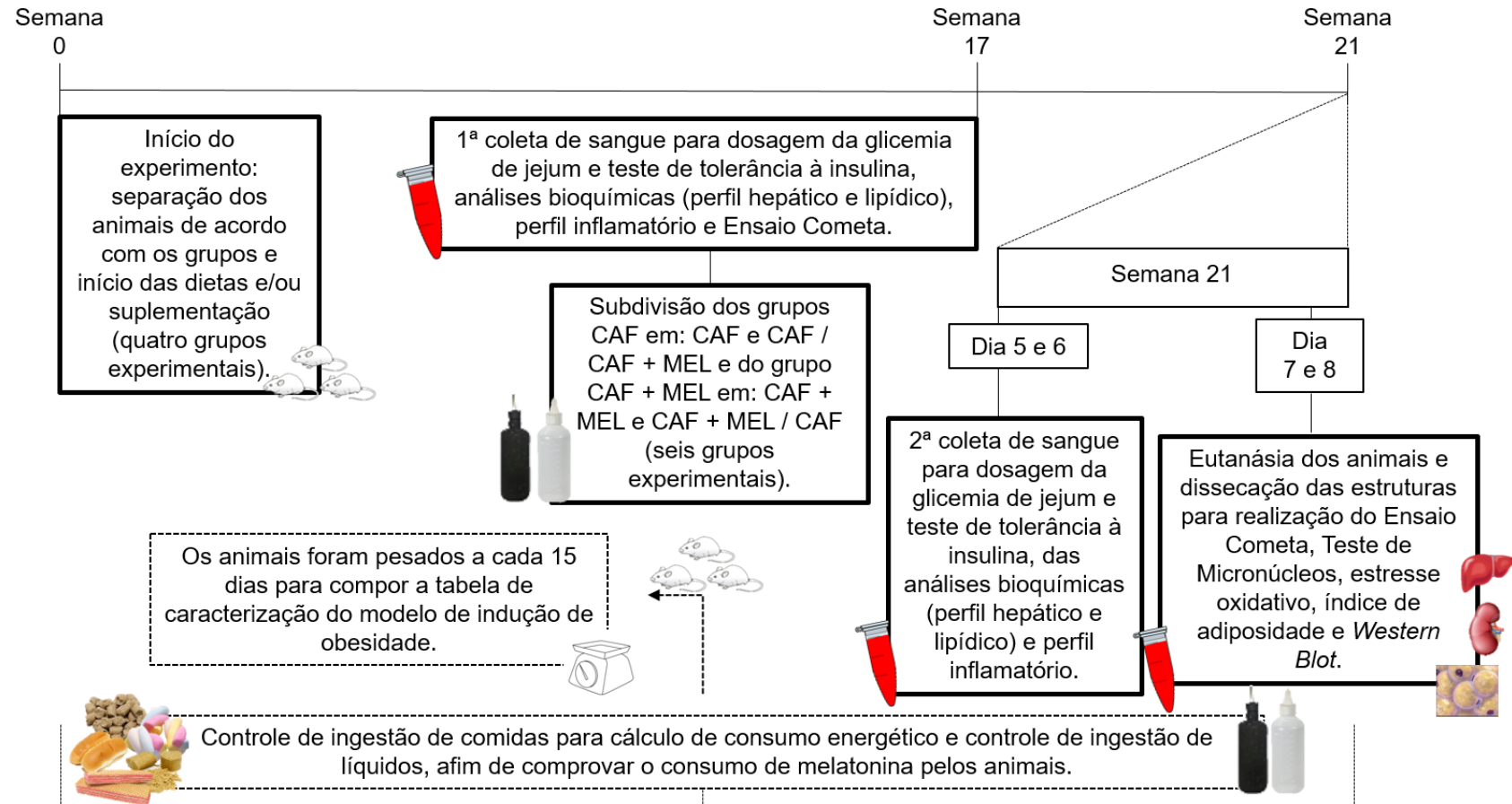


Figura 3: Linha do tempo do experimento.

3.5 CONSUMO ALIMENTAR E GANHO DE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS

Os animais foram pesados a cada 15 dias ao longo de todo o experimento. O consumo alimentar (comida) foi calculado a cada 48 horas, pela pesagem da quantidade total de alimentos (g) fornecida aos animais e subtraindo da quantidade (g) remanescente na gaiola a cada troca, durante todo o período experimental. Com base na ingestão de alimentos e na quantidade correspondente de energia, os seguintes parâmetros foram calculados: consumo total energético (kcal/dia) = média do consumo alimentar/calorias da dieta por dia e eficiência energética (g/kcal) = média do ganho de peso corporal/média do consumo energético (Diniz et al., 2004; Diniz et al., 2005).

3.6 CONSUMO DE LÍQUIDOS

O consumo de líquidos foi realizado através da quantidade (mL) ofertada nas mamadeiras dos grupos experimentais subtraindo da quantidade remanescente (mL). Os líquidos foram trocados duas vezes na semana, dessa forma, foi possível calcular a média da ingestão de líquidos por grupo.

3.6.1 Cálculo do consumo de melatonina

O consumo de MEL (mg/dia) foi realizado através média diária da ingestão de líquidos (mL) por animal multiplicado por 2 mg (quantidade de MEL diluída na água) e dividido por 1000 mL (quantidade de água que é diluído 2 mg de MEL).

3.7 GLICEMIA DE JEJUM E TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA

Os alimentos foram retirados seis horas antes do teste e a primeira coleta de sangue foi equivalente ao tempo zero do teste. Após isso, a insulina (2 U/Kg de peso corporal) foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue foram coletadas pela veia caudal dos animais nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, para a determinação da glicose sérica através de glicosímetro. A velocidade constante do decaimento da glicose (Kitt) foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da

concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear. Esse teste foi realizado para comprovação da instalação da resistência à insulina nos camundongos (Wajchenberg et al.,1999).

3.8 PERFIL LIPÍDICO E HEPÁTICO

Com o intuito de avaliar se o consumo da dieta cafeteria leva a alterações em perfil lipídico foi avaliado triglicerídeos, colesterol total e HDL-c e hepático através da AST e ALT no soro dos animais.

Os testes foram realizados através dos kits para dosagem de triglicerídeos, colesterol total, HDL-c, AST e ALT (Dialab) de acordo com as especificações do fabricante. A partir dos valores obtidos pelas absorbâncias pelo espectrofotômetro foi calculado o perfil lipídico através do cálculo: absorbância do teste/absorbância padrão x 200.

A partir dos resultados obtidos do colesterol total e do HDL-c, foi realizado o Índice de Castelli I, através da fórmula colesterol total (mg/dL)/ HDL (mg/dL) (Castelli, 1988).

3.9 ÍNDICE DE ADIPOSIDADE CORPORAL

Para avaliar o índice de adiposidade dos animais, foram extraídos os tecidos adiposos epididimal, mesentérico, retroperitoneal e perirrenal (grama de gordura/grama peso corporal x 100) (Luciano, 2018).

3.10 PERFIL INFLAMATÓRIO

Os níveis de TNF- α e IL-10 no soro e fígado coletados nos grupos de tratamento foram quantificados por Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) usando um kit comercial apropriado (ThermoFisher, Life Sciences, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os limites de detecção de cada citocina foram IL-10, 2,5-800 pg/mL com sensibilidade de 1,8 pg/mL e TNF- α , 2-700 pg/mL com sensibilidade de 1 pg/mL.

3.11 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo foi realizado em fígado e os seguintes testes foram feitos: medida de oxidação de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH), medida de sulfidrilas totais, atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) e a atividade da glutatona (GSH).

3.11.1 – Conteúdo de proteínas

O teor de proteína a partir do homogeneizado de fígado foi feito utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com Lowry (1951). Reagente fosfomolibdicofosfotúngstico (Folin fenol) foi adicionado para ligar-se à proteína. Absorbância foi lida a 750 nm.

3.11.2 – Produção de oxidantes

3.11.2.1 – Diclorofluoresceína DCFHDA

DCFH é uma técnica bastante empregada como meio de detecção da produção de espécies reativas de oxigênio. A oxidação do DCFH pelas células causa a fluorescência da difluoresceína que pode facilmente ser lida em espectrofotômetro. Neste ensaio, 100 µL de água e 75 µL de DCFH-DA foram adicionados a 25 µL de homogeneizado de amostra (fígado), homogeneizados em vórtex e levados ao banho-maria 37°C ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. Separadamente, foi preparada a curva de calibração onde utilizou-se como padrão o DCF 0,1 µM diluído em tampão fosfato/EDTA em pH 7,4 em diferentes concentrações. Tanto as amostras quanto a curva de calibração foram processadas em duplicata e ao abrigo da luz. Ao final dos trinta minutos foram feitas as leituras no espectrofotômetro (525 nm excitação e 488 nm de emissão). Os resultados estão expressos em nmol de DCF por mg de proteínas (Wang e Joseph, 1999).

3.11.3 – Marcador de dano oxidativo

3.11.3.1 – Conteúdo de Sulfidril

Para determinar grupamentos tióis totais na amostra foi utilizado o reagente de cor (DTNB), que reduziu os grupos tióis gerados, formando um derivado amarelo (TNB), que foi mensurado espectrofotometricamente em um aparelho spectramax à 412 nm (Aksenov e Markesbery, 2001).

3.11.4 – Defesas antioxidantes

3.11.4.1 – Superóxido Dismutase (SOD)

Foi medida pela inibição da oxidação da adrenalina em meio básico seguindo o protocolo de Bannister e Calabrese (1987) com modificações. As amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão de glicina. Volumes de 5, 10 e 15 µL foram retiradas do homogeneizado e pipetado em diferentes poços, adicionando 5 µL de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada) em cada poço e tampão de glicina 175–185 µL (0,75 g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2) nos respectivos poços, uma leitura pontual foi feita para desconto do branco. Logo após, 5 µL de adrenalina (60 mM em água destilada +15 µL/mL de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180 segundos em intervalos de 10 segundos e medido em leitor de ELISA a 480 nm. Os valores estão expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/MG de proteína).

3.11.4.2 – Glutathione (GSH)

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurada no homogeneizado de fígado após precipitação de proteína com 1 mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 µM DTNB. A absorbância foi lida a 412 nm depois de 10 minutos. Uma curva padrão de glutathione reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras.

3.12 ENSAIO DE GENOTOXICIDADE

3.12.1 Ensaio Cometa

Para realização do EC foram utilizados sangue periférico, fígado e rim dos camundongos.

O EC com sangue periférico foi avaliado em dois momentos: na subdivisão dos grupos (17^a semana) e ao final do experimento (21^a semana).

O EC foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000). O sangue foi coletado e colocado em microtubos heparinizados e refrigerados, e o fígado e rim foram armazenados em microtubos contendo tampão *Merchant*, sendo posteriormente homogeneizados com uma seringa. As células de sangue (alíquotas de 5µL), fígado e rim (alíquotas de 10 µL) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 115 µL ou 110 µL, respectivamente) e a mistura foi adicionada a uma lâmina de microscopia pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1%), foram cobertas posteriormente com uma lamínula e levando, então, à geladeira por 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 2 semanas.

Após este período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para o desenovelamento do DNA e a corrida eletroforética, realizou-se no mesmo tampão nas seguintes condições: a 30V e 300mA por 35 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta, fraca e amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com 10 mg/mL de solução de *Sybrgold* (Invitrogen, USA) para posterior análise em microscópio de fluorescência com aumento de 400x. Foi realizada avaliação de 100 células por indivíduo e por tecido (50 células em cada lâmina duplicada). Tais células foram avaliadas pelo *software CometAssay IV* e o parâmetro utilizado foi o *tail intensity*.

As diretrizes internacionais e recomendações para o EC consideram que o escore visual de 100 cometas é um método de avaliação bem validado (Collins et al., 1997). Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese

a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

3.12.2 Teste de Micronúcleos (MN)

O teste de micronúcleos foi realizado de acordo com o programa Gene-Tox da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (Mavournin et al., 1990; Krishna e Hayashi, 2000).

Após a extração da medula óssea, um esfregaço foi preparado diretamente na lâmina com uma gota de soro bovino fetal. As lâminas foram coradas com Giemsa 5%, secas e codificadas para análises às cegas.

Como uma medida de toxicidade na medula óssea, a relação entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) foi analisada em 200 eritrócitos/animal.

A incidência de micronúcleos (MN) foi observada em 2000 EPCs (ou seja, 1000 a partir de cada uma das duas lâminas preparadas em duplicata), usando microscópio óptico de luz branca com ampliação de 1000x. O número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) individual foi utilizado como unidade experimental.

O percentual de redução da frequência de EPCMn foi calculado de acordo com Manoharan e Banerjee (1985) e Waters et al. (1990) usando a seguinte fórmula: $\text{redução (\%)} = \frac{\text{frequência de MN em A} - \text{frequência de MN em B}}{\text{frequência de MN em A} - \text{frequência de MN em C}} \times 100$, onde A é o grupo CAF (controle positivo), B o grupo suplementado com melatonina (CAF + MEL, CAF / CAF + MEL ou CAF + MEL / CAF) e C o grupo DP (controle negativo).

3.13 NÍVEIS DE PROTEÍNAS POR *WESTERN BLOTTING*

A quantificação das proteínas APE1, OGG1 e NRF2 foram mensuradas por *Western blotting* no fígado e GLUT4 em tecido adiposo branco (mesentérico e inguinal). Após a coleta, o fígado e as gorduras foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, armazenado em -80°, e então homogeneizados em tampão de lise (135mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2.7 mM KCl, 20 mM Tris base [pH 8], 1% Triton, 10% Glicerol, 10.27 mM Na₃VO₃, 3.5 mM PMSF, 1 μM aprotinina, 10 mM Na₄P₂O₇). O

lisado foi centrifugado por 10 minutos (4°C) a 15000 rpm. Uma alíquota do sobrenadante de cada amostra foi utilizada para determinar a concentração de proteína pelo método Lowry (Lowry, 1951). O restante do sobrenadante foi diluído 1:1 em Laemmli Sample Buffer 2x (Biorad cat.1610737), aquecido em banho maria a 95°C por 5 min e imediatamente resfriado em gelo e armazenado em -20°C. Para a técnica de eletroforese, foram pipetados 50 µg de proteína em gel de dodecil sulfato de sódipoliacrilamida (SDS-PAGE). A corrida foi realizada a 60V por 45 minutos e 110 V por aproximadamente 2 horas em tampão de corrida (Tris base 25 mM, glicina 192 mM e SDS 3.4 mM). Para comparação de alturas moleculares, foi utilizado um peso molecular de proteínas coradas (Precision Plus Protein Dual Color Standards, BioRad cat.1610374). Posteriormente, a transferência das amostras foi feita do gel para membrana de Difluoreto de Polivinilideno (PVDF) (BioRad cat.1620177), em tampão de transferência (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, 20% metanol [CH₃OH]) a 120V por 1h30 min., resfriado constantemente em gelo. O bloqueio de ligações inespecíficas das membranas foi realizado *overnight* com tampão bloqueio (albumina bovina - BSA 3% diluído em tampão de lavagem). Para o processo de revelação, as membranas foram incubadas com anticorpos primários a 4°C *overnight* em agitação e posteriormente lavadas com tampão de lavagem (Tris base 50 mM, NaCl 15 mM, 42 Nonidex P-40 500µL e Tween-20 500µL) três vezes de 5 min. Após, foram incubadas com anticorpo secundário (com peroxidase conjugada) por 1h em temperatura ambiente e agitação, e novamente lavadas três vezes de 5 min com tampão lavagem. As membranas foram então incubadas em temperatura ambiente por 3 min com reagente contendo peroxidase quimioluminescente (Clarity Western ECL Substrate, BioRad cat.170-5061), e então expostas a foto documentadora (Gel Doc XR+System – Bio-rad Laboratories®). Após a exposição, as membranas foram analisadas e quantificados através de um densitômetro de imagem (ImageJ, National Institutes of Health). Os valores (expressos pela razão do conteúdo da proteína endógena) foram obtidos dividindo os valores da proteína de interesse pela respectiva β -actina (47kDa – Cell Signaling cat.4967).

3.14 ANÁLISE DA BIOLOGIA DE SISTEMAS

A modelagem computacional de sistemas moleculares e a interpretação integrativa de conjuntos de dados cada vez maiores, são aceitos como componentes úteis, e talvez até necessários da pesquisa biológica (Serrano, 2007; Westerhoff et al., 2009).

As redes biológicas são formadas por nós e conectores (Figura 4). Os nós são representados por indivíduos, proteínas ou lugares, por exemplo. Os conectores têm como função conectar os nós uns aos outros. Eles podem ser interações químicas, físicas ou funcionais. Os agrupamentos de nós são chamados *clusters*. Já os *hubs* são proteínas que possuem muitas interações, ou seja, possuem grande quantidade de conexões (Feltres et al., 2014).

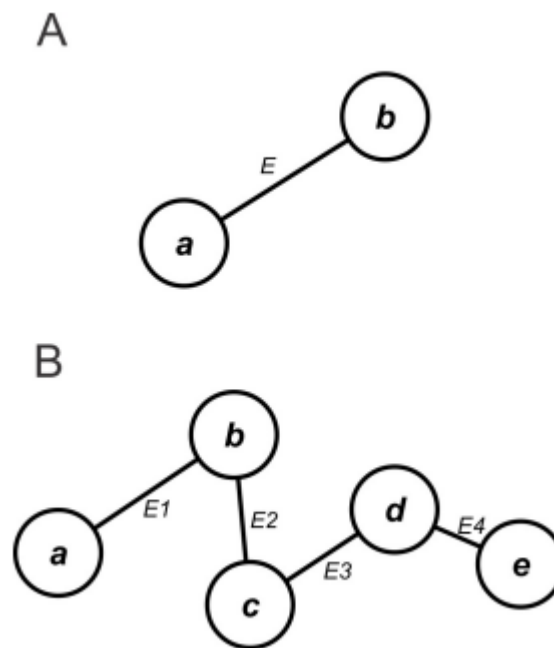


Figura 4: Exemplo de uma rede biológica: (A) interação entre dois nós vizinhos, “a” e “b” que estão conectados pelo conector E. (B) interação entre cinco nós, “a, b, c, e” que estão conectados pelos conectores “E1, E2, E3 e E4” (Feltres et al., 2014).

Os estudos das redes de interação desempenham um papel importante em uma ampla variedade de disciplinas, desde ciência da computação, sociologia, engenharia e física, até biologia molecular e populacional. Dentro dos campos da biologia e da medicina, as potenciais aplicações de análise de rede incluem, por exemplo, identificação de alvos de drogas, determinação de funções de proteínas e genes, concepção de estratégias eficazes para o tratamento de várias doenças ou fornecendo diagnóstico precoce de distúrbios. Redes de interação proteína-proteína,

redes bioquímicas, redes de regulação transcricional, transdução de sinal ou redes metabólicas destacam-se na biologia de sistemas, muitas vezes compartilhando características e propriedades (Pavlopoulos et al., 2011).

3.14.1 Construção da rede de interações

Uma rede de interação envolvendo proteínas relacionadas à obesidade e à MEL foi construída com o objetivo de compreender a ação deste hormônio nessa condição fisiológica. Para isto, ferramentas de pesquisas online foram utilizadas, sendo o STRING 11.5 [<http://string-db.org/>] utilizado para pesquisar as interações entre proteínas-proteínas (Kuhn et al., 2008; Snel, 2000; Szklarczyk et al., 2017) e o STITCH 5.0 [<http://stitch.embl.de/>] foi utilizado buscar as interações químico-proteicas (Szklarczyk et al., 2016) tendo como organismo modelo *Mus musculus*. Inicialmente proteínas envolvidas com a obesidade e a MEL foram prospectadas no STRING 11.5, uma vez que essa ferramenta prediz interações proteicas que podem estar associadas de forma direta (fisicamente) e indireta (funcionalmente) (Snel, 2000). No STRING 11.5 as interações do tipo proteína-proteína foram importadas utilizando os parâmetros: não mais que 150 interações, médium confidence score (0.400), e network depth igual a 2; todos os métodos de predição ativos exceto text mining, neighborhood, gene fusion e co-occurrence. As sub-redes formadas no STITCH 5.0 foram importadas utilizando os seguintes parâmetros: não mais que 50 interações, medium confidence score (0.400); e network depth igual a 2; métodos de predição ativados exceto text mining, neighborhood, gene fusion e co-occurrence. As diferentes sub-redes geradas foram unidas em uma única rede chamada “MEL”, através da ferramenta Advanced Merge Network, do programa Cytoscape 3.8.2 (Shannon et al., 2003).

3.14.2 Análise Topológica

A rede “MEL” foi analisada pelo plug-in Molecular Complex Detection (MCODE) (Bader e Hogue, 2003) do programa Cytoscape 3.8.2 com o intuito de identificar módulos/clusters (regiões da rede densamente conectadas) que sugere complexos proteicos relacionados fisicamente e/ou funcionalmente. Os parâmetros no MCODE para gerar a visualização dos *clusters* foram: *loops included*; *degree cutoff* 2; exclusão

de nós com apenas uma conexão (opção *haircut* ativada); expansão do *cluster* por uma concha vizinha permitido (opção *fluff* ativada); densidade do nó *cutoff* 0.1; score do nó *cutoff* 0.2; *kcore* 2; e profundidade máxima da rede 100. Um score do MCODE foi calculado para cada proteína/composto presente na rede.

3.14.3 Análise de ontologia gênica

Os principais processos associados com os clusters gerados pelo MCODE foram analisados pelo plug-in Biological Network Gene Ontology (BiNGO), do Cytoscape 3.8.2 (Maere et al., 2005). O grau de uma função para um determinado cluster e categoria foi quantitativamente computado (valor de p) por distribuição hipergeométrica, e múltiplos testes de correção foram realizados utilizando o algoritmo de taxa de descoberta falsa (Benjamini e Hochberg, 1995), o qual foi realizado em sua totalidade pelo plug-in BiNGO com um nível de significância de $p < 0,05$.

3.14.4 Análise de centralidade

Análises de centralidade foram realizadas usando o plugin Centiscape 2.1 (Scardoni et al., 2009), do Cytoscape 3.8.2, para identificar quais nós (proteínas/composto) apresentam uma posição central dentro da rede. As centralidades analisadas foram o grau do nó (*node degree*) e *betwenness*. Nós com um valor relativamente alto de grau do nó são determinados *hubs*, e nós com valor de *betwenness* relativamente alto são nomeados de gargalos. *Hubs* são nós altamente conectados, enquanto gargalos são nós com uma grande probabilidade de ligar diferentes clusters (Barabasi e Oltvai, 2004; Yu et al., 2007). Portanto, um nó hub-gargalo (N-HG) pode ser considerado uma chave reguladora de processos biológicos e essenciais para o sucesso da transferência de informação através da rede, onde perturbações nos N-HG podem causar falhas de comunicação dentro da rede.

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como média e desvio padrão da média (média $\pm$ DP) e para as análises do estresse oxidativo foram usados média e erro padrão da

média (média $\pm$ EM). Para a análise estatística a normalidade das variáveis foi analisada através do teste de Bartlett.

Para avaliação do consumo de alimentos, consumo energético e de líquidos foi realizado análise de variância de uma via (ANOVA) com *post hoc* de Tukey quando as variáveis se mostraram paramétricas e Kruskal-Wallis seguido pelo *post hoc* de Dunn para variáveis não-paramétricas.

As análises de glicemia de jejum, teste de tolerância a insulina, perfil lipídico e hepático, índice de Castelli e de adiposidade, ensaio cometa e teste de micronúcleo foi realizado ANOVA de uma via com *post hoc* de Tukey.

No perfil inflamatório foi realizado ANOVA de uma via seguido de *post hoc* de Tukey. Com relação as análises de marcadores de estresse oxidativo, foi realizado ANOVA de uma via com *post hoc* de Tukey para DCF e GSH e Kruskal-Wallis para SOD e sulfidril.

No *Western Blotting*, foi quantificado através do software ImageJ (National Institutes of Health) e depois utilizado ANOVA de uma via, seguido de *post hoc* de Newman-Keuls.

As análises entre os grupos sempre ocorreram dentro do mesmo período de tempo (semana 17 ou semana 21) e a comparação foi realizada entre o grupo CAF em relação ao grupo DP e os grupos suplementados com MEL (CAF + MEL, CAF / CAF + MEL e CAF + MEL / CAF) em relação ao grupo CAF.

Considerou-se para significância estatística os valores de $p < 0,05$. O pacote estatístico utilizado foi o programa *Graph Pad Prism* versão 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 CONSUMO ALIMENTAR, LÍQUIDOS E MELATONINA

No decorrer de todo o experimento o consumo de alimentos foi controlado, afim de calcular o consumo alimentar diário e consumo energético. Além disso, foi controlado também o consumo de líquidos de cada grupo para realizar o cálculo da média do consumo de MEL. Esses dados podem ser observados na tabela 3 abaixo.

Tabela 3: Consumo alimentar (g/dia/camundongo), energético (kcal/dia), de líquidos (mL/dia) e melatonina (mg/dia) dos animais alimentados com ração padrão e/ou dieta cafeteria e suplementados com melatonina. Os valores foram calculados durante as 21 semanas de experimentação.

Semana 17						
	Consumo total em gramas (g/dia/camundongo)			Consumo energético	Consumo de líquidos	Consumo de melatonina
Grupos	DP	CAF	TOTAL	(kcal/dia/camundongo)	(mL/dia)	(mg/dia)
DP	6,22	-	6,22 ± 0,57	22,26 ± 1,88	7,01 ± 1,43	-
DP + MEL	6,30	-	6,30 ± 0,42	22,57 ± 2,35	7,75 ± 1,11	0,019 ± 0,007
CAF	1,31 (22,32%)	4,56 (77,68%)	5,87 ± 0,50 ^a	21,40 ± 2,19	5,58 ± 1,78 ^a	-
CAF + MEL	1,22 (20,96%)	4,60 (79,04%)	5,82 ± 0,53	21,42 ± 2,48	5,34 ± 1,77	0,013 ± 0,008
CAF / CAF + MEL	-	-	-	-	-	-
CAF + MEL / CAF	-	-	-	-	-	-
Semana 21						
	Consumo total em gramas (g/dia/camundongo)			Consumo energético	Consumo de líquidos	Consumo de melatonina
Grupos	DP	CAF	TOTAL	(kcal/dia/camundongo)	(mL/dia)	(mg/dia)
DP	6,12	-	6,12 ± 0,81	21,89 ± 2,63	6,54 ± 1,88	-
DP + MEL	6,78	-	6,78 ± 0,88	22,99 ± 2,59	7,40 ± 0,23	0,016 ± 0,001
CAF	0,92 (17,04%)	4,48 (82,96%)	5,40 ± 0,59	20,31 ± 1,80	3,60 ± 0,47 ^a	-
CAF + MEL	1,31 (21,91%)	4,67 (78,09%)	5,98 ± 0,68	21,86 ± 2,31	5,51 ± 0,98 ^b	0,012 ± 0,004
CAF / CAF + MEL	1,13 (19,45%)	4,68 (80,55%)	5,81 ± 0,66	21,73 ± 2,45	4,44 ± 0,60	0,010 ± 0,002
CAF + MEL / CAF	1,11 (21,22%)	4,12 (78,78%)	5,23 ± 1,75	20,63 ± 6,10	3,34 ± 0,80	-

Os dados da semana 17 compõem a média por grupo das primeiras 17 semanas de experimentação e os resultados da semana 21 compõem a média por grupo das últimas quatro semanas de experimentação. Os quatro parâmetros avaliados estão expostos na tabela acima. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média. Consumo total em gramas e consumo energético semana 17: ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$. Consumo total em gramas e energético semana 21 e consumo de líquidos semana 17 e 21: Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* de Dunn, $p < 0,05$. ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP; ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

Na semana 17 – que compõem a média por grupo das primeiras 17 semanas de experimentação - o grupo CAF apresentou diferença no consumo alimentar, onde os animais consumiram menos alimentos por dia em relação ao grupo DP ($p<0,05$). No parâmetro consumo energético não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos grupos experimentais ($p>0,05$). No que diz respeito ao consumo de líquidos, foi observado que o grupo CAF teve uma menor ingestão de água em relação ao grupo DP ($p<0,05$).

No entanto, na semana 21 – que compõem a média por grupo das últimas quatro semanas de experimentação - não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos parâmetros de consumo alimentar e energético ($p>0,05$). Contudo, foi observado que o consumo de líquidos foi menor no grupo CAF comparado com o grupo DP e CAF + MEL ($p<0,05$).

4.2 PESO CORPORAL

Os animais foram pesados a cada 15 dias durante as 21 semanas experimentais, dessa forma foi possível calcular o ganho de peso corporal dos animais e realizar a média de peso do grupo ao final da semana 17 e 21 (tabela 4).

Tabela 4: Média do peso corporal (g) dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina.

Parâmetros	Grupos					
Semana 17	DP	DP + MEL	CAF	CAF + MEL	CAF / CAF + MEL	CAF + MEL / CAF
Peso corporal (g/camundongo)	32,17 ± 2,65	31,56 ± 3,24	43,27 ± 5,87 ^a	34,89 ± 6,11 ^b	-	-
Semana 21						
Peso corporal (g/camundongo)	40,30 ± 4,19	39,77 ± 3,71	51,36 ± 7,67 ^a	39,81 ± 6,02 ^b	49,22 ± 5,64	50,16 ± 13,86

Os dados da semana 17 compõem a média do peso dos animais das primeiras 17 semanas de experimentação e os resultados da semana 21 compõem a média do peso dos animais das últimas quatro semanas de experimentação. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média (Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* de Dunn, $p < 0,05$). ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP; ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

De acordo com o exposto na tabela acima, pode-se observar que na semana 17 e na semana 21 os resultados encontrados foram semelhantes, onde o grupo CAF, que foi alimentado com alimentos industrializados durante as 17 ou 21 semanas, teve aumento de peso corporal em relação ao grupo DP e CAF + MEL ($p < 0,05$). Com relação aos demais grupos experimentais, não foram observadas diferenças significativas no parâmetro de peso corporal ($p > 0,05$).

4.3 GLICEMIA DE JEJUM E TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA

Foi realizado glicemia de jejum e o ITT com o objetivo de avaliar a resposta glicêmica dos diferentes grupos experimentais. Dessa forma, na tabela 5 estão expostos os resultados de glicemia de jejum e na figura 5 os resultados referentes ao ITT na semana 17 (figura 5A) e na semana 21 (figura 5B) e a ASC (figura 5C).

Tabela 5: Glicemia de jejum (mg/dL) dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina na semana 17 e 21.

Parâmetros	Grupos					
Semana 17	DP	DP + MEL	CAF	CAF + MEL	CAF / CAF + MEL	CAF + MEL / CAF
Glicemia de jejum (mg/dL)	144,80 ± 6,34	126,40 ± 13,07	165,80 ± 15,75 ^a	137,00 ± 12,06 ^b	-	-
Semana 21						
Glicemia de jejum (mg/dL)	122,80 ± 17,33	76,33 ± 11,00	159,20 ± 18,05 ^a	121,20 ± 15,02 ^b	147,70 ± 25,70	146,60 ± 22,15

Os dados da semana 17 compõem a média da glicemia de jejum de cada grupo das primeiras 17 semanas de experimentação e os resultados da semana 21 compõem a média da glicemia de jejum de cada grupo das últimas quatro semanas de experimentação. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média (ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$). ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP; ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

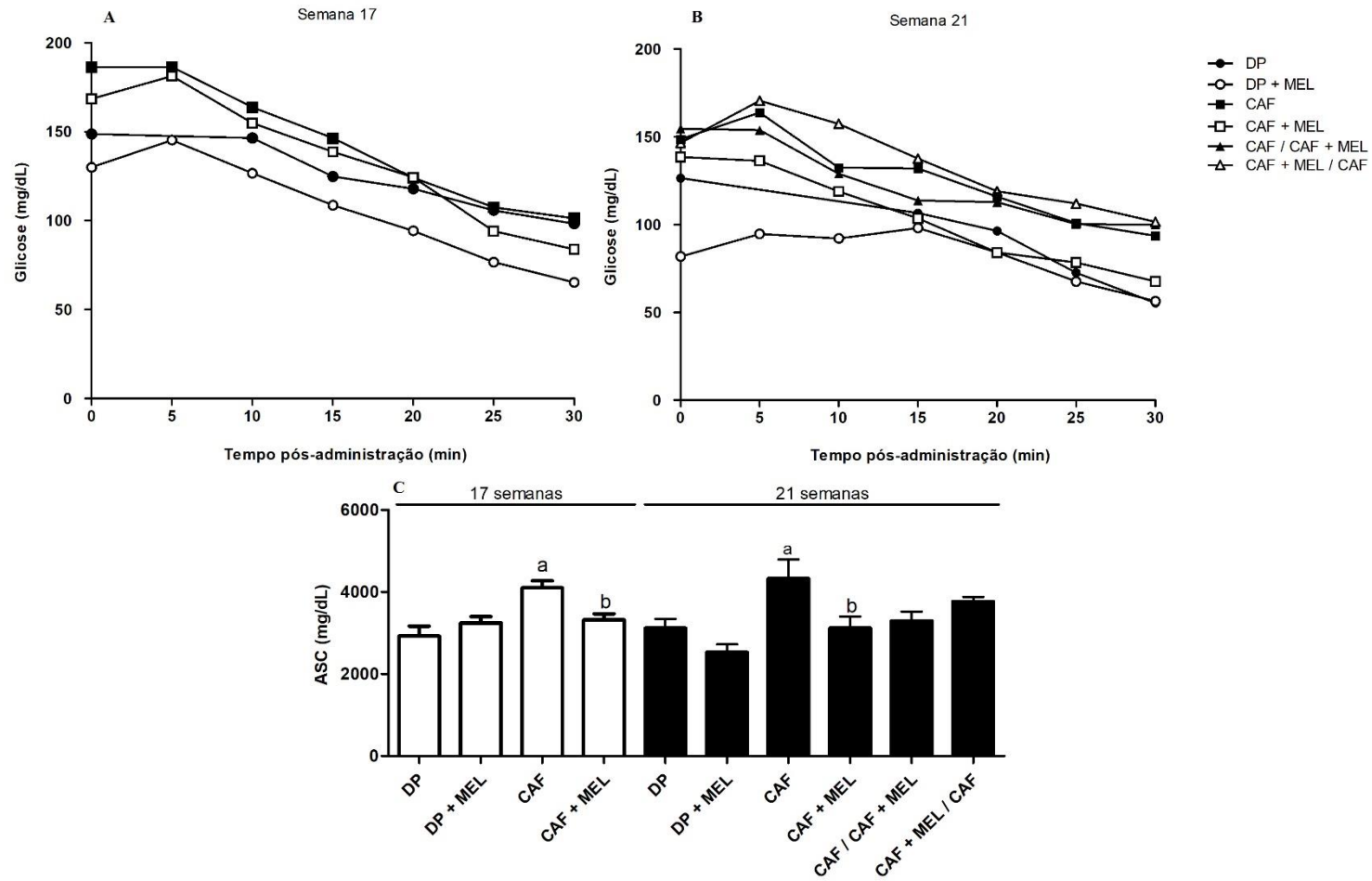


Figura 5: Teste de tolerância à insulina e área sob a curva (ASC) dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina na semana 17 (A) e 21 (B). As diferenças significativas são elucidadas na figura 5C área sob a curva (ASC) do Teste de Tolerância à Insulina (ITT). ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP; ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

Na tabela 5, pode-se observar que os valores da glicemia de jejum foram maiores no grupo alimentado com CAF em relação ao grupo que se alimentou apenas com DP ($p < 0,05$) tanto na semana 17 quanto na semana 21. Além disso, o grupo CAF + MEL foi estatisticamente diferente do grupo CAF, apresentando uma glicemia de jejum menor, nos dois períodos analisados ($p < 0,05$). No entanto na semana 21, essas diferenças não foram observadas nos grupos CAF / CAF + MEL e CAF + MEL / CAF ($p > 0,05$).

Já na figura 5 pode-se observar que o decaimento da glicemia, após administração de insulina, foi maior nos grupos suplementados com MEL durante todo o período experimental (DP + MEL e CAF + MEL), avaliados na semana 17 e 21. Já nos outros grupos avaliados na semana 21, houve um decaimento da glicose sanguínea, porém não diferiram do seu grupo controle, CAF.

A figura 5C demonstra os resultados do ITT, onde o grupo CAF teve um aumento da glicemia durante todo o experimento, avaliado tanto na semana 17 quanto na 21, dessa forma, pode-se aferir que os animais alimentados com CAF se tornaram resistentes à insulina. Já o grupo que se alimentou com CAF e recebeu a MEL na água de beber durante as 21 semanas (CAF + MEL) teve uma reversão do quadro de resistência insulínica sistêmica, quando comparado com o seu controle (CAF) ($p < 0,05$). Os demais grupos que receberam MEL não tiveram diferença significativa neste parâmetro avaliado ($p > 0,05$), porém pode-se observar no gráfico que há uma tendência na diminuição da glicemia.

4.4 PERFIL LÍPIDICO E HEPÁTICO

4.4.1 Perfil lipídico

Com o objetivo de avaliar se a CAF altera perfil lipídico foi realizada a análise de triglicerídeos, colesterol total e HDL-c no soro dos animais e calculado o Índice de Castelli I para verificar o fator de risco para doenças cardiovasculares (valores de referência para humanos é de até 4,4 (Brandão et al., 2016)). Os resultados estão demonstrados na tabela 6.

Tabela 6: Perfil lipídico avaliado através do triglicerídeos, colesterol total, HDL-c e índice de Castelli avaliados no soro dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina nas semanas 17 e 21.

Parâmetros	Grupos					
Semana 17						
<u>Perfil lipídico</u>	DP	DP + MEL	CAF	CAF + MEL	CAF / CAF + MEL	CAF + MEL / CAF
Colesterol total	89,25 ± 26,32	94,25 ± 22,72	159,20 ± 22,99 ^a	144,20 ± 8,38	-	-
HDL-c	74,00 ± 15,87	84,00 ± 2,83	72,00 ± 4,47	119,30 ± 10,14 ^b		
Triglicerídeos	103,50 ± 12,92	81,33 ± 19,86	108,40 ± 23,07	54,60 ± 8,29 ^b	-	-
Índice de Castelli I	1,09 ± 0,22	1,13 ± 0,28	2,25 ± 0,70 ^a	1,37 ± 0,32 ^b	-	-
Semana 21						
<u>Perfil lipídico</u>						
Colesterol total	149,80 ± 24,46	95,80 ± 42,11	155,30 ± 38,38	158,30 ± 28,19	161,60 ± 48,32	153,40 ± 53,15
HDL-c	104,20 ± 18,89	94,00 ± 9,85	73,60 ± 13,76 ^a	105,40 ± 10,33 ^b	103,20 ± 12,62 ^b	105,40 ± 15,98 ^b
Triglicerídeos	117,80 ± 9,44	73,00 ± 11,00	161,30 ± 9,64 ^a	56,25 ± 12,82 ^b	110,60 ± 17,66 ^b	129,50 ± 20,04 ^b
Índice de Castelli I	1,11 ± 0,35	0,74 ± 0,14	1,95 ± 0,40 ^a	1,29 ± 0,27 ^b	1,44 ± 0,35	1,50 ± 0,55

Os dados da semana 17 compõem a média de cada grupo das primeiras 17 semanas de experimentação e os resultados da semana 21 compõem a média de cada grupo das últimas quatro semanas de experimentação (n=5). Índice de Castelli I = colesterol total / HDL-c. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média (ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$). ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP; ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; HDL-c: *High Density Lipoproteins cholesterol*; MEL: melatonina.

De acordo com a tabela 6 observa-se que na semana 17, o grupo que recebeu CAF apresentou um aumento significativo no colesterol total em comparação com o grupo DP ($p < 0,05$), no entanto, o grupo suplementado com MEL (CAF + MEL) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo CAF ($p > 0,05$). Nas análises de HDL-c e triglicerídeos o grupo suplementado com MEL apresentou resultados satisfatórios, aumentando de forma significativa o HDL-c e diminuindo os triglicerídeos em comparação ao grupo que recebeu CAF durante essas primeiras 17 semanas (CAF) ($p < 0,05$). Com relação aos demais grupos, não foram observadas diferenças significativas neste período analisado ($p > 0,05$).

Já na semana 21, o grupo CAF apresentou uma diminuição do HDL-c e um aumento dos triglicerídeos quando comparado ao grupo que se alimentou apenas de ração padrão durante todo o período experimental (DP) ($p < 0,05$). Quando avaliado o efeito da MEL sobre estes parâmetros em 21 semanas, observou-se que ela foi capaz de aumentar o HDL-c e diminuir os triglicerídeos dos animais alimentados com CAF em todos os grupos estudados ($p < 0,05$).

No Índice de Castelli I o grupo CAF se mostrou estatisticamente diferente em relação ao grupo DP; já o grupo CAF + MEL apresentou valores significativamente menores em relação ao grupo CAF, tanto na semana 17 quanto na semana 21 ($p < 0,05$). Nos demais grupos não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$).

4.4.2 Perfil hepático

Neste trabalho foi avaliado o perfil hepático (ALT e AST) dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com MEL (tabela 7).

Tabela 7: Perfil hepático avaliado através da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST) no soro dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina, nas semanas 17 e 21.

Parâmetros	Grupos					
Semana 17						
<u>Perfil hepático</u>	DP	DP + MEL	CAF	CAF + MEL	CAF / CAF + MEL	CAF + MEL / CAF
ALT	68,80 ± 20,43	65,60 ± 28,97	130,80 ± 59,37 ^a	66,13 ± 11,24 ^b	-	-
AST	275,00 ± 24,42	195,60 ± 72,97	302,80 ± 73,02	187,10 ± 60,70 ^b	-	-
Semana 21						
<u>Perfil hepático</u>						
ALT	67,00 ± 17,03	79,00 ± 3,56	122,50 ± 32,42 ^a	59,00 ± 6,68 ^b	67,20 ± 21,90 ^b	68,50 ± 35,98 ^b
AST	199,00 ± 68,10	286,60 ± 144,60	422,80 ± 139,20 ^a	183,80 ± 71,31 ^b	244,60 ± 93,67	352,20 ± 73,77

Os dados da semana 17 compõem a média de cada grupo das primeiras 17 semanas de experimentação e os resultados da semana 21 compõem a média de cada grupo das últimas quatro semanas de experimentação (n=5). Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média (ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$). ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP; ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato transaminase; CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

Na semana 17 foi observado que o grupo CAF induziu alterações no perfil hepático dos animais, demonstrado através da ALT, quando comparado com o grupo DP. Além disso, o grupo CAF + MEL foi estatisticamente diferente do grupo alimentado apenas com CAF ($p < 0,05$). Com relação a AST, não foi observada diferença significativa no grupo CAF em relação ao grupo DP, porém, no grupo alimentado com dieta cafeteria e suplementado com melatonina (CAF + MEL) esta foi significativamente menor em relação ao grupo CAF ($p < 0,05$).

Com relação à semana 21, o grupo CAF diferiu significativamente do grupo DP em relação à ALT. Além disso, os grupos CAF + MEL, CAF / CAF + MEL e CAF + MEL / CAF apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo CAF ($p < 0,05$). Em se tratando da AST, foi observado um aumento no grupo CAF quando comparado com o grupo DP, sendo que o grupo CAF + MEL apresentou uma diminuição significativa em relação ao seu controle, CAF ($p < 0,05$). Os demais grupos não apresentaram nenhuma diferença significativa em relação ao grupo CAF ($p > 0,05$), apenas uma tendência de diminuir.

4.5 ÍNDICE DE ADIPOSIDADE CORPORAL

Com o objetivo de avaliar se a CAF aumenta o tecido adiposo dos animais e se a MEL conseguiria reverter este quadro, foi calculado o índice de adiposidade corporal (figura 6) através da pesagem das gorduras epididimal, mesentérica, retroperitoneal e perirrenal.

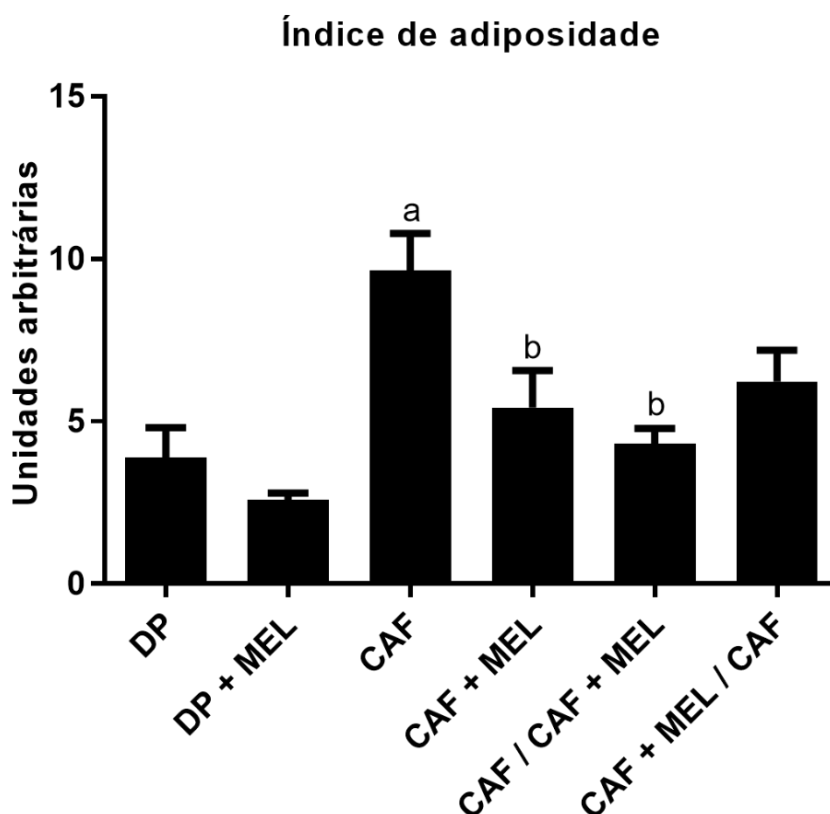


Figura 6: Índice de adiposidade. Efeitos sobre a composição corporal de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina (n=6). Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP; ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

De acordo com os resultados obtidos na figura 6, foi possível constatar que o grupo CAF teve um aumento significativo do tecido adiposo quando comparado ao grupo DP ($p < 0,05$). Com relação a suplementação de MEL, observou-se que o tratamento durante 21 semanas (CAF + MEL) e nas últimas quatro semanas (CAF / CAF + MEL) foram eficazes em reduzir o tecido adiposo dos camundongos alimentados com dieta cafeteria ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas no grupo CAF + MEL / CAF em relação ao grupo CAF ($p > 0,05$).

4.6 PERFIL INFLAMATÓRIO

4.6.1 Citocinas pró e anti-inflamatórias

O perfil inflamatório foi avaliado em soro na semana 17 e 21 (figura 7) e em fígado ao final do experimento na semana 21 (figura 8A e 8B). A citocina pró-inflamatória TNF- α foi avaliada em soro e fígado e a citocina anti-inflamatória IL-10 foi avaliada apenas em fígado. A partir dos resultados obtidos em fígado foi calculado a razão entre TNF- α e IL-10 como um marcador de estado inflamatório (figura 8C).

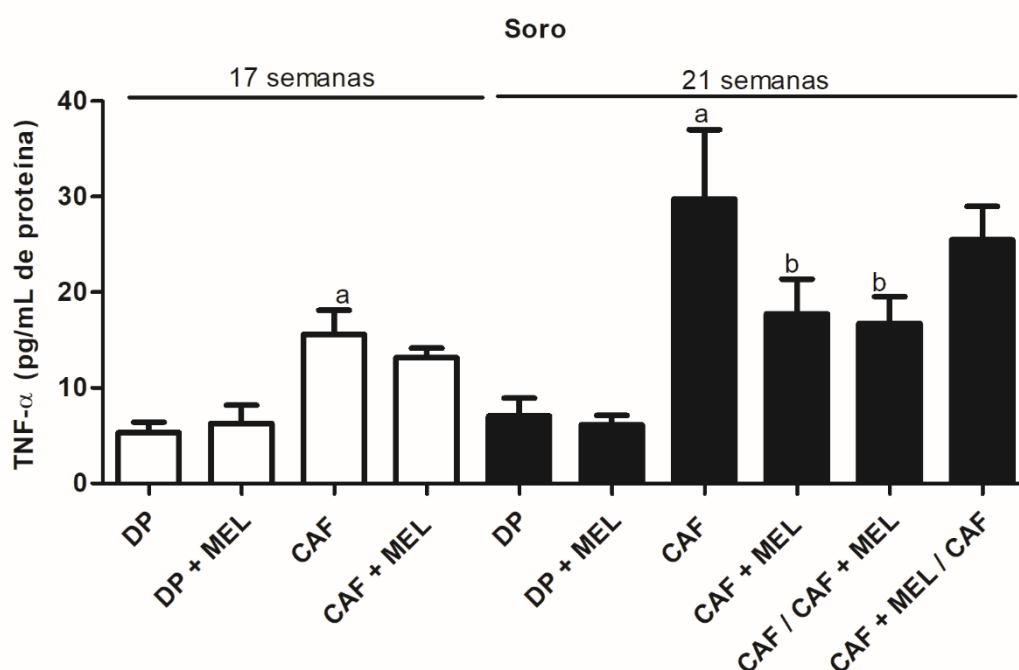


Figura 7: TNF- α em soro de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina avaliadas na semana 17 e 21 (n=5). Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP; ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

O perfil pró-inflamatório avaliado em soro através do TNF- α demonstrou que a CAF induziu um aumento nesta citocina tanto na semana 17 quanto na semana 21, porém a MEL só foi capaz de reverter este aumento na semana 21, nos grupos CAF + MEL e CAF / CAF + MEL ($p < 0,05$).

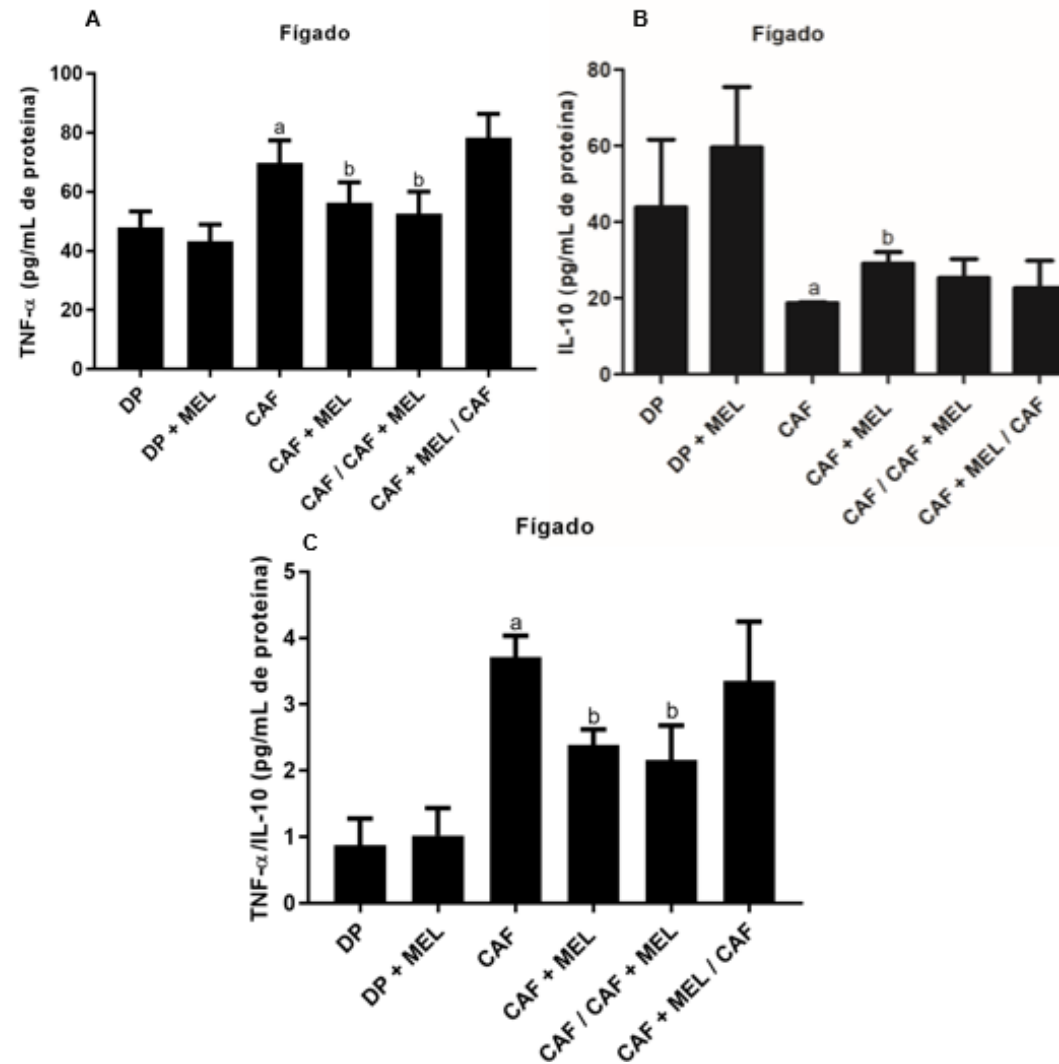


Figura 8: TNF- α (A), IL-10 (B) e razão de TNF- α /IL-10 (C) em fígado de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina (n=5). Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP; ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. (A) ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$. (B) ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey. (C) ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

Em fígado foram observados os mesmos resultados encontrados em soro na semana 21 com relação ao TNF- α , onde o grupo CAF aumentou essa citocina pró-inflamatória e os grupos CAF + MEL e CAF / CAF + MEL diferiram estatisticamente em relação ao seu controle, CAF ($p < 0,05$).

Se tratando da citocina anti-inflamatória IL-10 observou-se uma diminuição desta no fígado do grupo CAF, já a suplementação com MEL durante todo o período experimental (CAF + MEL) aumentou essa citocina ($p < 0,05$) na semana 21.

Com relação a razão entre TNF- α e IL-10 observou-se um aumento significativo no grupo CAF em comparação com o DP e uma diminuição desta razão nos grupos CAF + MEL e CAF / CAF + MEL ($p < 0,05$).

4.7 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

4.7.1 Produção de oxidantes

Com o objetivo de avaliar a produção de oxidantes nos animais alimentados com CAF e/ou suplementados com MEL, para comparação com os seus respectivos grupos controle, foram avaliados os níveis de DCF em fígado (figura 9).

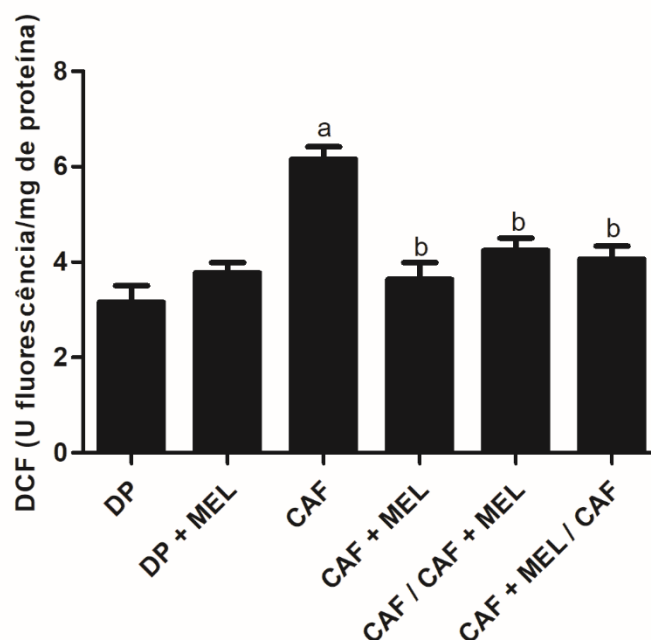


Figura 9: Níveis de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) no fígado de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina (n=6). Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão ($p < 0,05$). ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP; ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

Na figura 9, pode-se observar que houve diferença significativa no grupo CAF em relação ao grupo alimentado apenas com DP ($p < 0,05$). Ademais, os três grupos que receberam suplementação de MEL durante 21 semanas (CAF + MEL), nas quatro últimas semanas (CAF / CAF + MEL) e nas primeiras 17 semanas mas depois pararam com o consumo (CAF + MEL / CAF), tiveram uma diminuição na oxidação do DCF em relação ao seu respectivo grupo controle (CAF) ($p < 0,05$).

4.7.2 Marcador de dano oxidativo

O presente trabalho avaliou o dano oxidativo através do conteúdo de grupamentos sulfidrila (figura 10) no fígado dos animais submetidos ao modelo de obesidade.

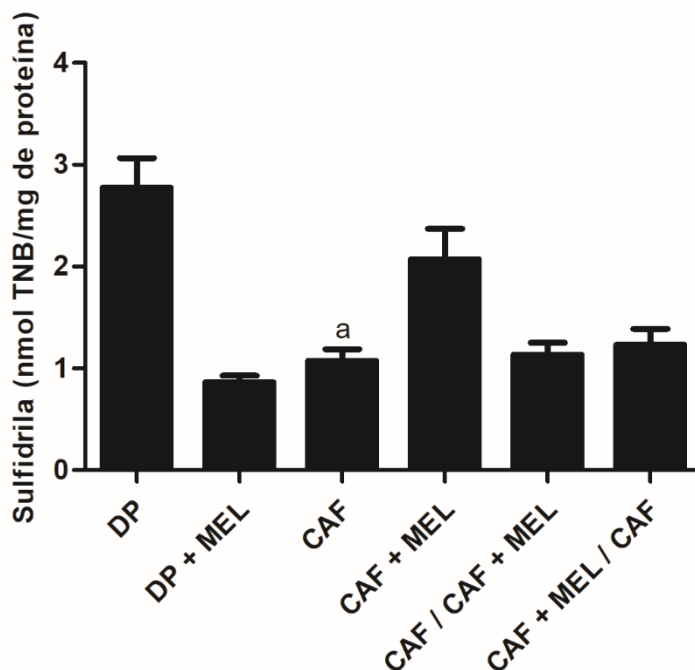


Figura 10: Avaliação do dano oxidativo por meio do conteúdo de sulfidrila no fígado de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina (n=6). Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão. ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP. Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* de Dunn, $p < 0,05$. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

No conteúdo de sulfidrilas ocorreu uma diminuição significativa do grupo CAF em comparação com o grupo DP ($p < 0,05$). Com relação aos demais grupos, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao grupo CAF (Figura 10).

4.7.3 – Defesas antioxidantes

Para avaliação das defesas antioxidantes foi realizado a avaliação da atividade da SOD e da atividade da GSH. Os resultados estão expostos na figura 11 (A e B, respectivamente).

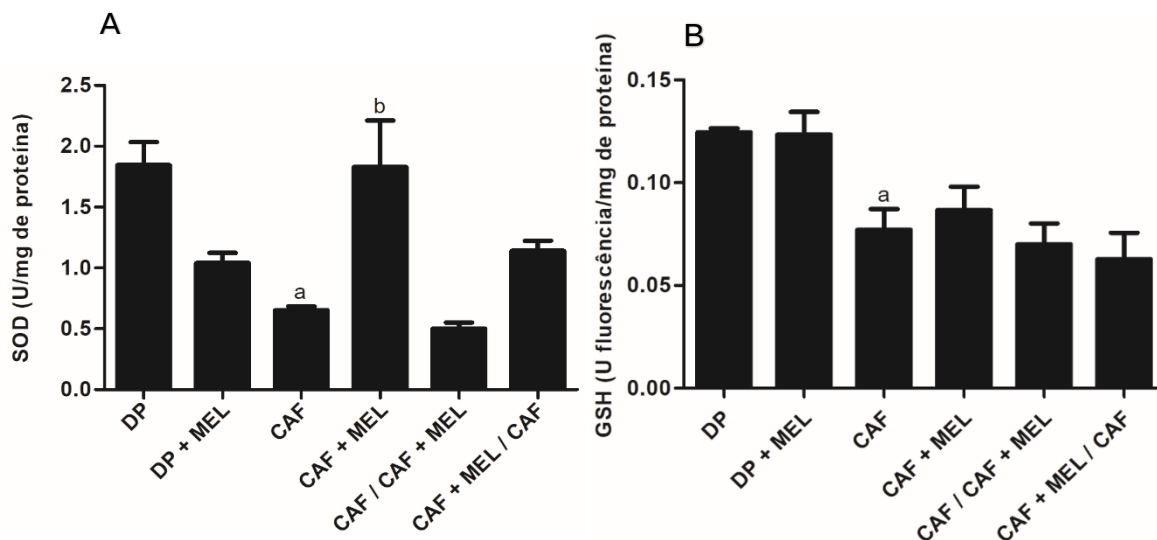


Figura 11: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e da glutathiona (GSH) no fígado de camundongos alimentados com ração padrão e/ou dieta cafeteria e suplementados com melatonina (n=6). Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão. ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP. ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. (A) Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* de Dunn. (B) ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

De acordo com a figura 11, pode-se observar que a atividade da SOD foi diminuída no grupo CAF em comparação com o grupo DP, no entanto, no grupo CAF + MEL foi observado um aumento significativo dessa defesa antioxidante no fígado destes animais, quando comparados com o grupo CAF ($p < 0,05$), sendo que o mesmo resultado não foi observado nos demais grupos ($p > 0,05$).

A atividade da GSH foi diminuída no grupo CAF em comparação com o grupo alimentado apenas com ração padrão (DP) ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas com relação aos demais grupos experimentais ($p > 0,05$).

4.8 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

4.8.1 Ensaio Cometa

O presente trabalho estudou os efeitos de 17 e 21 semanas da CAF sobre os danos no DNA dos animais, além do possível efeito antigenotóxico da MEL em sangue periférico, fígado e rim (figura 12, 13 e 14).

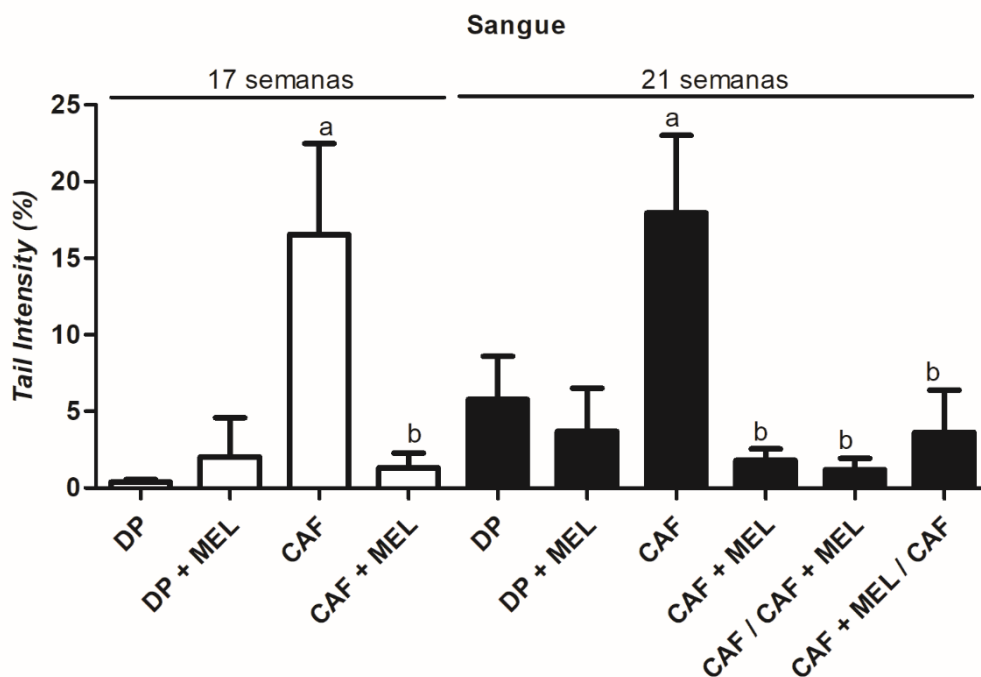


Figura 12: *Tail intensity* (%) de células de sangue periférico dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina e avaliados na semana 17 e 21 (n=6). Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$). Os dados da semana 17 compõem a média de cada grupo das primeiras 17 semanas de experimentação e os resultados da semana 21 compõem a média de cada grupo das últimas quatro semanas de experimentação. ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP; ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

Na figura 12 pode-se observar os danos ao DNA em sangue na semana 17 e na semana 21. Na semana 17 o grupo CAF se mostrou genotóxico quando comparado ao grupo alimentado apenas com a ração padrão (DP) e 21 semanas de suplementação paralela com MEL (CAF + MEL) foi capaz de reverter este dano ao DNA nas células sanguíneas dos animais ($p < 0,05$). Resultados semelhantes também foram encontrados em 21 semanas, onde o grupo CAF diferiu estatisticamente do grupo DP e do grupo CAF + MEL ($p < 0,05$). Além disso, os grupos que mudaram de tratamento, CAF / CAF + MEL e CAF + MEL / CAF também tiveram uma redução dos danos ao DNA em relação ao grupo CAF ($p < 0,05$).

A atividade genotóxica da CAF também foi avaliada em fígado e rim (figuras 13 e 14), onde pode-se constatar que esta dieta rica em alimentos industrializados (grupo CAF) induziu danos ao DNA nas células hepáticas e renais quando comparado com o grupo DP ($p < 0,05$). Resultados promissores foram observados nos três grupos suplementados com MEL (CAF + MEL, CAF / CAF + MEL e CAF + MEL / CAF), uma vez que a MEL reverteu os danos causados pela CAF nesses dois tecidos analisados ($p < 0,05$).

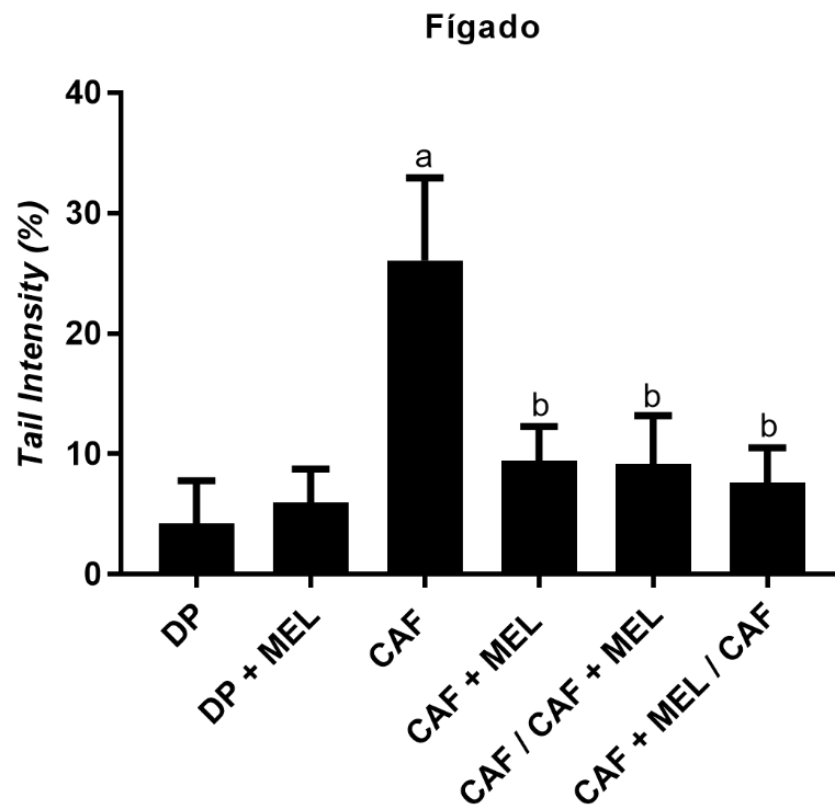


Figura 13: *Tail intensity* (%) de células de fígado dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina e avaliados na semana 21 (n=6). Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$). ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP; ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

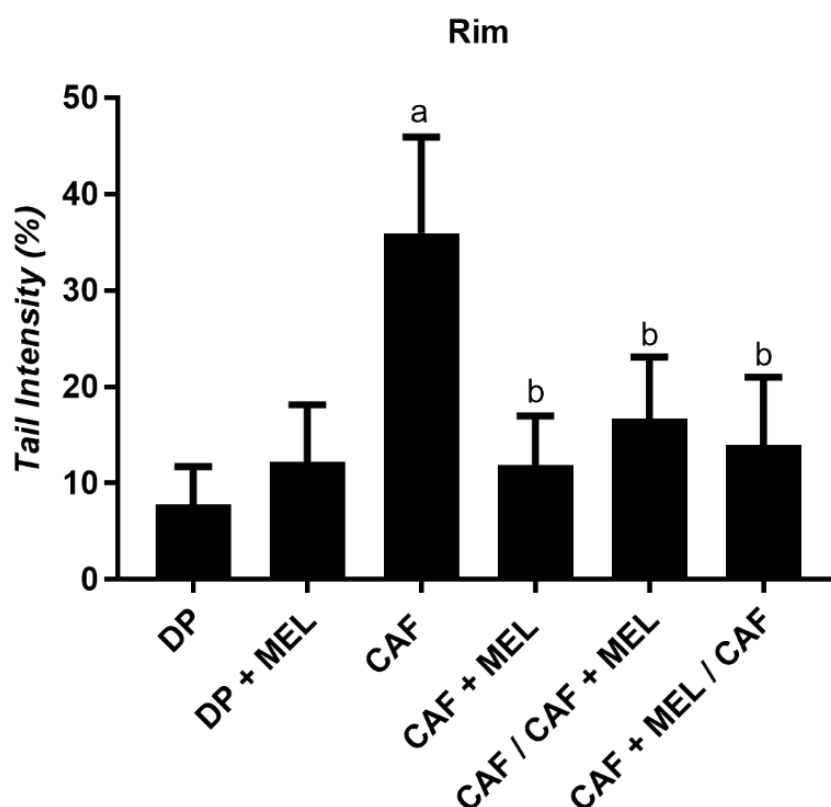


Figura 14: *Tail intensity* (%) de células de rim dos animais alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina na semana 21 (n=6). Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$). ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP; ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

4.8.2 Teste de Micronúcleo

Com o objetivo de avaliar o possível efeito mutagênico da CAF e antimutagênico da MEL, foi realizado o teste de micronúcleo em medula óssea dos animais submetidos ao modelo de indução de obesidade e suplementados com MEL. Os resultados estão representados na tabela 8.

Tabela 8: Teste de micronúcleo avaliado através do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) em amostras de medula óssea de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina. Foram analisadas 2000 células por amostra e estão demonstradas na tabela como média $\pm$ desvio padrão da média.

<i>Grupos</i>						
	DP	DP + MEL	CAF	CAF + MEL	CAF / CAF + MEL	CAF + MEL / CAF
EPCMn	0,66 $\pm$ 0,52	0,71 $\pm$ 0,76	4,12 $\pm$ 2,85 ^a	1,57 $\pm$ 1,27 ^b	1,42 $\pm$ 0,53 ^b	2,00 $\pm$ 1,10
EPC/ENC	0,54 $\pm$ 0,05	0,52 $\pm$ 0,06	0,51 $\pm$ 0,06	0,53 $\pm$ 0,06	0,51 $\pm$ 0,07	0,54 $\pm$ 0,06
% de redução EPCMn	-	-	-	73,69%	78,03%	61,27%

^aDiferença significativa em relação ao grupo DP; ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. ANOVA de uma via, *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$. CAF: cafeteria; DP: dieta padrão; ENC: eritrócitos normocromáticos; EPC: eritrócitos policromáticos; MEL: melatonina; Mn: micronucleado.

O grupo CAF se mostrou mutagênico em EPC quando comparados com o grupo DP, sendo que 21 semanas de suplementação com MEL (CAF + MEL) foram eficazes em reverter estes danos mutagênicos causados pela obesidade induzida através dos alimentos industrializados presente na CAF ($p < 0,05$). Além disso, o grupo CAF / CAF + MEL que recebeu apenas quatro semanas de MEL também se mostrou estatisticamente diferente do grupo CAF ($p < 0,05$). O grupo CAF + MEL / CAF não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$). Nenhuma diferença foi observada na proporção de EPC/ENC, não demonstrando atividade citotóxica da CAF ($p > 0,05$).

4.9 TÉCNICA DE WESTERN BLOT

4.9.1 Níveis de APE 1 e OGG1 em fígado de animais alimentados com dieta cafeteria e/ou ração padrão e suplementados com melatonina

Com o objetivo de avaliar as enzimas chaves envolvidas no reparo por excisão de bases (BER) no DNA, APE 1 e OGG1, foi realizado a técnica de *Western Blot* para detecção dos níveis proteicos em fígado de animais obesos alimentados com ração padrão, CAF e/ou suplementados com MEL. Os resultados podem ser observados na figura 15A e 15B.

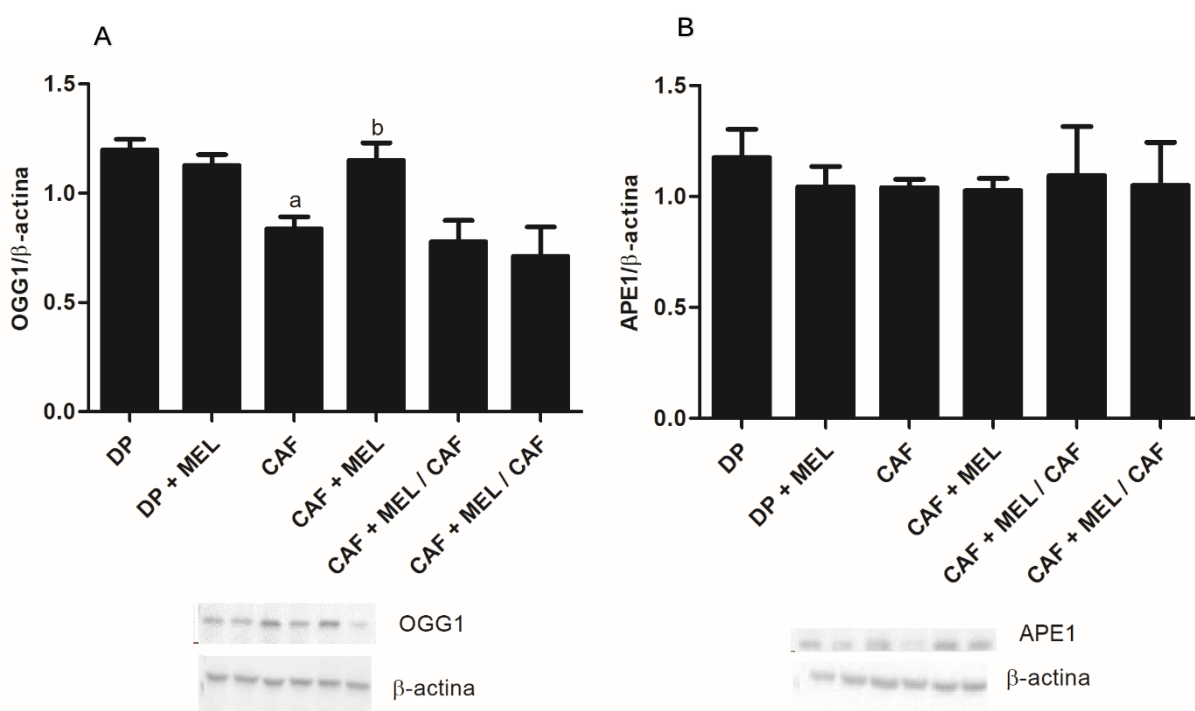


Figura 15: Níveis de OGG1 (A) e APE 1 (B) no fígado de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP. ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. ANOVA de uma via, *post hoc* de Newman-Keuls, $p < 0,05$. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

Nos níveis de OGG1 (figura 15A), o grupo CAF apresentou uma diminuição significativa em relação ao grupo DP e a MEL suplementada durante as 21 semanas experimentais (CAF + MEL) foi capaz de aumentar os níveis dessa enzima no fígado desses animais obesos ($p < 0,05$). Com relação aos níveis de APE 1 (figura 15B) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos analisados ($p > 0,05$).

4.9.2 Níveis de NRF2 em fígado de animais alimentados com dieta cafeteria e/ou ração padrão e suplementados com melatonina

Os níveis de NRF2 em resposta a estímulos inflamatórios foram avaliados nos fígados dos animais alimentados com dieta padrão, CAF e/ou suplementados com MEL e podem ser observados na figura 16 abaixo.

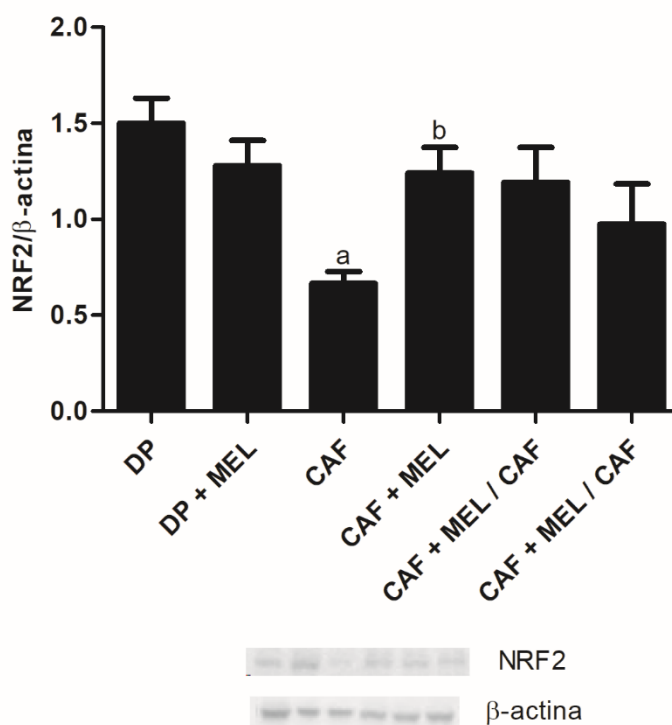


Figura 16: Níveis de NRF2 no fígado de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. ^aDiferença significativa em relação ao grupo DP. ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. ANOVA de uma via, *post hoc* de Newman-Keuls, $p < 0,05$. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

Os níveis de NRF2 foram diminuídos no grupo CAF em comparação com o grupo DP, porém 21 semanas de suplementação de MEL foram eficazes em aumentar esses níveis nos animais alimentados com CAF, avaliado através do grupo CAF + MEL ($p < 0,05$). Com relação aos demais grupos não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$).

4.9.3 Níveis de GLUT4 em tecido adiposo branco de animais alimentados com dieta cafeteria e/ou ração padrão e suplementados com melatonina

No presente trabalho foi avaliado os níveis do transportador de glicose GLUT4 em tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal) (figura 17A) e visceral (mesentérico) (figura 17B). Os resultados podem ser observados nos gráficos abaixo.

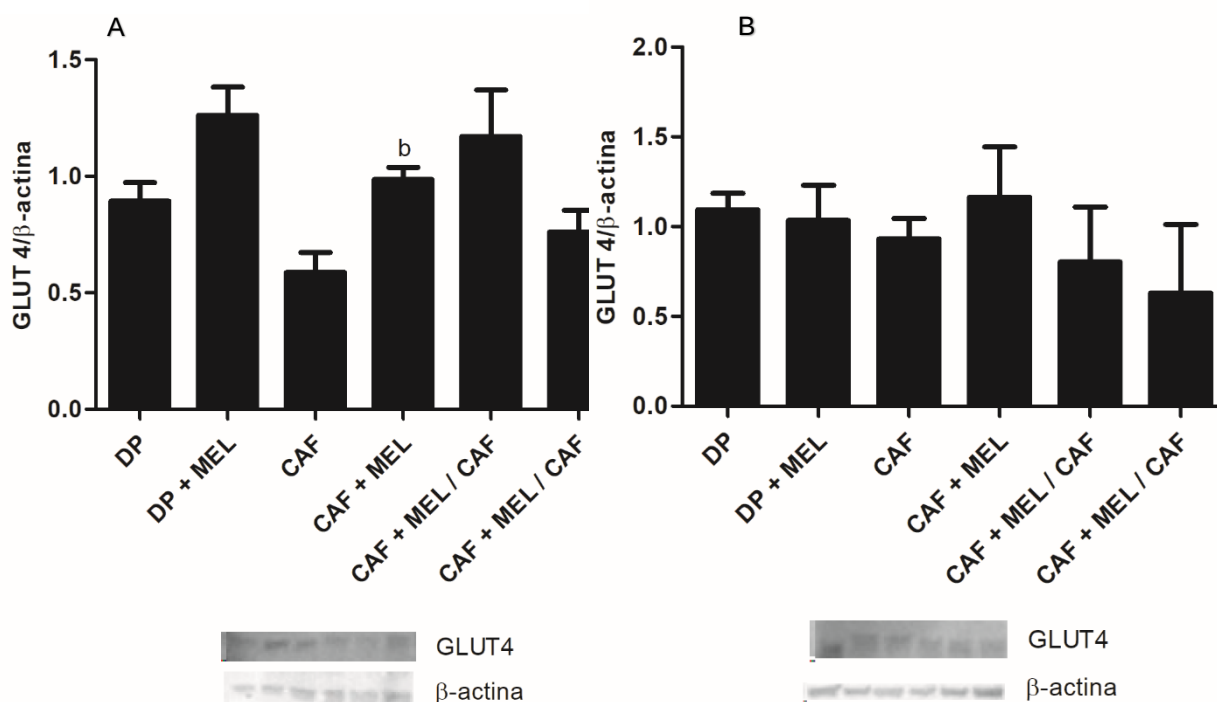


Figura 17: Níveis de GLUT4 no tecido adiposo branco inguinal (A) e mesentérico (B) de camundongos alimentados com ração padrão, dieta cafeteria e/ou suplementados com melatonina. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. ^bDiferença significativa em relação ao grupo CAF. ANOVA de uma via, *post hoc* de Newman-Keuls, $p < 0,05$. CAF: dieta cafeteria; DP: dieta padrão; MEL: melatonina.

Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo CAF em relação ao grupo DP em TAB subcutâneo e visceral. A suplementação da MEL durante todo o período experimental no grupo CAF + MEL foi estatisticamente diferente em relação ao grupo CAF no tecido adiposo branco inguinal ($p < 0,05$).

Com relação aos níveis de GLUT4 em tecido adiposo branco mesentérico não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos avaliados.

4.10.4 Biologia de sistemas

Neste estudo proteínas diferencialmente expressas na obesidade foram prospectadas juntamente com proteínas relacionadas à ação da MEL, sendo o ponto de partida para a construção da rede de interação. A rede construída contém 818 nós e 45717 conexões (figura 18).

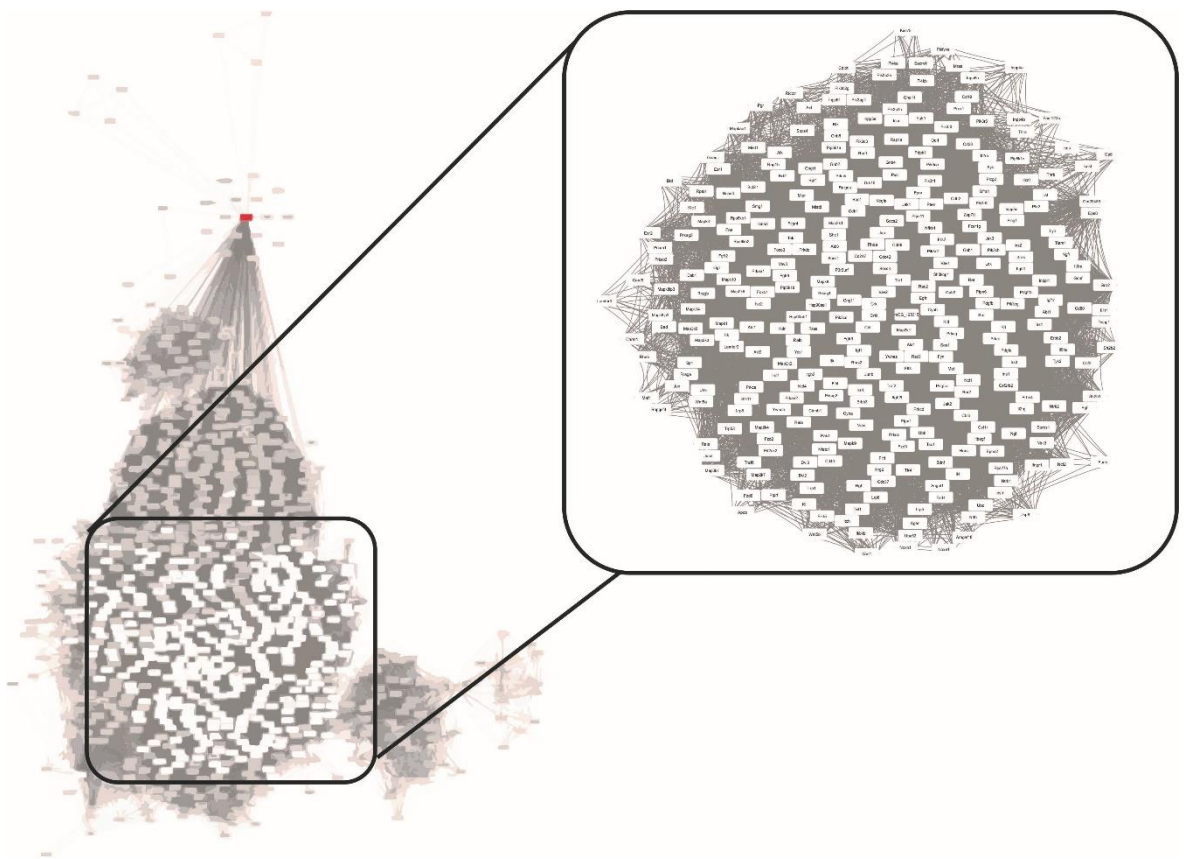


Figura 18: **Rede**: os círculos são os nós da rede, e estes representam proteínas humanas. (a) a rede de interação químico-proteica, contendo 818 nós e 45717 conectores, onde podemos encontrar todos os *clusters*. (b) nós que compõem o *Cluster 2*, em branco.

Com o objetivo de compreender o efeito da suplementação de MEL em camundongos alimentados com dieta cafeteria foram realizadas a análise de topologia e de centralidade da rede. A rede MEL foi avaliada em relação a presença de *clusters*. Na rede, 15 *clusters* foram gerados acima do *cutoff score*, valor que determina a significância do *cluster*. Em seguida, os bioprocessos associados aos *clusters* foram

identificados com a análise de ontologia gênica (tabela 9). O *cluster* em destaque foi aquele associado com o reparo do dano ao DNA, o *cluster* 2 (figura 18) que mostrou processos como fosforilação, via de sinalização da proteína tirosina cinase, via de sinalização de proteínas receptores associadas a enzimas, modificação proteica pós tradução, cascata da MAPKKK, regulação positiva da atividade da MAP cinase (MAPK), regulação da resposta ao estresse e da expressão gênica, regulação da ligação ao DNA, regulação da organização do citoesqueleto de actina, resposta ao estresse oxidativo, resposta ao dano ao DNA e transdução de sinal e também translocação nuclear da MAPK.

Tabela 9: Análise de ontologia gênica, evidenciando o *cluster* em que ocorre, o valor de significância e as proteínas envolvidas.

GO-ID	Valor-P corrigido	Total de proteínas, da rede, no GO	Total de proteínas do GO	Bioprocasso	
165	1.8448×10^{-43}	39	135	Cascata da MAPKKK	RET FLT1 SHC1 INS2 PXN EGFR MAPK9 MAPK8 KISS1R MAPK1 JAK2 MAP2K7 MAP3K7 MAP3K5 MAP2K6 MAPK3 MAP2K3 MAP2K4 MAP2K1 MAP3K1 MAP2K2 SYK EGF HGF WNT5A GAB1 FRS2 PTPN11 MAPK8IP2 MAPK14 MAPK8IP3 PTK2 MAPK10 TRAF6 ROR2 RAF1 TLR4 FGFR3 MET
43406	2.0724×10^{-28}	24	72	Regulação positiva da atividade da MAP cinase	MAP2K3 MAP2K4 MAP2K1 MAP3K1 SYK SHC1 INS2 HGF PRKCD WNT5A PXN GAB1 ILK FRS2 PTPN11 MAPK8IP3 KITL KIT KRAS MAP2K7 TLR4 MET MAP3K5 MAP2K6
6979	1.2544×10^{-7}	11	108	Resposta ao estresse oxidativo	MAP2K1 MAPK8 AXL LCK PRKCD BTK GAB1 BCL2 JAK2 TLR4 NFKB1
42770	2.3162×10^{-4}	5	41	Resposta ao dano ao DNA, transdução de sinal	MED1 TRP53 PTPN11 FOXO3 MAPK14
189	9.3293×10^{-4}	2	3	Translocação nuclear da MAPK	MAPK1 MAPK3

GO: Ontologia gênica

Neste trabalho, dois parâmetros de centralidade de rede foram avaliados: grau do nó e intermeabilidade (*betwenness*). Esta análise permite verificar quais proteínas que são mais relevantes dentro da rede (*hub-gargalos* - HG) (figura 19).

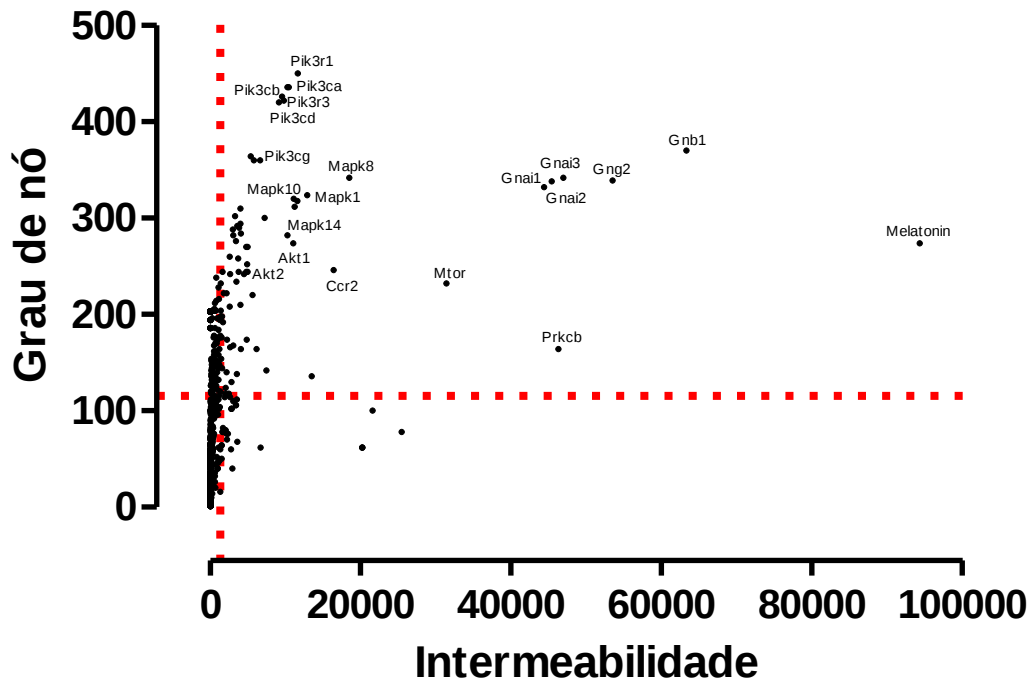


Figura 19: Gráfico de hubs-gargalos (HG) mostrando os nós mais importantes da rede. O eixo vertical mostra os valores de grau do nó e o eixo horizontal mostra os valores de intermeabilidade. As linhas pontilhadas em vermelho representam os valores médios de ambas as centralidades. Os nós acima da média, chamados de hubs-gargalos, são de grande importância para a integridade da informação dentro da rede.

Através do uso de *plugins* específicos que detectam nós HG, os cinco maiores HG foram identificados: MAPK, PI3K, AKT, mTOR e PRKCB.

A partir desses resultados foi possível propor uma nova hipótese de como a MEL estaria agindo para diminuir a genotoxicidade causada pela dieta cafeteria.

5 DISCUSSÃO

Modelos animais de obesidade induzida por dieta são métodos comumente usados para avaliar os mecanismos subjacentes de distúrbios metabólicos que estão presentes durante a supernutrição (Buyukdere et al., 2019).

Ao expor roedores a uma variedade de alimentos altamente palatáveis, ricos em açúcar, o protocolo da dieta CAF descrito aqui fornece um modelo confiável e robusto da chamada "dieta ocidental" consumida por muitas pessoas. Apesar dos avanços nas abordagens clínicas da obesidade e de suas comorbidades inerentes, o desafio terapêutico persiste. Dentre as várias ferramentas farmacológicas já investigadas, estudos recentes sugerem que a suplementação de MEL pode ser uma abordagem terapêutica eficiente no contexto da obesidade (Genario et al., 2021). Com isso, objetivou-se estudar os efeitos da MEL, hormônio conhecido por suas propriedades antioxidantes, especialmente seus efeitos sobre os danos no DNA, em modelo de obesidade uma vez que não há na literatura estudos relacionados às suas propriedades antígeno-tóxicas nessa condição de saúde.

Com o objetivo de caracterizar o modelo de indução de obesidade, no presente estudo foi controlado a ingestão de alimentos, consumo energético, e consumo de líquidos. Este último parâmetro foi calculado com o objetivo comprovar e poder calcular, a ingestão de MEL por parte dos animais. Dessa forma, observou-se que apesar dos grupos CAF terem ingerido uma quantidade diária de líquidos menor que o grupo DP, a ingestão de MEL se manteve constante ao longo das semanas (tanto nas análises em 17 e 21 semanas).

No presente trabalho não houve um consumo energético maior no grupo CAF – porém os animais do grupo CAF tiveram uma preferência maior dos alimentos *fast foods* - em relação aos animais alimentados com DP. No entanto, observou-se um aumento do peso corporal neste grupo após as 17 e 21 semanas. Diversos estudos já demonstraram que a CAF é capaz de induzir o aumento do peso corporal em animais, em diferentes períodos de tempo (Sampey et al., 2011; Oliva et al., 2017; Pascual-Serrano et al., 2017; Bortolin et al., 2018).

Corroborando com estes achados, no presente estudo também foi observado que a CAF induziu um aumento no índice de adiposidade dos animais quando comparados com o grupo controle que se alimentou apenas de ração padrão. De fato, é característica da CAF induzir uma expansão do tecido adiposo dos animais,

assim como foi observado no estudo de Pascual-Serrano et al (2017), onde ratos Wistar foram submetidos a uma CAF durante 11 semanas. Dessa forma, os autores puderam observar que a dieta rica em alimentos industrializados foi capaz de induzir um aumento do peso corporal dos animais além de um aumento significativo no índice de adiposidade.

Ademais, o estudo de Pascual-Serrano et al. (2017) trouxe dados da média de TAB mesentérico, inguinal e epididimal, e constataram que houve um aumento do TAB nestes animais. Análises da histologia do TAB visceral e subcutâneo indicam que a CAF induz este aumento por hipertrofia, que seria o aumento do tamanho do adipócito por acumular mais lipídeos e hiperplasia, e aumento do número de adipócitos pela adipogênese (Pascual-Serrano et al., 2017).

O aumento do peso corporal é resultado de um desequilíbrio entre o total de energia ingerida e o total gasto, sendo que o balanço energético é o resultado entre o total energético ingerido e o total energético gasto pelo corpo. No presente estudo pode-se observar que a MEL foi eficaz em reduzir o peso corporal dos animais obesos. Assim, acredita-se que a MEL atue principalmente aumentando o gasto calórico (Souza et al., 2019; Owino et al., 2019). Sendo que o TAM é o maior sítio para o aumento do gasto energético e consequentemente diminui o peso corporal em resposta ao tratamento com MEL.

No estudo de Mendes et al. (2021), foi demonstrado que a suplementação com MEL (10 mg/kg) por 16 semanas em animais idosos induziu um aumento do mRNA de vários genes que estão envolvidos na função termogênica do TAM, tais como: *PGC1 α* e *PRDM16*, que codificam reguladores transcricionais envolvidos no processo de diferenciação de adipócitos marrons (Seale et al., 2008); *ZFP516* que tem como função aumentar a ativação transcricional de UCP1 e promover a diferenciação e ativação do TAM e adipócitos bege (Seale, 2015); *CIDEA*, expressa em adipócitos marrons, regulando a atividade da UCP1 e o metabolismo lipídico (Seale, 2007).

Ainda sobre os efeitos da MEL relacionados a redução de peso corporal, Xu et al. (2017) observaram que após 10 semanas de suplementação (50 mg/kg/dia) em animais que receberam uma dieta hiperlipídica, foi possível verificar o efeito protetivo contra a obesidade induzida por dieta, resistência à insulina, esteatose hepática e baixa inflamação. Além disso, a MEL reduziu o ganho de peso corporal, tecido adiposo e diminuiu o tamanho dos adipócitos epididimais próximos ao controle.

Dessa forma, observa-se que a MEL não altera o peso corporal por diminuir o consumo alimentar (Sartori et al., 2009; Tan et al., 2011; Cipolla-Neto et al., 2014), como observado no presente trabalho, mas sim por aumentar o gasto energético, como já foi observado em outros estudos (Ciza et al., 2011; Tan et al., 2011; Cipolla-Neto et al., 2014).

No presente trabalho, nos grupos que receberam MEL por um período menor de tempo (CAF / CAF + MEL e CAF + MEL / CAF) não foram observadas diferenças significativas no peso corporal em relação ao grupo CAF. Porém, apesar do peso corporal não ter sido alterado no grupo CAF / CAF + MEL foi observado que a MEL foi eficaz em diminuir o índice de adiposidade desse grupo. Esses dados indicam que a MEL possa ter outros mecanismos que influenciam no peso corporal, como através do estímulo do aparecimento de adipócitos bege em tecido adiposo branco (Jiménez-Aranda et al., 2015), que contribuem para a perda do excesso de triacilglicerídeos acumulados devido à produção de calor (Olesia et al., 2017).

Cipolla-Neto et al. (2014) demonstraram em seu estudo que animais obesos com dez meses de idade que receberam MEL na água de beber até completarem 22 meses de idade tiveram diminuição do peso corporal dos animais e da gordura visceral intra-abdominal. Essa redução do peso corporal iniciou em duas semanas, no entanto, cessou após a interrupção da administração de MEL, assim como foi observado no presente trabalho no peso corporal e índice de adiposidade do grupo que recebeu MEL nos quatro primeiros meses e parou a suplementação deste hormônio no último mês (CAF + MEL / CAF).

Estudos comparando dietas com alto teor de gordura e a dieta cafeteria relataram uma condição pré-diabética (Sampey et al., 2011); hiperglicemia, intolerância à glicose e hiperinsulinemia (Higa et al., 2014) e maior prejuízo na homeostase da glicose (Bortolin et al., 2018) nos animais alimentados com CAF, uma vez que o acúmulo excessivo de tecido adiposo está correlacionado com o desenvolvimento de intolerância à glicose e resistência à insulina (Kohlgruber e Lynch, 2015; Rebuffat et al., 2018).

De fato, o presente estudo observou que a CAF induziu um aumento na glicemia de jejum e levou esses animais à resistência insulínica sistêmica e pode-se observar também que o decaimento da glicemia após administração de insulina foi mais lento nos animais alimentados com CAF em comparação com o grupo DP alimentado apenas com ração padrão.

Além disso, também objetivou-se avaliar se a CAF induz a uma diminuição nos níveis de GLUT4 em tecido adiposo visceral (mesentérico) e subcutâneo (inguinal), dessa forma pode-se observar que apesar de não ser estatisticamente significativo, o grupo alimentado com CAF teve uma diminuição nos níveis de GLUT4 em comparação com o DP em tecido subcutâneo.

Os mecanismos pelos quais a insulina perde sua capacidade de reduzir os níveis de glicose no sangue incluem a ativação do fator de transcrição FOXO1 no fígado (Klotz et al., 2015) e a interrupção da translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana superficial do músculo esquelético (Pereira et al., 2017). FOXO1 aumenta a expressão de enzimas-chave da gliconeogênese; consequentemente, sua regulação positiva resulta no aumento da conversão de substratos que chegam ao fígado em glicose. Uma diminuição nos níveis de GLUT4 na membrana superficial do músculo reduziria a captação de glicose da circulação. No fígado, a insulina normalmente causa fosforilação e supressão da função do FOXO1 por meio da ação da proteína quinase Akt, que faz com que o FOXO1 seja retido no citoplasma, onde fica inativo (Czech et al., 2017).

Em camundongos com obesidade, a expressão de FOXO1 está aumentada, e a proteína é aparentemente modificada para se tornar insensível à regulação da insulina (Titchenell et al., 2016). Uma vez que a FOXO1 não responde mais à ação da insulina ocorre um aumento da produção de glicose. A hiperglicemia e hiperinsulinemia crônica resultantes podem interromper a supressão da lipólise nos adipócitos. O glicerol resultante e os ácidos graxos provenientes da lipólise no tecido adiposo são oxidados no fígado e os produtos promovem a gliconeogênese. Além disso, essa hiperinsulinemia ativa a lipogênese hepática e aumenta a secreção de VLDL (hiperlipidemia) (Czech et al., 2017).

A suplementação de MEL durante todo o período experimental nos animais obesos durante 17 ou 21 semanas foi eficaz em diminuir a glicemia de jejum, reverter o quadro de resistência insulínica sistêmica, acelerar o decaimento da glicemia e aumentar os níveis de GLUT4 em tecido adiposo inguinal. Além disso, o decaimento da glicose após administração de insulina exógena foi maior nesse grupo suplementado com MEL durante toda a vida (CAF + MEL) em comparação com os demais grupos obesos. Apesar de não haver uma diferença significativa nos demais grupos, observa-se que na ASC há uma tendência na diminuição da resistência à insulina nesses grupos.

Em humanos a MEL também demonstra resultados promissores em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) com doença cardíaca, uma vez que 10 mg de MEL por dia durante 12 semanas diminuiu a glicemia de jejum e insulina sérica em comparação com o grupo placebo (Raygan et al., 2019). Além disso, Rezvanfar et al. (2017) descobriram que a MEL, em uma dosagem menor de 6 mg por dia durante 12 semanas, também foi eficiente em diminuir a glicemia de jejum em pacientes diabéticos.

A MEL age em diferentes órgãos modulando os processos metabólicos, dessa forma, diminui a glicemia de jejum e resistência à insulina. No fígado de camundongos, a MEL é necessária para a atividade de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) -AKT estimulada por insulina. Em ratos ela suprime a produção de glicose hepática, e na linhagem celular de hepatócitos humanos HepG2, ativa a síntese de glicogênio. No músculo esquelético de camundongos, a MEL ativa a via do substrato 1 do receptor de insulina (IRS1) –PI3K para aumentar a taxa de captação de glicose. Em ilhotas pancreáticas humanas, o tratamento com MEL promove a sobrevivência das células β por meio da diminuição da ativação da JNK (Karamitri e Jockers, 2018). De um modo geral, a MEL exerce seus efeitos principalmente através da fosforilação de proteínas, mecanismo este evidenciado na biologia de sistemas.

A insensibilidade à insulina é considerada intrínseca à dislipidemia (Lumeng e Saltiel, 2011), o que é consistente com os achados do presente trabalho, uma vez que o grupo CAF apresentou um aumento dos triglicerídeos sanguíneos na semana 21, e no colesterol total na semana 17, além de valores menores de HDL-c nas últimas quatro semanas de experimento.

A dislipidemia foi provavelmente devido ao maior consumo geral da dieta CAF em relação a ração padrão nos grupos alimentados com CAF durante todo o experimento, que é rica em ácidos graxos trans e colesterol. A resistência à insulina está ligada a depósitos centrais de gordura, particularmente a adiposidade visceral, que se acredita causar aumento da esterificação de ácidos graxos hepáticos, que formam triglicerídeos, que por sua vez são liberados através da veia porta que irriga o fígado, resultando em hipertrigliceridemia (Lewis et al., 2019).

Apesar de serem observadas diferenças entre os grupos DP e CAF no parâmetro de perfil lipídico, os resultados não se mostraram consistentes durante todo o período experimental, uma vez que 17 semanas não foram suficientes para alterar o triglicerídeo sérico, porém em 21 semanas de tratamento já foram observadas

diferenças significativas em relação ao grupo controle dieta padrão. Uma hipótese levantada para o resultado aqui encontrado seja o tempo maior de experimentação, visto que no trabalho de Buyukdere et al. (2019) os valores de triglicerídeos também não foram alterados nos animais alimentados com CAF durante 12 semanas.

Além dos triglicerídeos não terem sido alterados em 17 semanas, observou-se que o colesterol total não diferiu estatisticamente no grupo CAF em relação ao grupo DP na semana 21, porém, observa-se que houve um aumento do HDL-c no grupo DP em comparação com o grupo CAF na semana 17. Isso pode explicar o fato de que a CAF não mostrou diferença significativa em relação a este grupo.

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que a suplementação de MEL foi eficaz na homeostase lipídica, uma vez que este hormônio foi capaz de aumentar níveis de HDL-c e diminuir os níveis de triglicerídeos séricos dos animais em todos os grupos tratados, no entanto, não foi observado seu efeito sobre o colesterol total. Todavia, o fato da MEL ter aumentado de forma significativa o HDL-c nos animais sem alterar o colesterol total é um fator determinante da ação deste hormônio sobre o restabelecimento da homeostase no metabolismo dos lipídios, uma vez que com o aumento do HDL-c houve, provavelmente, uma diminuição do LDL-c e colesterol não-HDL. Isso é corroborado pelo trabalho de Farias et al. (2019) onde foi comprovada a eficiência deste hormônio em diminuir níveis de LDL-c em animais alimentados com uma dieta rica em gordura e suplementados com MEL durante dez semanas.

A partir dos resultados obtidos foi possível calcular o índice de Castelli I, importante preditor para o risco cardiovascular, através da razão entre o colesterol total e HDL-c (Adedokun et al., 2019). Com isso, observa-se que tanto na semana 17 quanto na semana 21, o grupo CAF teve valores significativamente maiores em comparação com o grupo DP, uma vez que os animais alimentados com CAF tiveram maior colesterol total e menor HDL-c em comparação com o grupo alimentado apenas com ração padrão. A suplementação de MEL durante 17 ou 21 semanas foi eficaz em diminuir o risco cardiovascular desses animais, uma vez que este hormônio foi capaz de aumentar o HDL-c. De modo geral, o efeito da MEL sobre o metabolismo lipídico demonstra que esse hormônio pode proteger o LDL da oxidação e contribuir para seu papel protetivo no desenvolvimento da aterosclerose, visto que a oxidação de LDL é

uma importante etapa na patogênese desta doença (Mohammadi-Sartang et al., 2017).

Leal et al. (2019) observaram que animais alimentados durante 65 dias com uma dieta cafeteria alteraram os níveis de ALT desses animais em comparação com o grupo alimentado apenas com ração padrão, já esse mesmo tempo experimental não alterou os valores de AST. Esse resultado corrobora com o encontrado no presente estudo, uma vez que em 17 semanas a CAF foi capaz de alterar significativamente os níveis de ALT dos animais, porém não de AST. Entretanto quando esses animais foram alimentados por mais quatro semanas com CAF, a AST foi estatisticamente diferente neste grupo em comparação com o grupo DP.

A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto que 80% da AST está presente na mitocôndria. Em dano hepatocelular leve, a forma predominante no soro é a citoplasmática, enquanto que em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial (Motta, 2009).

O aumento das enzimas hepáticas como demonstrado no presente estudo está relacionado com o acúmulo de gordura no fígado (registrado através de imagem fotográfica), que depende em grande parte da recirculação de ácidos graxos livres proveniente do tecido adiposo. O TAB visceral tem maior potencial lipolítico do que o TAB subcutâneo, que é mais abundante, sendo que a liberação de ácidos graxos livres dos depósitos de gordura visceral diretamente na circulação portal é um dos mecanismos de lesão hepática (Marchesini et al., 2008).

A diminuição das lesões hepáticas pela MEL já foi previamente descrita em diferentes estudos, tais como nos danos causados por ciclofosfamida (Shokrzadeh et al., 2014), em pacientes em uso de estatinas (Chojnacki et al., 2017) e quimioterápicos (Esteban-Zubero et al., 2016), em animais diabéticos (Agil et al., 2015) e alimentados com CAF (Sampey et al., 2011).

Corroborando com o presente trabalho, Agil et al. (2015) demonstraram que ratos diabéticos que receberam MEL durante seis semanas na dose de 10 mg/kg apresentaram em uma significativa diminuição nos níveis séricos de ALT em comparação com o grupo controle, que não foi suplementado com MEL, sendo que os autores deste trabalho também não encontraram diferenças entre os ratos diabéticos do grupo controle e do grupo que recebeu MEL nos níveis séricos de AST.

Os resultados encontrados no presente trabalho em relação ao perfil hepático podem ser uma consequência indireta da redução do peso corporal nesses

animais que foram suplementados com MEL (Agil et al., 2011), levando em consideração que o peso corporal foi diminuído nos animais apenas no grupo CAF + MEL (em 17 e 21 semanas). Dessa forma, no presente trabalho a AST não diferiu significativamente nos grupos CAF / CAF + MEL e CAF + MEL / CAF, porém o peso corporal também não foi alterado nesses animais, concordando com a hipótese de a MEL exercer seus efeitos protetivos no fígado através da manutenção do peso corporal. Além disso, a MEL pode diminuir o dano hepático através da diminuição de NLRP3, diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo o estresse oxidativo e a morte de hepatócitos (Cao et al., 2017).

Considerando os efeitos maléficos que o consumo de uma dieta ocidental pode acarretar aos organismos, objetivou-se avaliar também citocinas pró e anti-inflamatórias nos animais no presente estudo. Sendo assim, observou-se que os animais alimentados com CAF tiveram um aumento de TNF- α e uma diminuição de IL-10. Este resultado corrobora com alguns estudos presentes na literatura, como no de Navarro et al. (2016) e Lewis et al. (2019) onde ratos alimentados por seis ou 20 semanas respectivamente, com uma dieta cafeteria induziu a um aumento de TNF- α em tecido renal, adiposo e no soro.

Dias et al. (2014) alimentaram camundongos com CAF durante 17 semanas e constataram que houve um aumento de TNF- α associado a uma diminuição (não significativa) de IL-10.

Esse perfil inflamatório pode ser resultado de fatores dietéticos, como o aumento de ácidos graxos, estimulando as células do sistema imunológico e imitando uma cascata inflamatória. Embora não tenham sido realizadas análises histológicas de tecido adiposo branco, fígado e pâncreas para avaliar a infiltração de macrófagos, este processo é necessário para a perpetuação do estado de obesidade e resistência sistêmica à insulina (Lewis et al., 2008), que foram observados no presente estudo. Essa proliferação de macrófagos leva a um aumento de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (Hotamisligil, 2006). Essas citocinas, juntamente com os ácidos graxos e as adipocinas, podem contribuir para a resistência sistêmica à insulina devido aos efeitos no fígado e no músculo, onde inibem a sinalização intracelular do receptor de insulina. Essa inflamação também pode propagar a interrupção das vias relacionadas à alimentação no hipotálamo, diminuindo a capacidade da insulina e da leptina de suprimir a fome e a alimentação, mantendo assim a obesidade induzida pela dieta CAF (van der Poorten et al., 2008).

A ação anti-inflamatória da MEL pode acontecer através de diferentes mecanismos. A MEL demonstrou muitas vezes inibir a sinalização de NF- κ B e isso foi relacionado à atenuação de respostas inflamatórias, sob várias condições experimentais (Murakami et al., 2011; Negi et al., 2011; Liu et al., 2017; Nopparat et al., 2017; Ramamoorthy et al., 2017; Ping et al., 2017; Ren et al., 2017; Shrestha et al., 2017), sendo que o NF- κ B parece estar envolvido com a ativação do inflamassoma NLRP3 e este com dois fatores pró-inflamatórios, iNOS e ciclooxigenase - 2 (COX-2) (Shi et al., 2012; Murakami et al., 2011; Negi et al., 2011). Ademais, a MEL regula positivamente o NRF2, que por sua vez inibiria a produção de ERO e outros oxidantes (Shang et al., 2016). As ações anti-inflamatórias da MEL também podem acontecer mediadas pela sirtuína 1 (SIRT1), que estaria inibindo NF- κ B e NLRP3 e assim contribuindo para diminuir a inflamação (Hardeland, 2018).

Como visto no presente trabalho, a MEL foi capaz de diminuir a citocina pró-inflamatória TNF- α e aumentou a citocina anti-inflamatória IL-10, tanto em sangue quanto em fígado, no entanto, observou-se que os resultados foram mais satisfatórios no grupo que foi suplementado durante todas as 21 semanas.

Em indivíduos obesos, o estresse oxidativo está tão intimamente interligado com a inflamação a ponto de desencadear um círculo vicioso: oxidantes ativam fatores de transcrição, incluindo fator NF- κ B e proteína ativadora-1 (AP-1), que conduzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias; esses mediadores, por sua vez, aumentam a produção de ERO, contribuindo assim para o início e manutenção do estresse oxidativo (Bryan et al., 2013).

Nos estágios iniciais da obesidade, o aumento da captação de glicose e ácidos graxos pelos adipócitos ativa a NOX4, a principal isoforma da NADPH oxidase nos adipócitos, e induz a produção de ERO. O acúmulo excessivo de gordura nos adipócitos promove a produção de adipocinas pró-inflamatórias e essas citocinas pró-inflamatórias induzem a invasão do tecido alvo por células imunes e o desenvolvimento de inflamação crônica (Han et al., 2012). O acúmulo de linfócitos T e macrófagos no tecido adiposo durante o desenvolvimento da obesidade promove a produção de ERO por NOX2, a isoforma da NADPH oxidase expressa em células inflamatórias. Além disso, adipócitos e células musculares lisas expostas a altos níveis de ácidos graxos livres ou altas concentrações de glicose mostraram aumento da fissão mitocondrial e aumento da produção mitocondrial de ERO (Weisberg et al., 2003; Gao et al., 2010; Heo et al., 2017).

No presente estudo observou-se um aumento da produção de ERO, especialmente de H_2O_2 , no grupo alimentado com CAF em comparação com o grupo DP, avaliado através dos níveis de DCF. Somado a este resultado, houve uma diminuição na atividade da SOD nesse mesmo grupo alimentado com *fast food*. A SOD catalisa a desmutação de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em O_2 e H_2O_2 , e representa a primeira linha de defesa enzimática contra ERO. Esses resultados indicam que a dieta CAF pode estar induzindo uma perturbação do equilíbrio oxidativo sendo que a capacidade antioxidante vai diminuindo à medida que é superutilizada (La Russa et al., 2019) ou seja, em caso de baixa ou média estimulação oxidativa, a atividade antioxidante enzimática pode aumentar, mas, se o estresse oxidativo persistir, ou seu nível for muito alto, o dano causado às macromoléculas torna-se profundo e isso acarreta em uma atividade diminuída dessas enzimas (Demerdash, 2017).

Após a ação da SOD, o GSH age neutralizando o H_2O_2 em H_2O , isso ocorre através da sua oxidação à glutathiona dissulfeto (GSSG) através da enzima glutathiona peroxidase (GPx) com posterior regeneração da GSH pela enzima glutathiona redutase (GR) na presença de NADPH (Almeida e Fátima, 2008), sendo que em condições normais, a GSH constitui cerca de 98% do conteúdo celular de glutathiona (Savini et al., 2016). A partir do exposto, pode-se dizer que o grupo CAF representou um alto consumo de GSH, ou seja, a GPx estava ativa e neutralizando o H_2O_2 mas essa atividade não foi o suficiente para neutralizar a alta produção dessa ERO, o que foi comprovado pela alta produção de ERO através do DCF.

Corroborando com esses resultados, foi avaliado o conteúdo de sulfidrilas e esse acompanhou os resultados encontrados no grupo CAF para GSH, uma vez que o conteúdo de sulfidrilas se mostrou baixo no grupo CAF. A capacidade redutora da GSH se dá através dos grupamentos tiois (-SH) presente em um resíduo de cisteína que participa do sítio ativo da GR.

Giudetti et al. (2019) encontraram resultados semelhantes no fígado de ratos alimentados com CAF, onde ocorreu um menor nível de GSH e aumento do nível de proteína carbonilada. Esse efeito pode estar relacionado à maior FAO (via da oxidação de ácidos graxos) que caracterizou esses animais em relação ao grupo controle, alimentado com ração padrão, pois a β -oxidação mitocondrial estimulada pode ser uma fonte de produção de ERO (Giudetti et al., 2019).

Além do exposto, a diminuição da produção de ERO nos grupos suplementados com MEL vem acompanhada com um aumento da defesa

antioxidante, avaliado pela atividade da SOD, especialmente no grupo CAF + MEL. Sendo assim, os efeitos antioxidantes da MEL se dão através de um período de consumo maior, uma vez que de forma significativa apenas o grupo que teve um maior tempo de consumo (21 semanas) mostrou resultados melhores na atividade das enzimas antioxidantes.

Apesar da MEL melhorar as defesas antioxidantes, a principal atividade desse hormônio se dá através da eliminação de radicais livres. Como um potente eliminador de radicais livres e antioxidante, a reação em cascata da MEL a distingue de outros antioxidantes clássicos. O fato da MEL e seus metabólitos secundários e terciários serem capazes de neutralizar numerosos derivados tóxicos do oxigênio, isso torna uma molécula de MEL capaz de eliminar até 10 ERO em comparação com os antioxidantes clássicos que eliminam um (Tan et al., 2015).

Alguns estudos relataram que o metabólito da MEL, cíclico-3-hidroxiMEL, é ainda mais potente que a MEL em eliminar o radical hidroxila e outras ERO (Tan et al., 2014; Reiter et al., 2014; Zavala-Oseguera et al., 2014). Este também é o caso de seu metabólito terciário, AMK (Ressmeyer et al., 2003; Mayo et al., 2005; Galano et al., 2013). AFMK também é uma molécula central do metabolismo da MEL durante sua quebra enzimática e durante sua interação com ERO ou ERN. Esta propriedade indica que AFMK doa dois elétrons em diferentes potenciais para funcionar como uma molécula redutora. Como resultado, AFMK pode doar um elétron adicional para neutralizar os radicais em contraste com os antioxidantes moleculares pequenos clássicos, incluindo vitamina C e E (Tan et al., 2001).

Os resultados obtidos nas análises de estresse oxidativo se confirmaram através da biologia de sistemas, onde a MEL demonstrou alta interação com proteínas envolvidas na resposta ao estresse.

No presente estudo, além dos danos oxidativos, o consumo da CAF durante 21 semanas apresentou uma maior incidência de danos ao DNA em células sanguíneas, de fígado e rim avaliados através do ensaio cometa. O ensaio cometa detecta quebras de fita simples e dupla, sítios álcali-labéis e ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteína em células eucarióticas (Singh et al., 1988). No entanto, a suplementação de MEL nos diferentes grupos experimentais reduziu significativamente os danos nos diferentes tecidos avaliados. Outros estudos também haviam demonstrado que uma dieta rica em *fast foods* é capaz de induzir danos

genotóxicos em tecidos cerebrais e periféricos (Leffa et al., 2014; Zanardini et al., 2017; Strapazzon, 2019; Beretta, 2020).

Os danos ao DNA encontrados podem estar sendo causados pelo estresse oxidativo, que ocasiona a oxidação de ácidos graxos nas membranas biológicas; como consequência desta reação em cadeia, peróxidos lipídicos e radicais alcoxil, bem como aldeídos e cetonas são formadas (Lü et al., 2010). Algumas dessas moléculas atacam o DNA e foram postuladas como desempenhando um papel fundamental na etiologia do câncer e de outras doenças (Lobo et al., 2010). Também a formação de produtos de glicação avançada, efeitos hormonais e encurtamento de telômeros são fenômenos que podem levar à instabilidade genômica na obesidade (Setayesh et al., 2018).

Os produtos finais de glicação avançada (*Advanced glycation end products* (AGEs)) são formados como consequência de reações entre frações de açúcar e proteínas (Poulsen et al., 2013; Nedic et al., 2013; Ott et al., 2014). Os AGEs ligam-se no corpo humano a receptores específicos (receptor de produtos finais de glicação avançada) que estão envolvidos em diferentes vias de sinalização. Essas interações causam a formação de ERO por meio da ativação da NADH oxidase que leva à ativação de vários fatores de transcrição, incluindo NF-Kb (Morgan e Liu, 2011). O consumo de dietas ricas em carboidratos leva a formação de AGEs que podem causar danos ao DNA de forma direta ou através de vias de sinalização (Setayesh et al., 2018).

Pessoas obesas apresentam uma ampla gama de lesões no DNA, como quebras de fita dupla, quebras de fita simples ou bases oxidadas e cerca de 2 vezes mais danos em linfócitos do que indivíduos com peso normal. Também foi observado uma correlação entre o IMC e danos ao DNA (Sancar, 1995; Bukhari et al., 2011; Wlodarczyk et al., 2019). A oxidação de bases é o principal dano ao DNA que resulta de um ataque de ERO. Resíduos de guanina são os alvos mais comuns e a 8-oxodG é uma das lesões mais frequentes observadas nas células (Hedge et al., 2008; Agnez-Lima et al., 2012).

Além disso, foi avaliado a mutagenicidade da CAF em eritrócitos jovens nos animais alimentados com esta dieta rica em alimentos *fast food*. Dessa forma, pode-se observar através do teste de MN - que avalia mutações cromossômicas através de eventos clastogênicos e aneugênicos (Krishna e Hayashi, 2000) - que a CAF causou danos mutagênicos. No entanto, a MEL foi eficaz em diminuir os danos, resultado este

observado nos grupos CAF + MEL e CAF / CAF + MEL, com grande potencial de redução (aproximadamente 74% e 78%, respectivamente).

A inflamação crônica associada à obesidade está fortemente envolvida na formação de lesões no DNA (Setayesh et al., 2018). Macrófagos ativados secretam citocinas, como TNF- α e IL-6, que podem induzir danos ao DNA em tecido não direcionado, distante do local da inflamação (Arango Duque e Descoteaux, 2014). Essas citocinas direcionam-se a diferentes regiões do corpo e lá ativam macrófagos que produzem moléculas pró-inflamatórias, tais como COX2, NOS, superóxido e óxido nítrico (Speed et al., 2011; Rastogi et al., 2013). Sendo assim, o aumento do estado pró-inflamatório que está presente nos animais alimentados com CAF pode estar levando à um acúmulo de lesões ao DNA, avaliados, por exemplo, através do ensaio cometa e teste de MN.

A ocorrência de lesões no DNA pode induzir mutações durante a replicação desta macromolécula, pois o 8-OHdG pode causar uma mudança de GC para TA (transversão), resultando em mutagênese e iniciação do câncer (Sova et al., 2010).

No trabalho de Bankoglu et al. (2018) a perda de peso induzida por cirurgia bariátrica levou a uma redução significativa na frequência de MN em linfócitos após 12 meses da cirurgia. Curiosamente, comorbidades como diabetes mellitus tipo 2 e síndrome metabólica parecem ter um impacto adicional na frequência de micronúcleos de linfócitos (Bankoglu et al., 2018), uma vez que altas frequência de MN estão presentes em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (Martínez-Perez et al., 2007).

A MEL reduziu significativamente os danos causados ao DNA em sangue, fígado e rim avaliados através do parâmetro *tail intensity* no ensaio cometa e também em medula óssea uma vez que foi observado a redução de EPCMn, destacando seu potencial efeito antigenotóxico. Corroborando com estes resultados, camundongos que foram suplementados com MEL (2 mg/L) em diferentes fases da vida até o envelhecimento apresentaram uma redução dos danos ao DNA avaliados através do ensaio cometa e teste MN (Damiani et al., 2020).

Coelho et al. (2018) também objetivaram avaliar o efeito antigenotóxico de MEL na prole de fêmeas que consumiram álcool durante o período gestacional, assim observaram que a administração de MEL via gavagem (10 e 15 mg/kg) reduziu os danos em sangue, fígado e cérebro dos animais. Resultados semelhantes foram encontrados em outro estudo que avaliou o efeito da MEL (10 mg/kg) sobre os danos ao DNA induzidos por um pesticida durante os 21 dias de gestação. Ao final do período

experimental, a prole das fêmeas que foram tratadas com o pesticida e suplementadas concomitantemente com MEL apresentaram menores danos genotóxicos (Marinho et al., 2019).

Os resultados dos trabalhos citados acima são atribuídos aos efeitos antioxidantes da MEL. Tais efeitos podem acontecer através da estimulação de enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase, catalase e SOD (Rodriguez et al., 2004; Tomas-Zapico et al., 2005), mas no presente estudo atribuímos a diminuição dos danos ao DNA principalmente à sua capacidade e de seus metabólitos de eliminar ERO, uma vez que a MEL pode interagir diretamente com H_2O_2 sendo convertida em seu metabólito AFMK (Tan et al., 2000), que ajuda a preservar a integridade do DNA, reduzindo o substrato necessário para a geração de radical OH e protegendo o DNA do dano oxidativo, por ser um eliminador de radicais livres (Hardeland, 2005).

Outra característica da MEL que a torna eficiente em reduzir os danos ao DNA nos tecidos avaliados, é por ser um hormônio anfifílico, que permite que atravessasse as barreiras fisiológicas, fornecendo proteção local ao DNA (Reiter et al., 2013).

O aumento do peso corporal está relacionado com distúrbio na via de resposta ao dano ao DNA (Himbert et al., 2017). O sistema de reparo do DNA existe para, de fato, reparar os danos ao DNA e manter a integridade da estrutura do mesmo. Em geral, o processo de reparo de danos ao DNA envolve o reconhecimento do dano por sensores específicos, geração e amplificação do sinal de dano, transdução desse sinal para o citoplasma e ativação de efetores específicos (Sova et al., 2010).

Dentre vários mecanismos conhecidos de reparo do DNA, o reparo direto ocorre durante a replicação, enquanto o reparo indireto ocorre após a síntese do DNA (Slyskova et al., 2014). A estratégia de reparo indireto inclui reparo de excisão de base (BER), reparo de excisão de nucleotídeo (NER), reparo de incompatibilidade (MMR), a junção de extremidade não homóloga e as vias de recombinação homóloga (Włodarczyk e Nowicka, 2019).

A BER é a principal via de reparo de DNA para lesões de DNA oxidado, é realizada por DNA glicosilase, OGG1, que removem bases de DNA modificadas por clivagem da ligação N-glicosídica entre a base e a pentose, isso cria um sítio abásico (apurínico ou apirimidínico), também conhecido como sítio AP, que pode ser posteriormente transformado em uma quebra de fita de DNA por uma atividade endonucleolítica da mesma glicosilase ou uma endonuclease AP, APE1. A lacuna é

preenchida por uma DNA polimerase e selada por uma DNA ligase (Jagannathan et al., 2006).

A presença de obesidade está relacionada com alterações no reparo de quebras de fitas duplas induzidas por agente genotóxicos (Azzara et al., 2016), além disso, uma associação inversa entre o IMC e a capacidade de NER foi encontrada em mulheres jovens (Tyson et al., 2009). Sendo assim, acredita-se que a produção exacerbada de ERO está associada à modulação da resposta ao dano ao DNA por meio do impacto nas expressões de genes que estão envolvidos no reparo do DNA (Adcock et al., 2005; Kidane et al., 2014).

Dessa forma, avaliou-se os efeitos da ingestão de CAF sobre as duas principais enzimas da via da BER, OGG1 e APE1, contudo apenas foi observado diferença significativa dos níveis proteicos de OGG1 nos animais alimentados com *fast foods*.

Este foi o primeiro trabalho a avaliar os efeitos da CAF sobre a via da BER, dessa forma, supõe-se que essa dieta rica em alimentos ultraprocessados que está levando os animais a se tornarem obesos induz a uma diminuição na expressão de OGG1, uma vez que o trabalho de Lohr et al. (2015) demonstrou que ratos Zucker obesos apresentaram uma diminuição da expressão de OGG1 enquanto que os ratos magros apresentavam essa expressão aumentada. Outra hipótese, é que a OGG1 está sujeita a uma variedade de modificações pós-tradução que reduzem ou aumentam sua atividade, dessa forma, a CAF pode estar induzindo a uma alteração pós-traducional da OGG1, prejudicando, dessa forma, o reparo do DNA. Ademais, o estresse oxidativo levando a danos oxidativos ao DNA causa uma diminuição da expressão de OGG1 sendo que este fato está relacionado com a diminuição de PGC-1 α – família de cofatores de transcrição envolvidos na β -oxidação - na obesidade. Sendo assim, a função mitocondrial é sobrecarregada e por consequência prejudicada, levando a um aumento da produção de radicais livres, que então causam danos às macromoléculas (Sampath e Lloyd, 2019). Com relação a APE1, a CAF não alterou essa proteína envolvida com a maquinaria de reparo do DNA.

Considerando que a MEL reduziu os danos ao DNA em diferentes tecidos e também a mutagenicidade da dieta CAF, objetivou-se avaliar o efeito da MEL sobre as proteínas envolvidas com o BER. Dessa forma, no presente trabalho foi observado que a MEL suplementada durante as 21 semanas melhorou os níveis de OGG1 no grupo CAF + MEL, porém não foram observados seus efeitos em relação à APE1.

Damiani et al. (2020) avaliaram diferentes tempos de suplementação de MEL sobre o envelhecimento e constataram que esse hormônio foi capaz de reduzir os danos ao DNA em tecido cerebral, fígado, rim e também apresentou efeito antimutagênico. Ademais, os níveis de OGG1 e APE1 neste mesmo estudo foram maiores nos animais com maior tempo de suplementação. Dessa forma, a ação da MEL sobre as enzimas envolvidas na BER parece ser maior quando a ingestão ocorre num período maior de tempo.

Com o objetivo de contribuir para o entendimento de como a MEL estaria reduzindo os danos no DNA e de qual forma ela estaria atuando no processo de reparo no material genético, foi utilizado da biologia de sistemas. No presente estudo proteínas relacionadas com a obesidade foram prospectadas juntamente com proteínas relacionadas à MEL. Os bioprocessos foram identificados a partir da análise da ontologia gênica, onde o *cluster* que está relacionado com o processo de reparo do DNA é o *cluster 2*, que também mostrou bioprocessos como fosforilação, resposta ao estresse oxidativo e regulação positiva da MAPK.

A partir dos resultados obtidos foi possível propor uma nova hipótese de como a MEL estaria atuando no reparo do DNA na obesidade (figura 20). O presente modelo sugere que a MEL atua através de receptores acoplados à proteína G (MT1 e MT2) e dessa forma através da fosforilação de proteínas que culminarão no reparo do DNA por recombinação homóloga (do inglês "*homologous recombination*" - HR) e por união de extremidade não-homóloga (do inglês "*Non-homologous end joining*" – NHEJ) na obesidade. Entre as proteínas presentes no *cluster 2* destacam-se mTOR, AKT, via da MAPK, Pi3K e o gene PRKCB que codifica a proteína DNA-PK.

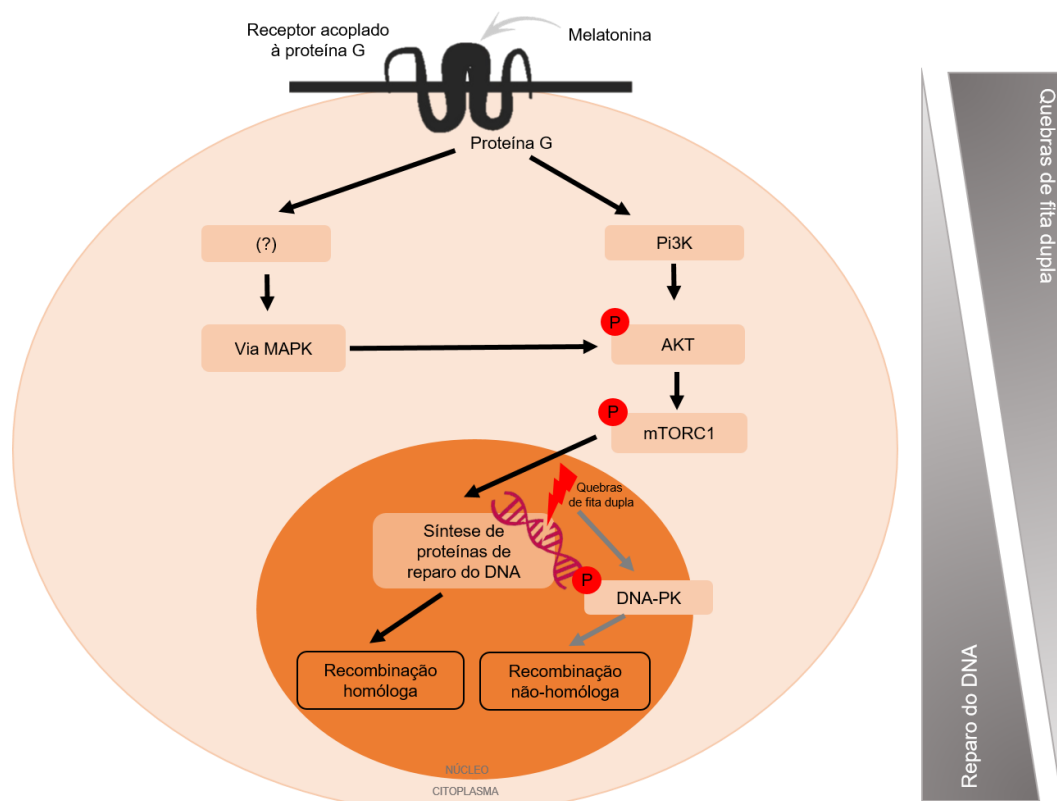


Figura 20: Modelo molecular do mecanismo de ação no reparo do dano ao DNA induzido pela obesidade. A melatonina age através de receptores acoplados à proteína G e pode atuar no reparo do DNA através de três vias: ativação da via da MAPK que induz à síntese de proteínas de reparo do DNA por recombinação homóloga ou através da PI3K, que fosforila a AKT e por sua vez a mTORC1 que também leva ao reparo do DNA por recombinação homóloga. Além disso, quebras de fita dupla levam a ativação da DNA-PK, proteína que também é ativada pela melatonina, e leva ao reparo do DNA através de recombinação não-homóloga. MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês mitogen-activated protein kinase); PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; AKT: proteína quinase B; mTORC1: alvo de mamíferos do complexo 1 da rapamicina; DNA-PK: proteína quinase dependente de DNA.

De uma forma geral, a MEL poderia atuar por três diferentes vias, sendo todas elas através de receptores acoplados à proteína G, dessa forma levaria à fosforilação de mTOR através de PI3K e também pela via de MAPK, e assim levar à transcrição de proteínas envolvidas com o reparo do DNA por HR. Além disso, a MEL também demonstrou estar envolvida com a ativação de DNA-PK que ativaria a via de reparo do DNA por NHEJ.

Além das enzimas envolvidas no reparo do DNA, no presente trabalho também foi avaliado o nível proteico de NRF2 em fígado dos diferentes grupos experimentais e foi demonstrado que com o consumo de CAF houve uma diminuição desse fator de transcrição, sendo que a suplementação de MEL foi capaz de aumentar a quantidade proteica de NRF2.

O NRF2 é considerado a principal defesa em resposta a ERO e estresse oxidativo, bem como inflamação. A regulação do estresse oxidativo pela via de

sinalização NRF2 está relacionada ao seu impacto na expressão de genes que envolvem a codificação de enzimas de resposta de fase II, como heme oxigenase-1 (HO-1), glutathione-s-transferase (GST), CAT, SOD e NADPH quinona desidrogenase 1 (NQO1) (Guo et al., 2017). Em situações de estresse celular, a via do NRF2 passa por regulação positiva para diminuir e até inibir o estresse, demonstrando o papel vital desta via de sinalização na manutenção da homeostase (de la Vega et al., 2018).

Quando ocorre a inibição de NRF2, diversas proteínas são transcritas e estão envolvidas com o aumento do estado pró-inflamatório de adipócitos e armazenamento de ácidos graxos, demonstrando que, quando expresso, há efeitos benéficos sobre a obesidade (Hayes e Dinkova-Kostova, 2014; Vasileva et al., 2020).

Como citado anteriormente, a MEL foi eficaz em aumentar os níveis proteicos de NRF2. Alguns estudos já avaliaram o efeito deste hormônio sobre o fator de transcrição NRF2, tais como em um estudo com células pancreáticas, que demonstra que a MEL estimula e aumenta a translocação nuclear e fosforilação de Nrf2 através da sinalização de protein kinase C (PKC) e Ca^{2+} levando à diminuição do estresse oxidativo nessas células (Santofimia-Castaño et al., 2015). Também Trivedi et al. (2016) examinaram o efeito da MEL sobre a colite associada à carcinogênese do cólon (CACC). Eles observaram que a administração de MEL atenua a inflamação e o estresse oxidativo e também inibe o mecanismo de autofagia, diminuindo a progressão de CACC e esse efeito protetivo foi associados à ativação da via de sinalização NRF2 (analisado através de *Western blot*). Além disso, Damiani et al. (2018) avaliaram o efeito de 3, 9, 15 e 18 meses de suplementação de MEL em camundongos velhos e observaram que o maior tempo de suplementação obteve um aumento da expressão das enzimas antioxidantes estimuladas por NRF2.

De uma forma geral, a MEL utiliza quatro mecanismos para estimular a via do NRF2: (1) inibição de Keap1; (2) aumentando a translocação nuclear de NRF2; (3) promovendo a expressão de mRNA e proteica de NRF2; e (4) ativação de mediadores de NRF2, tais como PKC (Ahmadi e Ashrafizadeh, 2019).

No presente estudo, pode-se observar que os melhores resultados são provenientes dos grupos que foram suplementados por mais tempo e que não tiveram a interrupção de administração de MEL, uma vez que seus efeitos são reduzidos assim que ocorre a interrupção da sua administração. Cipolla-Neto et al. (2014) avaliaram o efeito da suplementação MEL em animais obesos com 10 meses de idade até completaram 22 meses. Com isso, demonstraram uma redução na massa corporal

e gordura visceral, sendo que a redução de peso apareceu dentro de duas semanas e persistiu durante todo o período, porém quando ocorreu a interrupção da administração de MEL, os animais voltaram a ganhar peso.

Resumidamente, a CAF é uma ótima ferramenta para induzir a obesidade semelhante à dos seres humanos, pois conta com uma variedade de alimentos ultraprocessados, com elevado carboidratos, sódio, aditivos químicos e corantes. Contudo, a MEL se mostrou eficaz em atenuar as alterações ocasionados pela obesidade em animais alimentados durante 21 semanas com *fast food*, sendo que seus efeitos antioxidantes são mais satisfatórios quando suplementada em um período maior de tempo e de forma concomitante ao que está ocasionando as alterações metabólicas, moleculares e bioquímicas.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos do presente estudo, pode-se concluir que a MEL age principalmente através da sua capacidade antioxidante e também de seus metabólitos de primeira, segunda e terceira geração, uma vez que são todos considerados excelentes captadores de radicais livres. A partir disso, a MEL é capaz de diminuir ERO e radicais livres, e por consequência modular a resposta ao dano ao DNA, além de proteínas chaves no reparo ao dano, especialmente através da recombinação homóloga e não-homóloga. Além disso, a MEL foi capaz de reverter o quadro de dislipidemia presente nos animais alimentados com CAF e reduzir a inflamação ocasionada por esta dieta.

Vale ressaltar que este foi o primeiro trabalho a avaliar os efeitos antioxidantes da MEL sobre danos ao DNA causado pela obesidade, induzido através da CAF, mimetizando a dieta em que a maioria dos indivíduos estão expostos nos últimos anos.

REFERÊNCIAS

- Ackermann K, Stehle JH. Melatonin synthesis in the human pineal gland: Advantages, implications, and difficulties. *Chronobiol Int.* 2006;23:369–379.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López, LC, Rosales-Corral S, Tan D, Reiter RJ. Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71:2997–3025.
- Adcock IM, Cosio B, Tsaprouni L, Barnes PJ, Ito K. Redox regulation of histone deacetylases and glucocorticoid-mediated inhibition of the inflammatory response. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:144–152.
- Adedokun KA, Olisekodiaka J, Adeyeye AD, Muhibi MA, Ojokuku H, Akinlawon AA, Abdufatah OA, Adetoro T, Adevale AK, Roji SM. Castelli Risk Index, Atherogenic Index of Plasma, and Atherogenic Coefficient: Emerging Risk Predictors of Cardiovascular Disease in HIV-Treated Patients. *Saudi J Med Pharm Sci.* 2017;3:1101-1110.
- Agil A, El-Hammadi M, Jiménez-Aranda A, Tassi M, Abdo W, Fernández-Vázquez G, Reiter RJ. Melatonin reduces hepatic mitochondrial dysfunction in diabetic obese rats. *J Pineal Res.* 2015;59(1):70–79.
- Agil A, Navarro-Alarcon M, Ruiz R, Abuhamadah S, El-Mir MY, Vázquez GF. Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res* 2011;50:207–212.
- Agnez-Lima LF, Melo JT, Silva AE, Oliveira AH, Timoteo AR, Lima-Bessa KM, Martinez GR, Medeiros MHG, Mascio PD, Galhardo RS, Menck CFM . DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutat Res/Rev Mutat Res.* 2012;751:15–28.
- Ahmadia Z, Ashrafizadeh M. Melatonin as a potential modulator of Nrf2. *Fundamental & Clinical Pharmacology.* 2020;34:11–19.
- Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001;302:141-145.
- Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* 2011;164:899-904.
- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009;120:1640–1645.

Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;15:539–553.

Almeida W, Fatima A. Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. *Quim Nova.* 2008;31(5):1170-1179.

Amirkhizi F, Siassi F, Minaie S, Djalali M, Rahimi A, Chamari M. Is obesity associated with increased plasma lipid peroxidación and oxidative stress in women. *ARYA Atheroscler J.* 2007;2:189–192.

Anisimov VN, Alimova IN, Baturin DA, Popovich IG, Zabezhinski MA, Rosenfeld SV, Manton KG, Semenchenko AV, Yashin AI. Dose- dependent effect of melatonin on life span and spontaneous tumor incidence in female SHR mice. *Exp Gerontol.* 2003;38:449-461.

Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* 2014;5:491.

Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO). Mapa da obesidade. 2019. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/atitude-saudavel/mapa-obesidade>.

Azevedo A, Santos AC, Ribeiro L, Azevedo I. The metabolic syndrome. In: Soares R, Costa C. *Oxidative Stress, Inflammation and Angiogenesis in the Metabolic Syndrome*. New York, NY: Springer Science; 2009. 1–19.

Azzara A, Pirillo C, Giovannini C, Federico G, Scarpato R. Different repair kinetic of DSBs induced by mitomycin C in peripheral lymphocytes of obese and normal weight adolescents. *Mutat. Res.* 2016;789:9–14.

Bader GD, Hogue CW. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics.* 2003;4:2.

Bankoglu EE, Arnold C, Hering I, Hankir M, Seyfried F, Stopper H. Decreased Chromosomal Damage in Lymphocytes of Obese Patients After Bariatric Surgery. *Sci Rep.* 2018;8:11195.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987;32:279-312.

Barabasi, AL, Oltavi ZN. Understanding the Cell's Functional Organization. *Nature Reviews Genetics.* 2004;5:101–113.

Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghatei MA, Cone RD, Bloom SR. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature.* 2002;418(6898):650-654.

Beilharz JE, Maniam J, Morris MJ. Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats, *Brain Behav. Immun.* 2014;37:134–141.

Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society*. 1995;57:289–300.

Beretta ACL. Avaliação da suplementação de ômega-3 em camundongos alimentados com uma dieta cafeteria [dissertação de mestrado]. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2020.

Betz MJ, Enerback S. Human brown tissue: what we have learned so far. *Diabetes*. 2015;64(7):2352-2360.

Bonnefont-Rousselot D, Collin F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. 2010;278:55–67.

Brandão JM, Fernandes CS, Barroso SG, Rocha GS. Association of fiber intake and cardiovascular risk in elderly patients. *Internacional J Cardiovascular Sci*. 2016;28:464-471.

Brouns F. Overweight and diabetes prevention: is a low-carbohydrate–high-fat diet recommendable? *European Journal of Nutrition*. 2018;57:1301-1312.

Bruno Halpern. O papel da melatonina na regulação do tecido adiposo marrom. 2018. São Paulo: São Paulo.

Bryan S, Baregzay B, Spicer D, Singal PK, Khaper N. Redox-inflammatory synergy in the metabolic syndrome. *Can J Physiol Pharmacol*. 2013;91:22–30.

Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med*. 1997;336:186-195.

Bukhari SA, Rajoka MI, Ibrahim Z, Jalal F, Rana SM, Nagra SA. Oxidative stress elevated DNA damage and homocysteine level in normal pregnant women in a segment of Pakistani population. *Mol. Biol. Rep*. 2011;38:2703–2710.

Buyukdere Y, Gulec A, Akyol A. Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats. *PeerJ*. 2019;7:e6656.

Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, Tiffany CR, Cevallos SA, Lokken KL, Torres TP, Byndloss AJ, Faber F, Gao Y, Litvak Y, Lopez CA, Xu G, Napoli E, Giulivi C, Tsois RM, Revzin A, Lebrilla C, Baumler AJ. Microbiota-activated PPAR- γ -signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science*. 2017;357(6351):570–575.

Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 2004;84:277–359.

Cao ZW, Fang YL, Lu YH, Tan DX, Du CH, Li YM, Ma QL, Yu JM, Chen MY, Zhou C, Pei L, Zhang L, Ran H, He M, Yu Z, Zhou Z. Melatonin alleviates cadmium-induced liver injury by inhibiting the TXNIP-NLRP3 inflammasome. *J Pineal Res*. 2017;62(3).

Carnethon MR, Loria CM, Hill JO, Sidney S, Savage PJ, Liu K. Risk factors for metabolic syndrome: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study, 1985–2001. *Diabetes Care*. 2004;27:2707–2715.

Castelli WP. Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease - the Framingham Heart Study. *Can J Cardiol* 1988;4:5A-10A.

Chandel NS, Schumacker PT, Arch RH. Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. *J Biol Chem*. 2001;276:42728–42736.

Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, Poole AC, Srinivasan S, Ley RE, Gewirtz AT. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*. 2015;519:92–96.

Chechi K, Nedergaard J, Richard D. Brown adipose tissue as an anti-obesity tissue in humans. *Obes Rev*. 2014;15(2):92-106.

Chojnacki C, Blonska A, Chojnacki J. The effects of melatonin on elevated liver enzymes during statin treatment. *BioMed Res In*. 2017; 3204504.

Chojnacki C, Wiśniewska-Jarosińska M, Kulig G, Majsterek I, Reiter RJ, Chojnacki J. Evaluation of enterochromaffin cells and melatonin secretion exponents in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2013;19(23):3602.

Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *J Pineal Res*. 2014;56:371–381.

Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *SleepMed Rev*. 2005;9:11–24.

Cobb LK, Appel LJ, Franco M, Jones-Smith JC, Nur A, Anderson CA. The relationship of the local food environment with obesity: a systematic review of methods, study quality, and results. *Obesity*. 2015;23:1331–1344.

Coelho IDDS, Neto CJCL, Souza TGS, Silva MA, Chagas CA, Santos KRP, Teixeira VW, Teixeira AAC. Protective effect of exogenous melatonin in rats and their offspring on the genotoxic response induced by the chronic consumption of alcohol during pregnancy. *Mutat Res Gen Tox En*. 2018;832:52-60.

Collins A, Dusinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K, Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen*. 1997;30:139-146.

Corrales A, Vidal R, García S, Vidal V, Martínez P, García E, Flórez J, Sanchez-Barceló EJ, Martínez-Cué C, Rueda N. Chronic melatonin treatment rescues electrophysiological and neuromorphological deficits in a mouse model of Down syndrome. *J Pineal Res*. 2014;56:51-61.

Cousin B, Cinti S, Morroni M, Raimbault S, Ricquier D, Pénicaud L, et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci.* 1992;103:931–942.

Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: A growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12:722–734.

Czech MP. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature Medicine.* 2017;23(7):804–814.

Damiani AP, Strapazzon G, Sardinha TTO, Rohr P, Gajski G, Pinho RA, Andrade VM. Melatonin supplementation over different time periods until ageing modulates genotoxic parameters in mice. *Mutagenesis.* 2020;35:465–478.

Das UN. A defect in the activity of Delta6 and Delta5 desaturases may be a factor predisposing to the development of insulin resistance syndrome. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005;72:343–350.

David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.* 2014;505:559–563.

de la Vega MR, Chapman E, Zhang DD. NRF2 and the hallmarks of cancer. *Cancer Cell.* 2018;34:21–43.

De Sibio MT, Luvizotto RA, Olimpio RM, Corrêa CR, Marino J, de Oliveira M, Conde SJ, Ferreira AL, Padovani CR, Nogueira CR. A comparative genotoxicity study of a supraphysiological dose of triiodothyronine (T₃) in obese rats subjected to either calorie-restricted diet or hyperthyroidism. *PloS one.* 2013;8:e56913.

Demerdash HM. Role of Oxidative Stress and Associated Alteration in Enzyme Activities in Obesity Comorbidities. *Obes Res Open J.* 2017;4:32–43.

DeSalvo KB, Olson R, Casavale KO. Dietary guidelines for Americans. *JAMA.* 2016;315:457–458.

Dias FM, Leffa DD, Daumann F, Marques SO, Luciano TF, Possato JC, Santana AA, Neves RX, Rosa JC, Oyama LM, Rodrigues B, Andrade VM, Souza CT, Lira FS. Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice intake protects against alterations to proteins involved in inflammatory and lipolysis pathways in the adipose tissue of obese mice fed a cafeteria diet. *Lipids Health Dis.* 2014;13:24.

Diniz YS, Faine LA, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GX, Burneiko RC, Cicogna AC, Novelli EL. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. *Nutrition.* 2005;21:749–755.

Diniz YS, Fernandes AA, Campos KE, Mani F, Ribas BO, Novelli EL. Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. *Food Chem Toxicol.* 2004;42:313–319.

Elwakkad A, Hassan NM, Sibaii H, El-Zayat S, Sherif L, Hameed ERA, Shaheed AA. Relationship between obesity and 8-hydroxy-2-deoxy guanosine as an oxidative marker in obese adolescents of Giza. *J Med Sci*. 2011;11:231–235.

Erenberk U, Dundaroz R, Gok O, Uysal O, Agus S, Yuksel A, Yilmaz B, Kilic U. melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology* 2000 Feb;141(2):487-97.

Erridge C. Stimulants of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 are abundant in certain minimally-processed vegetables. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2011b;49:1464–1467.

Erridge C. The capacity of foodstuffs to induce innate immune activation of human monocytes in vitro is dependent on food content of stimulants of Toll-like receptors 2 and 4. *Br J Nutr*. 2011a;105:15–23.

Espino J, Bejarano I, Ortiz A, Lozano GM, García JF, Pariente JA, Rodríguez AB. Melatonin as a potential tool against oxidative damage and apoptosis in ejaculated human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2010;94:1915–1917.

Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*. 2004;20:218–224.

Esteban-Zubero E, Alatorre-Jiménez MA, López-Pingarrón L, Reyes-Gonzales MC, Almeida-Souza P, Cantín-Golet A, Ruiz-Ruiz FJ, Tan DX, García JJ, Reiter, RJ. Melatonin's role in preventing toxin-related and sepsis-mediated hepatic damage: A review. *Pharmacol Res*. 2016;105:108-120.

Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2020;19:55–71.

Farias TSM, Cruz MM, de Sa, RCC, Severi I, Perugini J, Senzacqua M, Cerutti SM, Giordano A, Cinti S, Alonso-Vale MIC. Melatonin Supplementation Decreases Hypertrophic Obesity and Inflammation Induced by High-Fat Diet in Mice *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:750.

Favero G, Rodella LF, Reiter RJ, Rezzani R. Melatonin and its atheroprotective effects: a review. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;382:926–937.

Favero G, Stacchiotti A, Castrezzati S, Bonomini F, Albanese M, Rezzani R, Rodella LF. Melatonin reduces obesity and restores adipokine patterns and metabolism in obese (ob/ob) mice. *Nutrition Research*. 2015;35:891–900.

Feltes BC, Bonatto D, da Silva, FR, Poloni JF. *Biologia de Sistemas*. In: Verli H. *Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Moleculares*. 1ª ed. São Paulo: SBBq, 2014. p. 282.

Fernández-Mar M, Mateos R, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chem.* 2012;130:797–813.

Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci.* 2011;12:3117–3132.

Ferreira RAP, Ramos PS, Salvador AA, Silva AAN, Rossetti FX, Tamasia GA, Vicentini MS, Bello RSB. The effect of the use of melatonin in the treatment of intestinal inflammatory diseases: an integrative review. *Res Soc Dev.* 2019;8(9):e17891263.

Fideleff HL, Boquete H, Fideleff G, Albornoz L, Lloret SP, Suarez M, Esquifino AI, Honfi M, Cardinali DP. Gender-related differences in urinary 6-sulfatoxymelatonin levels in obese pubertal individuals. *J Pineal Res.* 2006; 40:214–218.

Flint A, Rabben A, Rehfeld JF, Holst JJ, Astrup A. The effect of glucagon-like peptide-1 on energy expenditure and substrate metabolism in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24(3):288-98.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: From theory to practice. *J Pediatr.* 2007;83:192–203.

Forman JP, Curhan GC, Schernhammer ES. Urinary melatonin and risk of incident hypertension among young women. *J Hypertens.* 2010;28:446–451.

Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. Los colores del tejido adiposo. *Gac Med Mex.* 2020;156:143-150.

Frontini A, Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab.* 2010;11(4):253-6.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Investig.* 2004;114:1752–1761.

Galano A, Castañeda-Arriaga R, Pérez-González A, Tan DX, Reiter RJ. Phenolic melatonin-related compounds: Their role as chemical protectors against oxidative stress. *Molecules* 2016a;21:1442.

Galano A, Tan DX, Reiter J. Melatonin: A Versatile Protector against Oxidative DNA Damage. *Molecules.* 2018;23:530.

Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and related compounds: chemical insights into their protective effects against oxidative stress. *Curr Org Chem.* 2016b;21:1–19.

Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res.* 2011;51:1–16.

Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res.* 2013;54:245–257.

Gao CL, Zhu C, Zhao YP, Chen XH, Ji CB, Zhang CM, Zhu JG, Xia ZK, Tong ML, Guo XR. Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;320:25–33.

Gao T, Wang Z, Cao J, Dong Y, Chen Y. Melatonin attenuates microbiota dysbiosis of jejunum in short-term sleep deprived mice. *J Microbiol.* 2020;58(7):588-597.

Genario R, Cipolla-Neto J, Bueno AA, Santos HO. Melatonin supplementation in the management of obesity and obesity-associated disorders: A review of physiological mechanisms and clinical applications. *Pharmacol Res.* 2021;163:105254.

Gennuso KP, Gangnon RE, Thraen-Borowski KM, Colbert LH. Doseresponse relationships between sedentary behaviour and the metabolic syndrome and its components. *Diabetologia* 2015;58:485-492.

Ghosh G, De K, Maity S, Bandyopadhyay D, Bhattacharya S, Reiter RJ, Bandyopadhyay A. Melatonin protects against oxidative damage and restores expression of GLUT4 gene in the hyperthyroid rat heart. *J Pineal Res.* 2007;42:71-82.

Ginés I, Gil-Cardoso K, Serrano J, Casanova-Martí A, Blay MT, Pinent M, Ardévol A, Terra X. Effects of an Intermittent Grape-Seed Proanthocyanidin (GSPE) Treatment on a Cafeteria Diet Obesogenic Challenge in Rats. *Nutrients.* 2018;10:1-15.

Giudetti AM, Di Bonaventura MVM, Ferramosca A, Longo S, Di Bonaventura EM, Friuli M, Romano A, Gaetani S, Cifani C. Brief daily access to cafeteria-style diet impairs hepatic metabolism even in the absence of excessive body weight gain in rats. *The FASEB Journal.* 2020;34:9358–9371.

Giudetti AM, Testini M, Vergara D, Priore P, Damiano F, Gallelli CA, Romano A, Villani R, Cassano T, Siculella L, Gnoni GV, Moles A, Coccurello R, Gaetani S. Chronic psychosocial defeat differently affects lipid metabolism in liver and white adipose tissue and induces hepatic oxidative stress in mice fed a high-fat diet. *FASEB J.* 2019;33:1428-1439.

Golan K, Kumari A, Kollet O, Khatib E, Mohana M, Subramaniam D, Ferreira ZS, Avemaria F, Rzeszotek S, García-García A, Xie S, Flores-Figueroa E, Gur-Cohen S, Itkin T, Ludin-Tal A, Ciechanowicz K, Brandis A, Mehlman T, Bhattacharya S, Bertagna M, Cheng H, Petrovich-Kopitman E, Janus T. Daily Onset of Light and Darkness Differentially Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Maintenance. *Cell Stem Cell.* 2018;23-572-585.

Gomez-Smith M, Karthikeyan S, Jeffers MS, Janik R, Thomason LA, Stefanovic B, Corbett D. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiol Behav.* 2016;167:382–391.

Gonciarz M, Bielanski W, Partyka R, Brzozowski T, Konturek PC, Eszyk J, Celiński K, Reiter RJ, Konturek SJ. Plasma insulin, leptin, adiponectin, resistin, ghrelin, and melatonin in nonalcoholic steatohepatitis patients treated with melatonin. *J Pineal Res* 2013;54:154–61.

Guo Y, Sun J, Li T, Zhang Q, Bu S, Wang Q, Lai D. Melatonin ameliorates restraint stress-induced oxidative stress and apoptosis in testicular cells via NF- κ B/iNOS and Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Sci Rep*. 2017;7:9599.

Gutzkow KB, Duale N, Danielsen T, von Stedingk H, Shahzadi S, Instanes C, Olsen AK, Steffensen IL, Hofer T, Törnqvist M, Brunborg G, Lindeman B. Enhanced susceptibility of obese mice to glycidamide-induced sperm chromatin damage without increased oxidative stress. *Andrology*. 2016;4:1102-1114.

Han CY, Umemoto T, Omer M, den Hartigh LJ, Chiba T, LeBoeuf R, Buller CL, Sweet IR, Pennathur S, Abel ED, Chait A. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species increases expression of monocyte chemotactic factor genes in cultured adipocytes. *J. Biol. Chem*. 2012;287:10379–10393.

Han SS, Zhang R, Jain R, Shi H, Zhang L, Zhou G, Sangwung P, Tugal D, Atkins GB, Prosdocimo DA, Lu Y, Han X, Tso P, Liao X, Epstein JA, Jain MK. Circadian control of bile acid synthesis by a KLF15-Fgf15 axis. *Nat Commun*. 2015;6:7231.

Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*. 2005;2:119–130.

Hardeland R. Melatonin and inflammation—Story of a double-edged blade. *J Pineal Res*. 2018;65:e12525.

Hatzis G, Ziakas P, Kavantzias N, Triantafyllou A, Sigalas P, Andreadou I, Ioannidis K, Chatzis S, Filis K, Papalampros A, Sigala S. Melatonin attenuates high fat diet induced fatty liver disease in rats. *World J Hepatol*. 2013;5:160–169.

Hauner H, Bechthold A, Boeing H, Brönstrup A, Buyken A, Leschik-Bonnet E, Linseisen J, Schulze M, Strohm D, Wolfram G. Evidence-based guideline of the German Nutrition Society: carbohydrate intake and prevention of nutrition-related diseases. *Ann Nutr Metab*. 2012;60:1–58.

Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The NRF2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci*. 2014;39:199-218.

Hedge ML, Hazra TK, Mitra S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res*. 2008;18:27–47.

Hegele RA, Joy TR, Al-Attar SA, Rutt BK. Thematic review series: adipocyte biology—lipodystrophies: windows on adipose biology and metabolism. *Journal of Lipid Research*. 2007;48:1433–1444.

Heo JW, No MH, Park DH, Kang JH, Seo DY, Han J, Neufer PD, Kwak HB. Effects of exercise on obesity-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2017;21:567–577.

Herieka M, Faraj TA, Erridge C. Reduced dietary intake of pro-inflammatory Toll-like receptor stimulants favourably modifies markers of cardiometabolic risk in healthy men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2016;26:194–200.

Hibi M, Oishi S, Matsushita M, Yoneshiro T, Yamaguchi T, Usui C, Yasunaga K, Katsuragi Y, Kubota K, Tanaka S, Saito M. Brown adipose tissue is involved in diet-induced thermogenesis and whole-body fat utilization in healthy humans. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(11):1655-1661.

Higa TS, Spinola AV, Fonseca-Alaniz MH, Evangelista FS. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2014;6:47–54.

Hill JH, Solt C, Foster MT. Obesity associated disease risk: the role of inherent differences and location of adipose depots. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2018;19:235–252.

Himbert C, Thompson H, Ulrich CM. Effects of intentional weight loss on markers of oxidative stress, DNA repair and telomere length—A systematic review. *Obes Facts*. 2017;10:648–665.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976;74:214-226.

Holloway CJ, Cochlin LE, Emmanuel Y, Murray A, Codreanu I, Edwards LM, Szmigielski C, Tyler DJ, Knight NS, Saxby BK, Lambert B, Thompson C, Neubauer S, Clarke J. A high-fat diet impairs cardiac high-energy phosphate metabolism and cognitive function in healthy human subjects. *Am J Clin Nutr*. 2011;93:748–755.

Holz GG, Kühtreiber WM, Habener JF. Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagons-like peptide-1 (7–37). *Nature* 1993.361:362–365.

Horowitz MC, Berry R, Holtrup B, Sebo Z, Nelson T, Fretz JA, Lindskog D, Kaplan JL, Ables G, Rodeheffer MS, Macdougald OA, Rosen CJ, Horowitz MC. Bone marrow adipocytes: basic and clinical implications. *Adipocyte*. 2017;6:193–204.
Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444:860e867.

Hsu CH, Chi BC, Casida JE. Melatonin reduces phosphine-induced lipid and DNA oxidation in vitro and in vivo in rat brain. *J Pineal Res*. 2002;32:53–58.

Huether G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia*. 1993;49:665–670.

Hussain MM, Pan X. Circadian regulation of macronutrient absorption. *J Biol Rhythms*. 2015;30, 459–469.

Jagannathan HA, Cole JJ. Hayes, Base excision repair in nucleosome substrates. *Chromosome Res.* 2006;14:27–37.

Jaworowska A, Blackham T, Davies IG, Stevenson L. Nutritional challenges and health implications of takeaway and fast food. *Nutr Rev.* 2013;71:310-318.

Jiménez-Aranda A, Fernández-Vázquez G, Mohammad A-Serrano M, Reiter RJ, Agil A. Melatonin improves mitochondrial function in inguinal white adipose tissue of Zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res.* 2015;57:103-109.

Johnston JD, Skene DJ. Regulation of mammalian neuroendocrine physiology and rhythms by melatonin. *Journal of Endocrinology.* 2015;226:187-198.

Kalsbeek A, Perreau-Lenz S, Buijs RM. A network of (autonomic) clock outputs. *Chronobiol Int.* 2006;23:201–215.

Karamana A, Aydina H, Geckinli B, Cetinkayaa A, Karamanb S. DNA damage is increased in lymphocytes of patients with metabolic syndrome. *Mutation Research.* 2015;782:30–35.

Karamitri A, Jockers R. Melatonin in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2019;15:105–125.

Karbownik-Lewinska M, Szosland J, Kokoszko-Bilska A, Stępniaak J, Zasada K, Gesing A, Lewinski A. Direct contribution of obesity to oxidative damage to macromolecules. *Neuro Endocrinol Lett.* 2012;33:453-461.

Kidane D, Chae WJ, Czochor J, Eckert KA, Glazer PM, Bothwell AL, Sweasy JB. Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014;49(2):116–139.

Klotz LO, Sánchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, Urbánek P, Steinbrenner H, Monsalve M. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol.* 2015;6:51–72.

Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, Tanaka N, Moriguchi T, Motohashi H, Nakayama K, Yamamoto M. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking pro inflammatory cytokine transcription. *Nat Commun.* 2016;7:11624.

Kohlgruber A, Lynch L. Adipose tissue inflammation in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2015;15(11):92.

Konat GW. H₂O₂-induced higher order chromatin degradation: a novel mechanism of oxidative genotoxicity. *J Biosci.* 2003;28:57–60.

Kozirog M, Poliwczak AR, Duchnowicz P, KoterMichalak M, Sikora J, Broncel M. Melatonin treatment improves blood pressure, lipid profile, and parameters of oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *J Pineal Res.* 2011;50:261–266.

Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res.* 2000;455:155-166.

Kuhn M, von Mering C, Campillos M, Jensen LJ, Bork P. STITCH: Interaction networks of chemicals and proteins. *Nucleic Acids Research.* 2008;36.

Kulms D, Zeise E, Pöppelmann B, Schwarz T. DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. *Oncogene.* 2002;21:5844–5851.

Kulshreshtha B, Sharma N, Pant S, Prasad A, Chitkara A, Pahuja B, Pahuja I. Predictors of metabolic syndrome among polycystic ovary syndrome sisters. *J Hum Reprod Sci* 2019;12:334-40.

Kumar S, Alagawadi KR, Rao MR. Effect of *Argyrea speciosa* root extract on DCeteria diet-induced obesity in rats. *Indian J Pharmacol.* 2011;43:163–167.

Kwok KH, Lam KS, Xu A. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Exp Mol Med.* 2016;48:e215.

La Russa D, Giordano F, Marrone A, Parafati M, Janda E, Pellegrino D. Oxidative Imbalance and Kidney Damage in Cafeteria Diet-Induced Rat Model of Metabolic Syndrome: Effect of Bergamot Polyphenolic Fraction. *Antioxidant.* 2019;8:66.

Lavrovsky Y, Chatterjee B, Clark RA, Roy AK. Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. *Exp Gerontol.* 2000;35:521–532.

Leal DT, Fontes GG, Villa JKD, Freitas RB, Campos MG, Carvalho CA, Pizziolo VR, Diaz MAN. Zingiber officinale formulation reduces hepatic injury and weight gain in rats fed an unhealthy diet. *Health Sciences - An Acad Bras Ciênc.* 2019;91:04.

Leffa DD, Silva J, Daumann F, Dajori ALF, Longaretti LM, Damiani DP, Lira F, Campos F, Falcao Ferraz AB, Correa DS. Corrective effects of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice intake on biochemical and genotoxic parameters in mice fed on a high-fat diet. *Mutat Res.* 2014;770:144-152.

Leffa DM, Rezin GT, Daumann F, Longaretti LM, Dajori ALF, Gomes LM, Silva MC, Streck E, Andrade VM. Effects of Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) Juice Intake on Brain Energy Metabolism of Mice Fed a Cafeteria Diet. *Mol Neurobiol.* 2014;54:954-963.

Lewis AR, Singh S, Youssef FF. Cafeteria diet induced obesity results in impaired cognitive functioning in a rodent model. *Heliyon.* 2019;5:e01412.

Lewis EC, Mizrahi M, Toledano M, Defelice N, Wright JL, Churg A, Shapiro L, Dinarello CA. alpha1-Antitrypsin monotherapy induces immune tolerance during islet allograft transplantation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:16236–16241.

Liang S, Guo J, Choi JW, Kim NH, Cui XS. Effect and possible mechanisms of melatonin treatment on the quality and developmental potential of aged bovine oocytes. *Reprod Fertil Dev.* 2017;29:1821–1831.

Liu Z, Gan L, Xu Y, Luo D, Ren Q, Wu S, Sun C. Melatonin alleviates inflammasome-induced pyroptosis through inhibiting NF- κ B/GSDMD signal in mice adipose tissue. *J Pineal Res.* 2017;63:e12414.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(8):118.

Løhr M, Folkmann JK, Sheykhzade M, Jensen LJ, Kermanizadeh A, Loft S, Møller P. Hepatic Oxidative Stress, Genotoxicity and Vascular Dysfunction in Lean or Obese Zucker Rats. *PLoS ONE.* 2015;10(3):e0118773.

Longaretti LM, Luciano JA, Strapazzon G, Pereira M, Damiani AP, Rohr P, Rigo FK, Oliveira CA, Steiner BT, Vilela TC, Trevisan G, Andrade VM. Anti-genotoxic and anti-mutagenic effects of melatonin supplementation in a mouse model of melanoma. *Drug Chem Toxicol.* 2020;17;1-8.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J biol chem.* 1951;193:265-275.

Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* 2010;14(4):840-860.

Luciano TF. Efeitos da suplementação com extrato de *Zingiber officinale* sobre parâmetros metabólicos e genotóxicos em camundongos obesos induzidos por dieta [tese de doutorado]. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2018.

Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Investig.* 2011;121:2111e2117.

Lutsey PL, Steffen LM, Stevens J. Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circulation.* 2008;117:754-761.

Lv WJ, Liu C, Yu LZ, Zhou JH, Li Y, Xiong Y, Guo A, Chao LM, Qu Q, Wei GW, Tang XG, Yin YL, Guo SN. Melatonin Alleviates Neuroinflammation and Metabolic Disorder in DSS-Induced Depression Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:1241894.

Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, Souza A, Silva FR, Santos VS, Cioato SG, Caumo W, Torres IL. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides.* 2012;38:189-196.

Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Roziskya JR, Scarabelot VL, Souza A, Silva FR, Santos VS, Cioato SG, Caumo W, Torres ILS. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides.* 2012;38(1):189-196.

Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics*. 2005;21:3448–3449.

Majidinia M, Sadeghpour A, Mehrzadi S, Reiter RJ, Khatami N, Yousefi B. Melatonin: A pleiotropic molecule that modulates DNA damage response and repair pathways. *J. Pineal Res*. 2017;63:e12416.

Mannino G, Caradonna F, Cruciata I, Lauria A, Perrone A, Gentile C. Melatonin reduces inflammatory response in human intestinal epithelial cells stimulated by interleukin-1 β . *J Pineal Res*. 2019;67(3):e12598.

Manoharan K, Banerjee MR. β -Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biol Int Rep*. 1985;9:783–789.

Marinho KSN, Neto CJCL, Coelho IDDS, Silva MA, Melo MEG, Santos KRP, Chagas CA, Teixeira AAC, Teixeira VW. Evaluation of the protective effect on exogenous melatonin in adult rats and their offspring exposed to insecticides methomyl and cypermethrin during pregnancy. *Mutat Res Gen Tox En*. 2019;848:503107.

Martin C, Zhang Y, Tonelli C, Petroni K. Plants, diet, and health. *Annu Rev Plant Biol*. 2013;64:19-46.

Martínez-Pérez LM, Cerda-Flores RM, Gallegos-Cabriaes EC, Dávila-Rodríguez MI, Ibarra-Costilla E, Cortés-Gutiérrez EI. Frequency of micronuclei in Mexicans with type 2 diabetes mellitus. *Prague Med Rep*. 2007;108:248–255.

Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res*. 2013;54:1-14.

Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res*. 1990;239:29-80.

Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, Reiter RJ. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1 -acetyl-N2 -formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1 -acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol*. 2005;165:139–149.

McMullan CJ, Schernhammer ES, Rimm EB, Hu FB, Forman JP. Melatonin secretion and the incidence of type 2 diabetes. *JAMA*. 2013;309:1388–1396.

Mendes C, Gomes G, Belpiede LT, Buonfiglio DC, Motta-Teixeira LC, Amaral FG, Cipolla-Neto J. The effects of melatonin daily supplementation to aged rats on the ability to withstand cold, thermoregulation and body weight. *Life Sciences*. 2021;265:118769.

Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2018: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2018 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

Mitjavila MT, Fandos M, Salas-Aslvadó J, Covas MI, Borrego S, Estruch R, Lamuela-Raventós R, Corella D, Martínez-Gonzalez MA, Sánchez JM, Bulló M, Fitó M, Tormos C, Cerdá C, Casillas R, Moreno JJ, Iradi A, Zaragoza C, Chaves J, Sáez GT. The Mediterranean diet improves the systemic lipid and DNA oxidative damage in metabolic syndrome individuals. *Clin. Nutr.* 2013;32:172–178.

Mohammadi-Sartang M, Ghorbani M, Mazloom Z. Effects of melatonin supplementation on blood lipid concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr.* 2017;37: 1943-1954.

Monteiro R, Keating E, Castro P, Azevedo I. Abdominal cavity compliance: a participant more in the building up of visceral obesity. *Obesity.* 2009;17:937.

Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.* 2011;21(1):103-115.

Motta VT. Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações. 5aed. São Paulo: Robe, 2009.

Murakami Y, Yuhara K, Takada N, Arai T, Tsuda S, Takamatsu S, Machino M, Fujisawa S. Effect of melatonin on cyclooxygenase-2 expression and nuclear factor-kappa B activation in RAW264.7 macrophage-like cells stimulated with fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. *In Vivo.* 2011;25:641-647.

Navarro MEL, Santos KC, Nascimento AF, Francisqueti FV, Minatel IO, Pierini DT, Luzivotto RAM, Ferreira ALA, Campos DHS, Corrêa CR. Renal inflammatory and oxidative and metabolic changes after 6 weeks of cafeteria diet in rats. *J Bras Nefrol.* 2016;38(1):9-14.

Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Three with adult human brown adipose tissue. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1212:E20-36.

Nedic O, Rattan SIS, Grune T, Trougakos IP. Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology. *Free Radic Res.* 2013;47:28-38.

Negi G, Kumar A, Sharma SS. Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neu-roopathy: effects on NF- κ B and Nrf2 cascades. *J Pineal Res.* 2011;50:124-131.

Nopparat C, Sinjanakhom P, Govitrapong P. Melatonin reverses H₂O₂ -induced senescence in SH-SY5Y cells by enhancing au-topophagy via sirtuin 1 deacetylation of the RelA/p65 subunit of NF- κ B. *J Pineal Res*. 2017;63:e12407.

Obayashi K, Saeki K, Kurumatani N. Higher melatonin secretion is associated with lower leukocyte and platelet counts in the general elderly population: the HEIJO-KYO cohort. *J Pineal Res*. 2015;58:227–233.

Oliva L, Aranda T, Caviola G, Fernández-Bernal A, Alemany M, Fernández-López JA, Remesar X. In rats fed high-energy diets, taste, rather than fat content, is the key factor increasing food intake: a comparison of a cafeteria and a lipidsupplemented standard diet. *PeerJ*. 2017;5:e3697.

Ott C, Jacobs K, Haucke E, Santos AN, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol*. 2014;2:411-429.

Owino S, Buonfiglio DDC, Tchio C, Tosini G. Melatonin signaling a key regulator of glucose homeostasis and energy metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:488.

Owino S, Sánchez-Bretaña A, Tchio C, Cecon E, Karamitri A, Dam J, Jockers R, Piccione G, Noh HL, Kim T, Kim JK, Baba K, Tosini G. Nocturnal activation of melatonin receptor type 1 signaling modulates diurnal insulin sensitivity via regulation of PI3K activity. *J Pineal Res*. 2018;64:e12462.

Ozata M, Mergen M, Oktenli C, Aydin A, Sanisoglu SY, Bolu E, Yilmaz MI, Sayal A, Isimer A, Ozdemir IC. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem*. 2002;35:627–631.

Park YS, Kim SH, Park JW, Kho Y, Seok PR, Shin JH, Choi YJ, Jun JH, Jung HC, Kim EK. Melatonin in the colon modulates intestinal microbiota in response to stress and sleep deprivation. *Intest Res*. 2020;18(3):325-336.

Pascual-Serrano A, Arola-Arnal A, Suárez-García S, Bravo FI, Suárez M, Arola L, Bladé C. Grape seed proanthocyanidin supplementation reduces adipocyte size and increases adipocyte number in obese rats. *Int J Obes*. 2017;41:1246–1255.

Pavlopoulos GA, Secrier M, Moschopoulos CN, Soldatos TG, Kossida S, Aerts J, Schneider R, Bagos PG. Using graph theory to analyze biological networks. *BioData Min*. 2011;4:10.

Pereira RM, Moura LP, Muñoz VR, Silva ASR, Gaspar RS, Ropelle ER, Pauli JR. Molecular mechanisms of glucose uptake in skeletal muscle at rest and in response to exercise. *Motriz: Rev Educ Fis*. 2017;23.

Peschke E, Bahr I, Muhlbauer E. Experimental and clinical aspects of melatonin and clock genes in diabetes. *J Pineal Res*. 2015;59:1–23.

Peschke E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J Pineal Res*. 2008;44:26-40.

Piernas C, Popkin BM. Snacking increased among U.S. adults between 1977 and 2006. *J Nutr.* 2010;140:325-332.

Ping Z, Wang Z, Shi J, Wang L, Guo X, Zhou W, Hu X, Wu X, Liu Y, Zhang W, Yang H, Xu Y, Gu Y, Geng D. Inhibitory effects of melatonin on titanium particle-induced inflammatory bone resorption and osteoclastogenesis via suppression of NF- κ B signaling. *Acta.* 2017;62:362-371.

Poulsen MW, Hedegaard RV, Anderson JM, Courten B, Bugel S, Nielsen J, Skibsted LH, Dragsted LO. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food Chem Toxicol.* 2013;60:10-37.

Pourhanifeh MH, Hosseinzadeh A, Dehdashtian E, Hemati K, Mehrzadi S.. Melatonin: new insights on its therapeutic properties in diabetic complications. *Diabetol Metab Syndr.* 2020;12:30.

Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A, Louche K, Delagrangé P, Renard P, Casteilla L, Penicaud L. Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology.* 2003;144:5347–5352.

Puchalski SS, Green JN, Rasmussen DD. Melatonin effect on rat body weight regulation in response to high-fat diet at middle age. *Endocrine.* 2003;21:163–167.

Ramamoorthy H, Abraham P, Isaac B, Selvakumar D. Role for NF- κ B inflammatory signalling pathway in tenofovir disoproxil fumarate (TDF) induced renal damage in rats. *Food Chem Toxicol.* 2017;99:103-118.

Raskind MA, Burke BL, Crites NJ, Tapp AM, Rasmussen DD. Olanzapine-induced weight gain and increased visceral adiposity is blocked by melatonin replacement therapy in rats. *Neuropsychopharmacology.* 2007;32:284-288.

Rasmussen D, Mitton DR, Larsen SA, Yellon S. Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. *J Pineal Res.* 1999;31(1):89-94.

Rastogi S, Boylan M, Wright EG, Coates PJ. Interactions of apoptotic cells with macrophages in radiation-induced bystander signaling. *Radiat Res.* 2013;179:135–145.

Raygan F, Ostadmohammadi V, Bahmani F, Reiter RJ, Asemi Z. Melatonin administration lowers biomarkers of oxidative stress and cardio-metabolic risk in type 2 diabetic patients with coronary heart disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical Nutrition.* 2019;38(1):191-196.

RC Bortolin RC, Vargas AR, Gasparotto J, Chaves PR, Schnorr CE, Martinello KB, Silveira AK, Rabelo TK, Gelain DP, Moreira JCF. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *Int J Obes (Lond).* 2018;42(3):525-534.

Rebuffat SA, Sidot E, Guzman EC Azay-Milhau J, Jover B, Lajoix AD, Peraldi-Roux S. Adipose tissue derived-factors impaired pancreatic β -cell function in diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2018;1864(10):3378-3387.

Redman CW, Sargent IL. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response—A review. *Placenta*. 2003;24:21–27.

Reiter RJ, Manchester LC, Tan DX. Neurotoxins: Free radical mechanisms and melatonin protection. *Curr Neuropharmacol*. 2010c;8:194–210.

Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res*. 2016;61:253-278.

Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: A multitasking molecule. *Prog Brain Res*. 2010b;181:127–151.

Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. *Front Physiol*. 2014;5:377.

Reiter RJ, Tan D-X, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Polonica*. 2003;50:1129-1146.

Reiter RJ, Tan DX, Paredes SD, Fuentes-Broto L. Beneficial effects of melatonin in cardiovascular disease. *Ann Med*. 2010a;42:276-285.

Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S., Manchester LC A natureza universal, distribuição desigual e funções antioxidantes da melatonina e seus derivados. *Mini-Rev. Med. Chem*. 2013; 13 : 373–384.

Remely M, Ferk F, Sterneder S, Setayesh T, Kepcija T, Roth S, Noorizadeh R, Greunz M, Rebhan I, Wagner KH, Knasmüller S, Haslberger A. Vitamin E modifies high-fat diet-induced increase of DNA strand breaks, and changes in expression and DNA methylation of Dnmt1 and MLH1 in C57BL/6J male mice *Nutrients*. 2017a;9:607.

Remely M, Ferk F, Sterneder S, Setayesh T, Roth S, Kepcija T, Noorizadeh R, Rebhan I, Greunz M, Beckmann J, Wagner KH, Knasmüller S, Haslberger AG. EGCG prevents high fat diet-induced changes in gut microbiota, decreases of DNA strand breaks, and changes in expression and DNA methylation of Dnmt1 and MLH1 in C57BL/6J male mice. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2017;(2017b):3079148.

Ren W, Liu G, Chen S, Yin J, Wang J, Tan B, Wu G, Bazer FW, Peng Y, Li T, Reiter RJ, Yin Y. Melatonin signaling in T cells: Functions and applications. *J Pineal Res*. 2017;62:e12394.

Ressmeyer AR, Mayo JC, Zelosko V, Sainz RM, Tan DX, Poeggeler B, Antolin I, Zsizsik BK, Reiter RJ, Hardeland R. Antioxidant properties of the melatonin metabolite

N1 -acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): Scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep.* 2003;8:205–213.

Rezvanfar MR, Heshmati G, Chehrei A, Haghverdi F, Rafiee F, Rezvanfar F. Effect of bedtime melatonin consumption on diabetes control and lipid profile. *Int J Diabetes Dev C.* 2017;37:74–77.

Richard AJ, White U, Elks CM, Stephens JM. *Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction.* Endotext. 2020.

Richard D, Picard F. Brown fat biology and thermogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed.)* 2011;16:1233–1260.

Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 2004;36:1-9.

Rondanelli M, Faliva MA, Perna S, Antonielli N. Update on the role of melatonin in the prevention of cancer tumorigenesis and in the management of cancer correlates, such as sleep-wake and mood disturbances: Review and remarks. *Aging Clin Exp Res.* 2013;25:499–510.

Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell.* 2014;156(1-2):20-44.

Sampatha S, Lloyd S. Roles of OGG1 in transcriptional regulation and maintenance of metabolic homeostasis. *DNA Repair.* 2019;81:102667.

Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemermann AJ, Miehlsbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski I. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obes.* 2011;19:1107-1117.

Sancar A. Excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1995;270:15915–15918.

Santofimia-Castaño P, Clea Ruy D, Garcia-Sanchez L, Jimenez-Blasco D, Fernandez-Bermejo M, Bolaños JP, Salido GM, Gonzalez A. Melatonin induces the expression of Nrf2-regulated antioxidant enzymes via PKC and Ca²⁺ influx activation in mouse pancreatic acinar cells. *Free Radic Biol Med.* 2015;87:226–236.

Sartori C, Dessen P, Mathieu C, Monney A, Bloch J, Nicod P, Scherrer U, Duplain H. Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin-resistant mice. *Endocrinology.* 2009;150(12):5311-7.

Savini I, Catani MV, Gasperi V. *Oxidative Stress and obesity. Obesity: A Practical Guide.* Roma: Italy. 2016.

Scardoni G, Petterlini M, Laudanna C. Analyzing biological network parameters with CentiScaPe. *Bioinformatics.* 2009;25:2857–2859.

Scarpato R, Verola C, Fabiani B, Bianchi V, Saggese G, Federico G. Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the -H2AX focus assay and micronucleus test. 2011;25:685-693.

Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scimè A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM. PRDM16 controls abrown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 2008;454:961–967.

Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, Tavernier G, Langin D, Spiegelman DM. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab*.2007;6:38–54.

Seale P. Transcriptional regulatory circuits controlling brown fat development and activation, *Diabetes*. 2016;64:2369–2375.

Sekkin S, Ipek ED, Boyacioglu M, Kum C, Karademir Ü, Yalinkiling HS, Ak MO, Basaloglu H. DNA protective and antioxidative effects of melatonin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Turkish J Biol*. 2015;39:932–940.

Serrano L Synthetic biology: promises and challenges. *Mol. Syst. Biol*. 2007;3: 158.

Setayesh T, Nersesyan A, Mišík M, Noorizadeh R, Haslinger E, Javaheri T, Lang E, Grusch M, Huber W, Haslberger A, Knasmüller S. Impact of gallic acid on DNA damage and health related biochemical parameters in obese mice. *J Obes Eat Disord*. 2017;50.

Setayesh T, Nersesyan A, Mišík M, Ferk F, Langie S, Andrade VM, Haslberger A, Knasmüller S. Impact of obesity and overweight on DNA stability: Few facts and many hypotheses. *Mutat Res*. 2018;777:64-91.

Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res*. 2007;48:1253–1262.

Shafat A, Murray B, Rumsey D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite*. 2009;52:34-38.

Shang B, Shi H, Wang X, Guo X, Wang N, Wang Y, Dong L. Protective effect of melatonin on myenteric neuron damage in experimental colitis in rats. *Fundamen Clinic Pharmacology*. 2016;30:117-127.

Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski, Ideker T. Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*. 2003;13:2498–2504.

She M, Deng X, Guo Z, Laudon M, Hu Z, Liao D, Hu X, Luo Y, Shen Q, Su Z, Yin W. NEU- P11, a novel melatonin agonist, inhibits weight gain and improves insulin sensitivity in high-fat/high-sucrose-fed rats. *Pharmacol Res*. 2009;59:248–253.

Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med.* 2013;34(1):39-58.

Shi D, Xiao X, Wang J, Liu L, Chen W, Fu L, Xie F, Huang W, Deng W. Melatonin suppresses proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated CRL1999 cells via targeting MAPK, NF- κ B, c/EBP β , and p300 signaling. *Pineal Res.* 2012;53:154-165.

Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology.* 2007;132:2169–2180.

Shokrzadeh M, Ahmadi A, Naghshvar F, Chabra A, Jafarinejhad M. Prophylactic Efficacy of Melatonin on Cyclophosphamide-Induced Liver Toxicity in Mice. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 470425.

Shokrzadeh M, Naghshvar F, Ahmadi A, Chabra A, Jeivad F. The potential ameliorative effects of melatonin against cyclophosphamide-induced DNA damage in murine bone marrow cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18:605–611.

Shrestha S, Zhu J, Wang Q, Du X, Liu F, Jiang J, Song J, Xing J, Sun D, Hou Q, Peng Y, Zhao J, Sun X, Xishuang C. Melatonin potentiates the anti-tumor effect of curcumin by inhibiting IKK β /NF- κ B/COX-2 signaling pathway. *Int J Oncol.* 2017;51:1249-1260.

Shuster A, Patlas M, Pinthus JH, Mourtzakis M. The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *Br J Radiol.* 2012;85:1-10.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175:184-191.

Sinha JK, Ghosh S, Swain U, Giridharan NV, Raghunath M. Increased macromolecular damage due to oxidative stress in the neocortex and hippocampus of WNIN/Ob, a novel rat model of premature aging. *Neuroscience.* 2014;269:256-264.

Sliwinski T, Rozej W, Morawiec-Bajda A, Morawiec Z, Reiter R, Blasiak J. Protective action of melatonin against oxidative DNA damage-Chemical inactivation versus base-excision repair. *Mutat Res.* 2007;634:220–227.

Slominski A, Tobin DJ, Zmijewski MA, Wortsman J, Paus R. Melatonin in the skin: Synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab.* 2008;19:17–24.

Slominski AT, Hardeland R, Zmijewski MA, Slominski RM, Reiter RJ, Paus R. Melatonin: A Cutaneous Perspective on its Production, Metabolism, and Functions. *J Invest Dermatol.* 2018;138:490–499.

Slyskova J, Lorenzo Y, Karlsen A, Carlsen MH, Novosadova V, Blomhoff R, Vodicka P, Collins AR. Both genetic and dietary factors underlie individual differences in DNA damage levels and DNA repair capacity. *DNA Repair.* 2014;16:66–73.

Snel B. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring

neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Research*. 2000;28:3442–3444.

Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. 2017. Posicionamento da SBEM sobre a melatonina.

Song Y, Song X, Wu M, Pang Y, Shi A, Shi X, Niu C, Cheng Y, Yang X. The protective effects of melatonin on survival, immune response, digestive enzymes activities and intestinal microbiota diversity in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) exposed to glyphosate. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2020;238:108845.

Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism *Nature*. 2016;535:56-64.

Souza CAP, Gallo CC, Camargo LS, Carvalho PVV, Olesçuck IF, Macedo F, Cunha FM, Cipolla-Neto J, Amaral FG. Melatonin multiple effects on brown adipose tissue molecular machinery. *J Pineal Res*. 2019.

Sova H, Jukkola-Vuorinen A, Puistola U, Kauppila S, Karihtala P. 8-Hydroxydeoxyguanosine: A new potential independent prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer*. 2010;102:1018–1023.

Speed N, Blair IA. Cyclooxygenase- and lipoxygenase-mediated DNA damage. *Cancer Metastasis Rev*. 2011;30:437–447.

Strapazzon G. Avaliação de parâmetros genotóxicos e bioquímicos em camundongos submetidos à uma dieta cafeteria e exercício físico voluntário [dissertação de mestrado]. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2019.

Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Therapeutic actions of melatonin in cancer: Possible mechanisms. *Integr. Cancer Ther*. 2008;7:189–203.

Srivastava RK, Krishna A. Melatonin modulates glucose homeostasis during winter dormancy in a vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2010;555:392–400.

Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thais CA, Maza O, Israeli D, Zmora N, Gilad S, Weinberger A, Kuperman Y, Harmelin A, Kolodkin-Gal I, Shapiro H, Halpern Z, Segal E, Elinav E. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 2014;514:181–186.

Szklarczyk D, Santos A, von Mering C, Jensen LJ, Bork P, Kuhn M. STITCH 5: Augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic Acids Research*. 2016;44:380–384.

Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Jou of End*. 1993;1:57–60.

Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Galano A, Reiter RJ. Cyclic-3-hydroxymelatonin (C3HOM), a potent antioxidant, scavenges free radicals and suppresses oxidative reactions. *Curr Med Chem*. 2014;21:1557–1565.

Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R, Reiter RJ. N1 -acetyl-N2 -formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J*. 2001;15:2294–2296.

Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules*. 2015;20:18886-18906.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Weintraub ST, Qi W. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med*. 2000;11:1177–1185.

Tan DX, Manchester LC, Fuentes-Broto L, Paredes SD, Reiter RJ. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. *Obes Rev*. 2011;12:167-188.

Tengattini S, Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Rodella LF, Rezzani R. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J Pineal Res*. 2008; 44:16–25.

Tenorio NM, Ribeiro DA, Alvarenga TA, Fracalossi AC, Carlin V, Hirotsu C, Tufik S, Andersen ML. The influence of sleep deprivation and obesity on DNA damage in female Zucker rats. *Clinics*. 2013;68:385-389.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35:206-221.

Titchenell PM, Quinn WJ, Lu M, Chu Q, Lu W, Li C, Chen H, Monges BR, Chen J, Rabinowitz, JD, Birnbaum MJ. Direct hepatocyte insulin signaling is required for lipogenesis but is dispensable for the suppression of glucose production. *Cell Metab*. 2016;23:1154–1166.

Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res*. 2005;2:99–104.

Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 489:242-249.

Trivedi PP, Jena GB, Tikoo KB, Kumar V. Melatonin modulated autophagy and Nrf2 signaling pathways in micewith colitis-associated colon carcinogenesis. *Mol Carcinog*. 2016;55(3):255–226.

Tyson J, Caple F, Spiers A, Burtle B, Daly AK, Williams EA, Hesketh JE, Mathers JC. Inter-individual variation in nucleotide excision repair in young adults: Effects of age,

adiposity, micronutrient supplementation and genotype. *Br J Nutr.* 2009;101:1316–1323.

van der Poorten D, Milner KL, Hui J, Hodge A, Trenell MI, Kench JG, London R, Peduto T, Chisholm DJ, George J. Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease. *Hepatology.* 2008;44:457.

Vasileva LV, Savova MS, Amirova KM, Dinkova-Kostova AT, Milen I. Georgiev. Obesity and NRF2-mediated cytoprotection: Where is the missing link? *Pharmacological Research.* 2020;156:1047602.

Vijayalaxmi, Reiter RJ, Meltz ML, Herman TS. Melatonin: possible mechanisms involved in its 'radioprotective' effect. *Mutat Res.* 1998;404:187-189.

Wajchenberg BL, Santomauro ATMG, Nery M, Santos RF, Silva MELR, Ursich MJM, Rocha DM. Resistência à Insulina: Métodos Diagnósticos e Fatores que Influenciam a Ação da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 1999;43:76-85.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000;21:697–738.

Wang B, Trayhurn P. Acute and prolonged effects of TNF- α on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture. *Pflüg Arch.* 2006;452:418–427.

Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:612-616.

Warner A, Mittag J. Breaking BAT: can browning create a better white? *J Endocrinol.* 2015;228:19–29.

Waters MD, Brady AL, Stack HF, Brockman HE. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat Res.* 1990;238:57–85.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Investig.* 2003;112:1796–1808.

Westerhoff, H. V., Winder, C., Messiha, H., Simeonidis, E., Adamczyk, M., Verma, M., Bruggeman, F. J., and Dunn, W. (2009). Systems biology: the elements and principles of life. *FEBS Lett.* 583, 3882–3890.

Wilsgaard T, Jacobsen BK. Lifestyle factors and incident metabolic syndrome. The Tromsø Study 1979– 2001. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 2007;78:217–224.

Włodarczyk M, Jablonowska-Lietz B, Olejarsz W, Nowicka G. Anthropometric and dietary factors as predictors of DNA damage in obese women. *Nutrients.* 2018;10:578.

Włodarczyk M, Nowicka G. Obesity, DNA Damage, and Development of Obesity-Related Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019;20:1146.

Wolden-Hanson T, Mitton DR, McCants RL, Yellon SM, Wilkinson CW, Matsumoto AM, Rasmussen DD. Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. *J Pineal Res.* 2001;31(1):89-94.

World Health Organization. Obesity and Overweight; Fact Sheet No. 311; World Health Organization Media Center: Geneva, Switzerland, 2015.

World Health Organization. Obesity: Obesity associated disease risk: the role of inherent differences and location of adipose depots. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/topics/obesity/en> [Acessado em 4 de setembro de 2021].

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112:1821–1830.

Xu P, Wang J, Hong F, Wang S, Jin X, Xue T, Jia L, Zhai Y. Melatonin prevents obesity through modulation of gut microbiota in mice. *Pineal Res.* 2017;62:e12399.

Young P, Arch JR, Ashwell M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett.* 1984;167:10–4.

Yu H, Kim PM, Sprecher E, Trifonov V, Gerstein M. The importance of bottlenecks in protein networks: Correlation with gene essentiality and expression dynamics. *PLoS Computational Biology.* 2007;3:713–720.

Zanardini B, Silveira MAD, Sagae SC, Grégio d'Arce LP. Cafeteria diet and obesity: mutagenicity in wistar rats and consequences on female offspring. *Int J Dev Res.* 2017;7:16016-16019.

Zanquetta MM, Seraphim PM, Sumida DH, Cipolla-Neto J, Machado UF. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane. *J Pineal Res.* 2003;35:141–148.

Zavala-Oseguera C, Galano A, Merino G. Computational study on the kinetics and mechanism of the carbaryl + OH reaction. *J Phys Chem A.* 2014;118,:7776–7781.

Zhang H, Yan A, Liu X, Ma Y, Zhao F, Wang M, Loo JJ, Wang H. Melatonin ameliorates ochratoxin A induced liver inflammation, oxidative stress and mitophagy in mice involving in intestinal microbiota and restoring the intestinal barrier function. *J Hazard Mater.* 2021;407:124489.

Zhang HM, Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res.* 2014;57:131–146.

Zinöcker MK, Lindseth IA. The Western Diet–Microbiome-Host Interaction and Its Role in Metabolic Disease. *Nutrients*. 2018;10(3):365.

Zoico E, Rubele S, De Caro A, Nori N, Mazzali G, Fantin F, Rossi A, Zamboni M. Brown and beige adipose tissue and aging. *Front Endocrinol*. 2019;20:368.

Zwick RK, Guerrero-Juarez GF, Horsley V, Plikus MV. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metabolism*. 2018;27:68-83.

**ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética Em
Animais**



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **14/08/2018**.

Título do projeto	Avaliação do possível efeito corretivo do consumo de melatonina sobre parâmetros bioquímicos e genotóxicos em camundongos alimentados com uma dieta cafeteria
Project title	Evaluation of the possible corrective effect of melatonin consumption on biochemical and genotoxic parameters in mice fed a cafeteria diet
Número do protocolo Protocol number	0004/2018-2- Versão 02
Pesquisador principal Principal Investigator	VANESSA MORAES DE ANDRADE
Pesquisadores Researchers	Luiza Martins Longaretti, Gabriel Paulino Luiz, Marina Lumertz Magenis, Maiara Pereira, Isadora de Oliveira Monteiro, Giulia Fantini Malavazi Camargo, Lígia Salvan Dagostin.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	12/11/2018 a 22/03/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico/ Swiss
No de animais	160
Idade/Peso	30 dias / 30 g
Gênero	Masculino
Origem	Biotério da UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.


Samira da Silva Valvassori
 Coordenadora do CEUA

Criciúma, 14 de agosto de 2018.