



**BÁRBARA DO CARMO RODRIGUES VIROTE**

**THE INFLUENCE OF OBESITY INDUCED BY THE DIET ON  
REPRODUCTIVE PARAMETERS AND OFFSPRING IN ZEBRAFISH**

**LAVRAS - MG**

**2019**

**BÁRBARA DO CARMO RODRIGUES VIROTE**

**THE INFLUENCE OF OBESITY INDUCED BY THE DIET ON  
REPRODUCTIVE PARAMETERS AND OFFSPRING IN ZEBRAFISH**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Co-orientador

Prof. Dr. André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna

**LAVRAS - MG**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Virote, Bárbara do Carmo Rodrigues.

The influence of obesity induced by the diet on reproductive  
parameters and offspring in zebrafish / Bárbara do Carmo  
Rodrigues Virote. - 2019.

57 p.

Orientador (a): Luis David Solis Murgas.

Coorientador (a): André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Metabolic disturb. 2. *Danio rerio*. 3. Transgenerational  
disease. I. Murgas, Luis David Solis. II. Vianna, André Rodrigues  
da Cunha Barreto.

**BÁRBARA DO CARMO RODRIGUES VIROTE**

**THE INFLUENCE OF OBESITY INDUCED BY THE DIET ON  
REPRODUCTIVE PARAMETERS AND OFFSPRING IN ZEBRAFISH**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de Abril de 2019.

Dra. Mônica Rodrigues Ferreira Machado UFG

Dr. André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna UFLA

Dr. Luis David Solis Murgas UFLA

Orientador

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Co-orientador

Prof. Dr. André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna

**LAVRAS - MG**

**2019**

*A minha mãe, Jussara, pelo dom da vida,  
pela dedicação ímpar, pelo esforço e amor infinito.  
A você dedico este trabalho, o meu amor e carinho e  
agradeço por estar sempre ao meu lado.*

**DEDICO!**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus por sempre iluminar meu caminho me dando forças e oportunidades para alcançar meus objetivos.

A minha mãe que sempre foi minha maior incentivadora e a base de tudo o que eu consegui até hoje, dedico todo amor e agradecimento. A minha família Tia Antônia, Tia Marli, Madrinha, Padrinho, Diana e Miguel agradeço todo amor, apoio e confiança no meu sucesso. Amo vocês.

Ao meu namorado Alisson pelo amor, compreensão em todos os meus momentos de desespero, apoio em todas minhas decisões e pelo companheirismo de sempre.

Aos amigos que tive o privilégio de ter aqui na UFLA, em especial minhas amigas da Botânica: Mariana, Isabela, Ana e Thaísa que me deram apoio e incentivo para conseguir chegar até o final.

Ao meu professor e orientador Murgas, que é um exemplo de profissional. Agradeço pelas oportunidades, incentivo, confiança no meu trabalho, apoio, ajuda e, sobre tudo pela amizade durante esses anos de convivência. A você um obrigado especial, por estar sempre me fazendo crescer intelectualmente.

Ao meu co-orientador André, sempre presente durante a execução do trabalho dando suporte e atenção.

Aos meus colegas de trabalho do biotério por todo o carinho, amizade, compreensão e ajuda nesse tempo que trabalhamos juntos. Sem vocês eu não teria conseguido!

À Universidade Federal de Lavras, a todos os meus professores que ajudaram na minha formação pessoal e profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigada a todos!

"It is impossible to live without failing at something,  
unless you live so cautiously that you might as well  
not have lived at all - in which case, you fail by default."

J. K. Rowling

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### SEGUNDA PARTE

<b>Figura 1.</b> Images representing the zebrafish embryos classified as excellent (A), coagulated (B), and abnormal (C).....	34
<b>Figura 2.</b> Evaluation of parents body weig.....	37
<b>Figura 3.</b> Evaluation biochemistry of parents. ....	38
<b>Figura 4.</b> Evaluation hepatosomatic and gonadosomatic index of parents.....	39
<b>Figura 5.</b> Evaluation of visceral and subcutaneous adipose tissue at the end of the last feeding week.....	40
<b>Figura 6.</b> Evaluation of oocyte size .....	40
<b>Figura 7.</b> Total spawning (n) of DIO groups and control groups during the eight feeding weeks.....	41
<b>Figura 8.</b> Total fecundity (n) of DIO groups and control groups.....	41
<b>Figura 9.</b> Evaluation of mortality rate on the offspring of treatment of DIO and control groups with 120 hpf.....	42
<b>Figura 10.</b> Evaluation of hatching rate on offspring of DIO and control groups with 120 hpf.....	42
<b>Figura 11.</b> Evaluation of deformity rate in offspring of control and DIO groups with 120 hpf.....	43
<b>Figura 12.</b> Evaluation of offspring biochemical of control and DIO groups.....	44



## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

<b>Tabela 1.</b> Time feeding protocol.....	32
<b>Appendix 1.</b> Fertilization Rate (% [n]) of the Control and DIO groups during the eight weeks of feeding .....	55

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DIO – Obesidade induzida por dieta

DM2 - Diabetes Mellitus Tipo 2

DNGNA - Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica

F1 - Primeira Geração

HPF - Horas Pós Fertilização

IGS - Índice Gonadossomático

IHS - Índice Hepatosomático

IMC - Índice de Massa Corporal

OMS - Organização Mundial da Saúde

TG - Triglicerídeos

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

## SUMÁRIO

### PRIMEIRA PARTE

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
<b>2.1 A obesidade</b> .....	13
<b>2.1.1 Impacto da Obesidade na Reprodução</b> .....	15
<b>2.1.2 Os Efeitos Transgeracionais da Obesidade</b> .....	17
<b>2.2 O Zebrafish</b> .....	19
<b>2.2.1 Zebrafish como modelo para Obesidade</b> .....	20
<b>3. CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	23
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	24

### SEGUNDA PARTE

<b>ARTIGO:THE INFLUENCE OF OBESITY INDUCED BY THE DIET UPON REPRODUCTIVE PARAMETERS AND IN THE OFFSPRING ON ZEBRAFISH</b> .....	32
---	----

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1. INTRODUÇÃO GERAL**

A prevalência da obesidade aumentou significativamente nas últimas três décadas, sendo considerada uma pandemia que afeta 1,9 bilhão de pessoas no mundo inteiro. Nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, o sobrepeso e a obesidade são considerados problemas de saúde pública e apresentam uma alta taxa de mortalidade por fatores de riscos associados (FREITAS *et al.*, 2018).

A preocupação com essa doença aumenta, pelo fato da obesidade dos pais poderem trazer consequências negativas para a saúde, a longo prazo, nas gerações subsequentes. Estudos epidemiológicos em animais forneceram evidências de que a obesidade materna ou paterna é um fator de risco independente para obesidade e distúrbios metabólicos em crianças (REILLY *et al.*, 2005).

Os mecanismos biológicos subjacentes que mediam os efeitos transgeracionais da obesidade ainda não são claros. Com isso, os modelos animais preenchem muitas dessas lacunas, idealmente, o modelo deve ser de fácil observação comportamental, ter tempos de geração curtos, permitindo estudos de multigerações em um período de tempo razoável (BAKER *et al.*, 2014).

Diante disso, o zebrafish apresenta ser um excelente modelo para investigar o desenvolvimento da obesidade e seu efeito transgeracional, por ser um peixe de pequeno porte, de fácil manutenção, econômico para criação, de comportamento facilmente observável e quantificável em um ambiente controlado (SPENCE *et al.*, 2008).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi induzir a obesidade em zebrafish, através de uma superalimentação de machos e fêmeas e analisar os efeitos reprodutivos e seu impacto na prole.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A Obesidade

A palavra "Obesidade" tem origem no latim *obesitas*, que significa gordo ou corpulento (HASLAM, 2005). No sentido etiológico, a obesidade é definida como um distúrbio biológico heterogêneo, tendo como um dos principais contribuintes para a doença uma dieta desequilibrada com a ingestão excessiva de alimentos hipercalóricos (FAO/ WHO, 2015).

As calorias extras ingeridas levam ao armazenamento do excesso de nutrientes nas células adiposas, onde se acumulam como triglicérides ou lipídios neutros (VARGAS e VÁSQUEZ, 2017). Esta condição leva a um aumento no tecido adiposo, que pode gerar como consequência resistência a hormônios anorexigênicos, como insulina e leptina, e alteração no balanço energético a nível central, caracterizado pela diminuição do gasto energético e aumento do consumo alimentar (BARRETO-VIANNA *et al.*, 2016).

Um dos indicadores mundialmente aceito para diagnosticar a obesidade é o Índice de Massa Corporal (IMC) ( $\text{peso} / \text{altura}^2$ ). Que segundo a classificação mais recente, um valor do IMC maior que 25 kg/m<sup>2</sup>, o adulto é considerado com sobrepeso e, quando esse valor for maior que 30 kg/m<sup>2</sup>, já é tratado como um grau de obesidade (SEIDELL *et al.*, 2015).

Com os dados relatados nas últimas décadas, muitos autores já consideram a obesidade como uma pandemia global. Isso pode ser visto, por exemplo, em um estudo realizado em 2015 mostrando que 107,7 milhões de crianças e 603,7 milhões de adultos eram obesos em todo o mundo. Entre os adultos, a prevalência da obesidade analisado em 195 países, no período de 1980 a 2015, revelou um maior índice de mulheres obesas em todas as faixas etárias, sendo que para ambos os sexos, a taxa de aumento da obesidade foi maior no início da idade adulta (OBESITY COLLABORATORS, 2017).

No âmbito nacional, um levantamento realizado pela Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (BRASIL, VIGITEL, 2016), realizada em todas as capitais brasileiras, mostrou que um em cada cinco brasileiros está acima do peso. A prevalência da obesidade no país passou de 11,8% em 2006 para 18,9% em 2016, mostrando um aumento em 10 anos de cerca de 60% da doença no Brasil.

Mas a obesidade não é apenas uma desordem singular e sim uma doença multifatorial, cujas consequências estão além da apresentação de um fenótipo característico (BRITO, 2018). A ocorrência da obesidade reflete da interação de fatores biológicos, comportamentais, genéticos e ambiental (LEE *et al.*, 2017), que estão associados ao desenvolvimento de complicações

crônicas severas, como diversos tipos de câncer, dislipidemias, hiperglicéridemia, hipercolesterolemia, doença hepática gordurosa não alcoólica e esteatohepatite não alcoólica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

O aumento da adiposidade causa também uma condição denominada síndrome metabólica, definida por ser um conjunto de características metabólicas inter-relacionadas que estão ligadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes (GRUNDY *et al.*, 2004). Para ser considerada como síndrome é necessário a presença de 3 dos seguintes 5 fatores em cada indivíduo: obesidade abdominal (circunferência da cintura  $\geq 102$  cm para homens e  $\geq 88$  cm para mulheres), triglicérides elevado, colesterol lipoproteico de alta densidade reduzido, elevada pressão arterial e glicemia de jejum alterada (EXPERT PANEL ON DETECTION; 2011).

Todas essas consequências da obesidade ocorrem, pois o tecido adiposo além de ter a função de estoque de energia, também é o maior órgão endócrino do corpo humano (ORIO *et al.*, 2016). Os adipócitos são responsáveis pela produção de substâncias que regulam várias funções orgânicas como o balanço energético, a secreção de peptídeos, de proteínas bioativas e adipocinas que são responsáveis por uma série de alterações metabólicas, como por exemplo, no controle da ingestão alimentar, no controle da sensibilidade à insulina e em processos inflamatórios (FICHMAN, 2018).

Além de ser composto majoritariamente por adipócitos, o tecido adiposo também é composto por outros tipos de células, incluindo linfócitos, macrófagos, fibroblastos e células vasculares, que também possuem papéis importantes no controle funcional do tecido. A obesidade gera grandes mudanças na composição celular do tecido adiposo e também modula o fenótipo de células individuais dentro deste tecido (NAKAMURA *et al.*, 2014). Em relação aos macrófagos, que apresentam duas classes de subpopulações conhecidas: as que apresentam capacidade de produção de citocinas pró-inflamatória, como TNF- $\alpha$ , denominadas M1 e aquelas envolvidas em reações anti-inflamatórias, expressando citocinas como IL-10, chamadas M2 (LUMENG *et al.*, 2007). Em indivíduos saudáveis, os macrófagos encontram-se dispersos entre os adipócitos e, em sua maioria, constituem o subtipo M2. Entretanto, em obesos, os monócitos tendem a se diferenciar em macrófagos do tipo M1 (ALMEIDA, 2017).

A produção exacerbada de sinais inflamatórios pelos adipócitos que ocorre em indivíduos obesos estimula a diferenciação de macrófagos M1 que por sua vez liberam óxido nítrico, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 (WEISBERG *et al.*, 2003). Estas substâncias estimulam ainda mais a atividade inflamatória dos adipócitos. Assim, macrófagos e adipócitos contribuem, isoladamente, para o estado de inflamação no tecido adiposo, estimulam mutuamente a atividade inflamatória um do outro e contribuem significativamente para uma inflamação sistêmica crônica do indivíduo obeso (BERG; SCHERER, 2005).

Além dos distúrbios metabólicos nos órgãos periféricos, as alterações inflamatórias relacionadas à obesidade perturbam também funções cerebrais, afetando especialmente as áreas do cérebro que regulam a homeostase energética e o metabolismo sistêmico (JAIS *et al.*, 2017). Todas essas consequências mostram que o estado nutricional e a dieta são importantes fatores relacionados com a promoção e a manutenção de uma boa saúde. Mostrando a obesidade como uma das principais causas de doenças crônicas não transmissíveis.

### 2.1.1 O impacto da obesidade na reprodução

Além das causas etiológicas citadas anteriormente, há uma proporção significativa de casos de infertilidade ser direta ou indiretamente relacionada com a obesidade (BAKER, 2017). O processo reprodutivo envolve gasto energético, sendo, portanto sensível a mecanismos fisiológicos ligados àqueles envolvidos no controle do apetite e consumo alimentar (SELI *et al.*, 2014).

As mulheres, por exemplo, necessitam de uma quantidade mínima de gordura para a eficiência reprodutiva; por outro lado, com o aumento da adiposidade na obesidade, há um aumento de citocinas pró-inflamatórias, como citado anteriormente (HUANG *et al.*, 2016). Acredita-se que essas citocinas pró-inflamatórias contribuam para o desequilíbrio homeostático da glicose e induzam resistência à insulina (BAKER, 2017), essa situação induz maior conversão de andrógenos em estrogênios, diminuição da síntese hepática SHBG (proteína ligadora de hormônios sexuais) que é uma globulina hepática de ligação ao hormônio sexual, resultando no aumento dos níveis de estradiol e testosterona livres, tendo seu efeito potencializado pela associação com a hiperinsulinemia (TALMOR, 2015). O efeito combinado dessas alterações causa disfunção hipotalâmica, secreção aumentada de gonadotrofinas, redução da foliculogênese e níveis mais baixos de progesterona luteínica (MAHUTTE *et al.*, 2018).

Uma das consequências geradas por esses problemas é a irregularidade menstrual, sendo portanto mais comum em mulheres com obesidade e aumenta a frequência com o nível de obesidade (POLOTSKY *et al.*, 2010). Vários estudos sustentam a hipótese de que a obesidade tem efeitos negativos na saúde reprodutiva das mulheres demonstrando ser responsável por 25 a 50% das causas de infertilidade feminina (GIVIZIEZ *et al.*, 2016). No entanto, o modo como afeta a reprodução, incluindo desordens ovulatórias, ainda é objeto de investigação (BEST & BHATTACHARYA, 2015). Sabe-se que a distribuição de gordura corporal é um importante fator para essa condição, pois tem sido demonstrado que as mulheres com maior circunferência da cintura (excesso de gordura abdominal) são mais propensas a sofrer de anovulação do que as

mulheres obesas com o mesmo IMC que têm menos gordura abdominal (KUCHENBECKER *et al.*, 2010).

As complicações geradas pela obesidade podem comprometer não somente a fertilidade feminina, como também na gravidez causando diabetes gestacional e hipertensão, pré-eclâmpsia, aumento do risco de aborto espontâneo, tentativa fracassada de trabalho de parto, complicações operatórias, hemorragia e infecções (RHOTON-VLASAK *et al.*, 2017). Dados de uma revisão e meta-análise também indicaram que os profissionais de saúde devem estar cientes do fato de que mulheres obesas que engravidam têm maior probabilidade de apresentar depressão pré-natal e pós-parto do que mulheres com peso normal (MOLYNEAUX *et al.*, 2014).

A obesidade também afeta a saúde reprodutiva masculina. De acordo com investigações clínicas, homens com sobrepeso ou obesidade podem diminuir a qualidade espermática, incluindo concentração de espermatozóides, motilidade espermática, declínio da reação acrossômica, aumento de danos no DNA do espermatozóide e menores taxas de implantação embrionária, comparados aos de homens com IMC normal (LIU *et al.*, 2017). Um dos mecanismos de comprometimento da espermatogênese na obesidade é o aumento da temperatura testicular devido ao acúmulo de gordura na região abdominal, coxas e área escrotal (KAHN & BRANNIGAN, 2017).

Em um estudo realizado recentemente em Islamabad, capital de Paquistão, com homens com idade entre 20 e 55 anos, demonstrou que a obesidade influencia a fertilidade masculina por meio de vários mecanismos, que incluem hipogonadismo, espermatogênese reduzida e disfunção erétil. Nesse estudo foi demonstrado que as concentrações de leptina foram significativamente maiores e os valores de FSH, LH, testosterona e SHBG foram significativamente menores em homens obesos em comparação aos homens com peso normal, verificando que o nível de leptina não está diretamente relacionado à infertilidade masculina (AMJAD *et al.*, 2019).

Esses estudos demonstram que a obesidade pode levar ao desequilíbrio hormonal relacionado ao eixo hipotalâmico hipofisário gonadal (HPG), induzir uma inflamação crônica e aumentar o estresse oxidativo nos níveis sistêmico e tecidual. Desta forma, o ambiente essencial para a espermatogênese nos testículos e a maturação dos ovócitos nos ovários pode ser afetado, levando à infertilidade.

### **2.1.2 Os Efeitos Transgeracionais da Obesidade**



Alguns autores sugerem que os genes desempenham um papel importante na predisposição dos indivíduos à obesidade, mostrando que ter um ou ambos os pais obesos, especialmente a mãe, aumenta o risco de obesidade na prole (MAFFEIS *et al.*, 2017). Mulheres que estão com sobrepeso ou obesas quando entram na gravidez são mais propensas a ter filhos com maior probabilidade de desenvolver obesidade durante a infância, adolescência e na idade adulta (HAIRE-JOSHU *et al.*, 2016). Essa modulação observada acontece não somente com a dieta materna, pesquisadores identificaram mudanças epigenéticas relacionadas ao metabolismo alterado na prole resultante de variações na dieta do pai, indicando que os comportamentos paternos também podem colocar a prole em risco de obesidade (OZANNE, 2015).

Os fatores genéticos desempenham um papel importante na determinação da suscetibilidade individual ao ganho de peso e à obesidade. Isto levou a um crescente interesse em compreender o papel potencial da epigenética como um mediador de interações gene-ambiente subjacentes ao desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades associadas (VAN DIJK J *et al.*, 2015). A metilação do DNA representa um dos mais importantes mecanismos epigenéticos e, até o momento, o mais estudado (BURGIO *et al.*, 2015). Em um estudo realizado com mulheres, foi evidenciado uma associação entre o status de metilação localizadas em sítios CpG localizados em genes CLOCK, que controlam o relógio biológico, com a obesidade, síndrome metabólica e perda de peso (MILAGRO *et al.*, 2012).

A obesidade está associada a diversas comorbidades, como citado anteriormente, mulheres obesas na fase reprodutiva são mais propensas a desenvolver complicações na gravidez, como diabetes mellitus gestacional (DMG) (PANTHAM *et al.*, 2015). Uma consequência dessa condição, em decorrência do feto ter uma maior exposição à hiperglicemia *no útero*, pode induzir um estado pró-inflamatório na prole com aumento do estresse oxidativo, modificar a metilação e a expressão de genes associados ao apetite, estimular a secreção de insulina, induzir alterações neuro-hormonais e epigenéticas no hipotálamo e levar a alta adiposidade ao nascimento, o que pode subsequentemente definir a prole em uma trajetória para a obesidade na idade adulta (SHARP *et al.*, 2015). Um estudo recente realizado em camundongos demonstrou que uma exposição pré-natal ao DMG aumenta a adiposidade da prole. Este acúmulo de gordura não parece resultar de um desequilíbrio entre consumo e gasto energético, mas sim de alterações no metabolismo lipídico (TALTON *et al.*, 2019). Tem sido observado que o impacto da DMG é dependente do sexo da prole, como demonstrado em um estudo realizado nos Estados Unidos, entre os anos de 1996 a 2010, que avaliou a associação sexo-específica entre a exposição ao DMG *no útero* e o risco subsequente de longo prazo da obesidade na infância, adolescência e início da idade adulta dos filhos. Foi verificado, uma associação do DMG materno com aumento do risco de obesidade entre os filhos do sexo

masculino, mas o mesmo não foi observado nos filhos do sexo feminino (LI *et al.*, 2017). O mesmo foi observado em um estudo realizado na Espanha, no qual a DMG foi associada à macrossomia apenas entre os recém-nascidos do sexo masculino, mas não entre a prole do sexo feminino (RICART *et al.*, 2009).

A obesidade durante a gestação causa também uma desregulação na homeostase e função do sistema imune na prole (WILSON *et al.*, 2015). Crianças nascidas de mães obesas têm níveis elevados de proteína pró-inflamatória C reativa (PCR) e apresentam maior risco de desenvolver asma e ataques de sibilância (O'REILLY *et al.*, 2013). Em um estudo realizado em camundongos, demonstrou-se que o impacto da dieta no sistema imune da prole pode estar associado a uma microbiota intestinal alterada, mostrando que a exposição ao ácido graxo causa mudanças rápidas na composição microbiana, sugerindo que mudanças induzidas por dieta na microbiota materna são passadas para os filhos (MYLES *et al.*, 2013).

Há também uma recente evidência de um impacto negativo da obesidade materna na função cognitiva no cérebro da prole, como uma predisposição para doenças psiquiátricas e neurodegenerativas (CONTU *et al.*, 2017). Poucos trabalhos têm sido feitos em humanos para investigar os mecanismos genéticos e /ou ambientais pelos quais a obesidade materna influencia a cognição da criança e a saúde mental (BURGIO *et al.*, 2015). Em modelos animais, foi verificada atividade sináptica anormal e ramificação de dendritos interrompida todos relatados em descendentes de animais nascidos de mães obesas (YU *et al.*, 2014 ; HATANAKA *et al.*, 2017), fornecendo uma certa base estrutural para possíveis alterações nos circuitos funcionais.

Em um estudo, realizado com 46 gestantes nos Estados Unidos, detectou-se alterações significativas de conectividade funcional em uma coorte de neonatos nascidos de mães com IMC alto em comparação àqueles nascidos de mães com IMC normal. As alterações de conectividade funcional detectadas abrangem os quatro domínios hipotéticos que estão implicados criticamente em mecanismos da obesidade em adolescentes e adulto, incluindo processamento de estímulos sensoriais, mecanismos de recompensas, controle cognitivo e controle da saída motora (SALZWEDEL *et al.*, 2019).

Em humanos, já foi verificado que a obesidade paterna também afeta a saúde da prole. Um dos primeiros estudos realizados verificou que a exposição à dieta hiperlipídica paterna, em camundongos, programa a disfunção das células  $\beta$  em seus filhotes, induz uma piora na secreção de insulina e a tolerância à glicose ao longo do tempo (NG *et al.*, 2010).

Os estudos sobre os efeitos potenciais da obesidade e supernutrição na modulação genética dos espermatozoides são limitados (HOUFFLYN *et al.*, 2017). Alguns estudos demonstraram que ao estudar a metilação do DNA em espermatozoides, de uma população de 69 voluntários, os

percentuais de metilação do DNA foram significativamente diferentes em homens obesos ou com sobrepeso comparado com homens com peso normal (SOUBRY *et al.*, 2016). Outro estudo, forneceu uma abordagem epigenética abrangente em amostras de esperma de homens dinamarqueses com peso normal e obesos, e confirmaram uma associação entre obesidade e diferenças epigenéticas em espermatozoides (DONKIN *et al.*, 2016).

Os dados sobre o impacto da obesidade paterna na saúde dos filhos são limitados. Já foi demonstrado que a obesidade paterna pode aumentar o risco de obesidade, doenças cardiovasculares e inflamação na prole (BROADNEY *et al.*, 2017). Dados em camundongos também indicam que a obesidade paterna altera o fluido seminal e, em geral, o líquido seminal alterado pode afetar o fenótipo metabólico da prole (BINDER *et al.*, 2015). Entretanto, mais pesquisas são necessárias para entender completamente o papel da obesidade paterna na saúde infantil.

## 2.2 O zebrafish (*Danio rerio*)

O zebrafish também conhecido como paulistinha, é um pequeno teleósteo (3 a 4 cm) de água doce, proveniente do Sul da Ásia, com origens nos campos de arroz dos principais rios da Índia, Bangladesh e Nepal (SPENCE *et al.*, 2008). Apresenta este nome por ter um padrão de listras horizontais, sendo que a coloração pode alterar de mais clara a mais escura dependendo das circunstâncias e do ambiente em que se encontra o indivíduo (ENGESZER *et al.*, 2007).

Devido à nossa história evolutiva compartilhada, muitas das características anatômicas e fisiológicas dos peixes são altamente homólogas aos seres humanos (NISHIMURA *et al.*, 2015). Por exemplo, o cérebro do zebrafish e mamíferos compartilham muitas características, que incluem sistemas e estruturas de neurotransmissores bem conservados, como GABA, glutamato, por exemplo. Como também compartilham características anatômicas amplas, tais como a presença do cerebelo, telencéfalo, diencéfalo, medula espinhal e sistemas nervoso entérico-autônomo (SCHMIDT *et al.*, 2013).

Entre as vantagens de utilizar o zebrafish como modelo animal, pode-se citar o fato do seu genoma ser sequenciado, o que permite investigações nos níveis bioquímico, genético e celular serem mais fáceis (GARCIA *et al.*, 2016). Uma outra vantagem do uso do zebrafish é que este peixe possui uma similaridade genética com humanos em torno de 70% e cerca de 82% dos potenciais genes relacionados com as doenças humanas (HOWE *et al.*, 2013). Essa característica possibilita o uso do zebrafish para estudo de doenças como distúrbios cardiovasculares (FANG *et al.*, 2014), distúrbios neurológicos e psiquiátricos (LEVITAS-DJERBI E APPELBAUM, 2017), câncer (BROWN *et al.*, 2017) entre outros.

O zebrafish tem surgido como um modelo promissor também na avaliação de complicações reprodutivas devido às suas vantagens de desenvolvimento e fisiologia. A vantagem se deve ao fato, do zebrafish possuir ciclo reprodutivo curto, com desenvolvimento externo e transparente nos estágios iniciais de vida que permite que os pesquisadores realizem atividades de pesquisa de maneira mais eficiente (HYPOGONADISM, CONGENITAL HYPOGONADOTROPIC, 2016).

Entre os quesitos já citados, o zebrafish também se destaca por ser um peixe de pequeno porte, de manutenção fácil, econômico para criação, de comportamento facilmente observável e quantificável em um ambiente controlado (ZANG *et al.*, 2018).

Basicamente, os estudos utilizando o modelo zebrafish contribuíram para um vasto avanço em muitos campos da ciência, desempenhando papéis significativos em pesquisas fundamentais, como ciência evolutiva, genética, neurobiologia e biologia do desenvolvimento (HOO *et al.*, 2016). Além disso, existe uma extensa literatura sobre experimentos com esse modelo (CHAKRABORTY *et al.*, 2016). Com essas características, o zebrafish apresenta um perfil que ainda tem muito a ser explorado, possibilitando elucidar diversos mecanismos, vias metabólicas e descoberta de novos fármacos.

### **2.2.1 Zebrafish como modelo animal para a obesidade**

A regulação do consumo e gasto de energia envolve muitos órgãos, incluindo cérebro, intestinos, músculo esquelético e tecido adiposo. Por isso, o uso de modelos animais é essencial para uma melhor compreensão do desenvolvimento e progressão de uma disfunção metabólica, como a obesidade. O zebrafish é um excelente modelo para estudar esse tipo de doença, pois possui os principais órgãos que são importantes para a regulação da homeostase energética e metabolismo em mamíferos, incluindo órgãos digestivos, tecido adiposo e músculo esquelético. Além disso, possui as principais funções bem conservadas, como regulação do apetite, regulação da insulina e armazenamento de lipídios (ZANG *et al.*, 2018).

Uma característica primária da obesidade é a hipertrofia e hiperplasia adiposa. Semelhante ao tecido adiposo branco de mamíferos, os adipócitos do zebrafish em estágio inicial contêm várias pequenas gotículas lipídicas, enquanto os adipócitos maduros têm uma única gota lipídica grande (FLYNN *et al.*, 2009). No zebrafish, os lipídios também são armazenados em adipócitos viscerais, intramusculares e subcutâneos (SONG E CONE, 2007), proporcionando a oportunidade de compreender a regulação da distribuição da gordura corporal em casos como da obesidade.

O primeiro modelo de zebrafish obeso induzido por dieta (DIO) foi relatado em 2010, através de uma superalimentação com *Artemia* durante 8 semanas. Foi mostrado através de uma

análise comparativa de transcriptoma que o tecido adiposo visceral entre zebrafish, rato, camundongo e humano possui uma semelhança no metabolismo lipídico (OKA *et al.*, 2010). Após a publicação dessa pesquisa, vários outros métodos de indução a obesidade no zebrafish foram aplicadas, como uma indução através de uma dieta hipercalórica, com óleo de milho ou ração comercial enriquecida com óleo vegetal, para diferentes finalidades do estudo sobre obesidade (MEGURO *et al.*, 2015; VARGAS E VÁSQUEZ, 2017).

As vias metabólicas que controlam o peso corporal em mamíferos são conservadas no zebrafish. Por isso, o zebrafish é frequentemente usado como modelo transgênico para obesidade (ZANG *et al.*, 2018). Destaca-se em um estudo no qual o zebrafish transgênico confirmou a função do microRNA, miR-27b, como um centro regulador do metabolismo lipídico por inibir a tradução de vários genes chave do metabolismo (HSU *et al.*, 2007).

Uma nota de advertência é que nem todos os genes do metabolismo lipídico são altamente conservados em sequência e função no zebrafish. Por exemplo, a proteína de leptina do zebrafish é apenas 19% idêntica à proteína humana. Em camundongos e humanos, a leptina é um hormônio adipostático que regula a massa adiposa, e a falha na sinalização da leptina resultam em hiperfagia e obesidade (MYERS *et al.*, 2010). Ao contrário dos mamíferos, a leptina e o receptor da leptina não são expressos no tecido adiposo no zebrafish. O zebrafish deficiente no receptor de leptina tem principalmente a homeostase da glicose interrompida (MICHEL *et al.*, 2016), que é diferente dos fenótipos observados em modelos de camundongos como hiperfagia severa, hiperlipidemia e obesidade mórbida (YEN *et al.*, 1976). O zebrafish é usado também para estudo do desenvolvimento de comorbidades associadas à obesidade, como doenças cardiovasculares (BOUNELE *et al.*, 2016); e diabetes mellitus tipo 2 (DM2), mostrando ter respostas semelhante a humanos frente a medicamentos antidiabéticos (metformina e glibenclamida). Desta forma, o zebrafish é um modelo adequado para identificação de alvos terapêuticos e triagem química (ZANG *et al.*, 2017). Em um recente estudo foi observado que o perfil da microbioma intestinal do zebrafish e humanos com DM2 possui semelhanças funcionais, como o perfil bacteriano. Portanto, o zebrafish é apontado como um possível organismo modelo para estudar as interações bacterianas-hospedeiras na obesidade humana e suas doenças relacionadas (OKAZAKI *et al.*, 2019).

O modelo animal zebrafish tem sido constantemente usado também para testar os efeitos de alguns suplementos dietéticos no acúmulo de gordura corporal (WEST E YORK; 1998). Como exemplo de alguns trabalhos utilizando o modelo zebrafish, para evidenciar o efeito do extrato de chá verde inibindo o acúmulo de lipídios, diminuindo o volume do tecido adiposo visceral e alterando a expressão dos genes catabólicos do lipídio (MEGURO E HASUMURA, 2015). Por outro lado, outros trabalhos tem demonstrado o efeito e os mecanismos do  $\beta$ -glucano

derivado do cogumelo comestível, *Agaricus bisporus*, regulando o metabolismo lipídico e prevenindo o depósito lipídico, e fornecendo dados experimentais para o seu uso na dieta alimentar e na dependência alimentar (LI *et al.*, 2019). O uso de um polifenol natural, o resveratrol, também foi relatado como tendo efeitos anti-obesidade via regulação do metabolismo lipídico (RAN *et al.*, 2017). Todos esses trabalhos demonstram os benefícios da utilização do zebrafish DIO para avaliar os efeitos de alimentos e compostos funcionais no desenvolvimento e tratamento da obesidade.

### **3. CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Sabendo-se da problemática causada pela obesidade, e mais especificamente do seu efeito negativo na reprodução e potencial transgeracionalidade para a prole. Foi observado nessa revisão que muitos mecanismos subjacentes a essa condição ainda não foram elucidados. É notável em vários momentos que mais estudos são necessários e a utilização de modelos animais se mostra imprescindível.

Demonstrou-se que o modelo zebrafish tem sido usado para estudos da obesidade e suas comorbidades. O zebrafish apresenta características necessárias para o estudo da doença e vantagens de reprodução, como desenvolvimento rápido, fecundação externa e desenvolvimento embrionário transparente que possibilita analisar como a obesidade pode afetar a reprodução e sua prole desde as primeiras fases de desenvolvimento, sendo esse assunto melhor abordado no artigo a seguir.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. B. de. **Efeito da obesidade pré-gestacional no teor de citocinas de compartimentos maternos e fetais e na expressão de transportadores de ácidos graxos da placenta.** 2017. 145 p. Tese (Doutorado em Ciências Nutricionais)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

AMJAD, Sofia *et al.* Association between leptin, obesity, hormonal interplay and male infertility. **Andrologia**, v. 51, p. e13147, 2019.

BAKER, Kathryn D. *et al.* The impact of obesity and hypercaloric diet consumption on anxiety and emotional behavior across the lifespan. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**,v. 83, p. 173-182, 2017.

BAKER, TRACIE R.; PETERSON, RICHARD E.; HEIDEMAN, WARREN. Using zebrafish as a model system for studying the transgenerational effects of dioxin. **Toxicological Sciences**, v. 138, n. 2, p. 403-411, 2014.

BARRETO-VIANNA, Andre RC; AGUILA, Marcia B.; MANDARIM-DE-LACERDA, Carlos A. Effects of liraglutide in hypothalamic arcuate nucleus of obese mice. **Obesity**, v. 24, n. 3, p. 626-633, 2016.

BEST, Damian; BHATTACHARYA, Siladitya. Obesity and fertility. **Hormone molecular biology and clinical investigation**, v. 24, n. 1, p. 5-10, 2015.

BERG, Anders H.; SCHERER, Philipp E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circulation research**, v. 96, n. 9, p. 939-949, 2005.

BINDER, Natalie K. *et al.* Male obesity is associated with changed spermatozoa Cox4i1 mRNA level and altered seminal vesicle fluid composition in a mouse model. **MHR: Basic science of reproductive medicine** , v. 21, n. 5, p. 424-434, 2015.

BOURNELE, Despina; BEIS, Dimitris. Zebrafish models of cardiovascular disease. **Heart failure reviews**, v. 21, n. 6, p. 803-813, 2016.

BRASIL, VIGITEL. Hábitos dos brasileiros impactam no crescimento da obesidade e aumenta prevalência de diabetes e hipertensão. 2016.

BRITO, A. K. P. **Relação entre a microbiota intestinal, níveis de grelina e leptina e perfil inflamatório de mulheres eutróficas e obesas.** 2018. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)-Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2018.

BROADNEY, Miranda M. *et al.* Impact of parental obesity on neonatal markers of inflammation and immune response. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 1, p. 30, 2017.

BROWN, Hannah K. *et al.* Zebrafish xenograft models of cancer and metastasis for drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 12, n. 4, p. 379-389, 2017.

BURGIO, Ernesto; LOPOMO, Angela; MIGLIORE, Lucia. Obesity and diabetes: from genetics to epigenetics. **Molecular biology reports**, v. 42, n. 4, p. 799-818, 2015.

CHAKRABORTY, Chiranjib *et al.* Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. **Journal of nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 65, 2016.

CONTU, Laura; HAWKES, Cheryl A. A review of the impact of maternal obesity on the cognitive function and mental health of the offspring. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 5, p. 1093, 2017.

DONKIN, Ida *et al.* Obesity and bariatric surgery drive epigenetic variation of spermatozoa in humans. **Cell metabolism**, v. 23, n. 2, p. 369-378, 2016.

ENGESZER, R. E. *et al.* Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, v. 4, n. 1, p. 21–40, 2007.



EXPERT PANEL ON DETECTION, Evaluation et al. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). **Jama**, v. 285, n. 19, p. 2486, 2001.

FICHMAN, V. **Investigando a associação da obesidade com a infertilidade**. 2018. 49 p. Dissertação (Mestre em Ciências)-Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

FLYNN, Edward J.; TRENT, Chad M.; RAWLS, John F. Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of lipid research**, v. 50, n. 8, p. 1641-1652, 2009.

FREITAS, Wilson R. *et al.* Systemic inflammation in severe obese patients undergoing surgery for obesity and weight-related diseases. **Obesity surgery**, v. 28, n. 7, p. 1931-1942, 2018.

GARCIA, Gloria R.; NOYES, Pamela D.; TANGUAY, Robert L. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. **Pharmacology & therapeutics**, v. 161, p. 11-21, 2016.

GBD 2015 OBESITY COLLABORATORS. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 1, p. 13-27, 2017.

GIVIZIEZ, Christiane R. *et al.* Obesity and anovulatory infertility: a review. **JBRA assisted reproduction**, v. 20, n. 4, p. 240, 2016.

GRUNDY, Scott M. *et al.* Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Circulation**, v. 109, n. 3, p. 433-438, 2004.

HAIRE-JOSHU, Debra; TABAK, Rachel. Preventing obesity across generations: evidence for early life intervention. **Annual review of public health**, v. 37, p. 253-271, 2016.

HASLAM, DAVID W; JAMES, W PHILIP T. Obesity. **The Lancet**, v. 366, n. 9492, p 1197-209, 2005.

HATANAKA, Yusuke; TOMOHIRO, Kabuta; WADA, Keiji. Disturbance in maternal environment leads to abnormal synaptic instability during neuronal circuitry development. **Frontiers in neuroscience**, v. 11, p. 35, 2017.

HOO, Jing Ying *et al.* Zebrafish: a versatile animal model for fertility research. **BioMed research international**, v. 2016, p. 20, 2016.

HOUFFLYN, Sam; MATTHYS, Christophe; SOUBRY, Adelheid. Male obesity: epigenetic origin and effects in sperm and offspring. **Current molecular biology reports**, v. 3, n. 4, p. 288-296, 2017.

HOWE, Kerstin *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498, 2013.

HSU, Chi-Hsin *et al.* The zebrafish model: use in studying cellular mechanisms for a spectrum of clinical disease entities. **Current neurovascular research**, v. 4, n. 2, p. 111-120, 2007.

HUANG, Guizhen *et al.* IL-6 mediates differentiation disorder during spermatogenesis in obesity-associated inflammation by affecting the expression of Zfp637 through the SOCS3/STAT3 pathway. **Scientific reports**, v. 6, p. 28012, 2016.

HYPOGONADISM, CONGENITAL HYPOGONADOTROPIC. The zebrafish: an emerging animal model for investigating the hypothalamic regulation of reproduction. **Minerva endocrinologica**, v. 41, n. 2, p. 250-265, 2016.

JAIS, Alexander; BRÜNING, Jens C. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 1, p. 24-32, 2017.

KAHN, Barbara E.; BRANNIGAN, Robert E. Obesity and male infertility. **Current opinion in urology**, v. 27, n. 5, p. 441-445, 2017.

KUCHENBECKER, Walter KH *et al.* The subcutaneous abdominal fat and not the intraabdominal fat compartment is associated with anovulation in women with obesity and infertility. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 5, p. 2107-2112, 2010.

LEE, Bruce Y. *et al.* A systems approach to obesity. **Nutrition reviews**, v. 75, p. 94-106, 2017.

LEVITAS-DJERBI, Talia; APPELBAUM, Lior. Modeling sleep and neuropsychiatric disorders in zebrafish. **Current opinion in neurobiology**, v. 44, p. 89-93, 2017.

LI, Shanshan *et al.* Offspring risk of obesity in childhood, adolescence and adulthood in relation to gestational diabetes mellitus: a sex-specific association. **International journal of epidemiology**, v. 46, n. 5, p. 1533-1541, 2017.

LI, Xiumin *et al.* Agaricusbisporus-derived  $\beta$ -glucan prevents obesity through PPAR  $\gamma$  downregulation and autophagy induction in zebrafish fed by chicken egg yolk. **International journal of biological macromolecules**, v. 125, p. 820-828, 2019.

LIU, Yue; DING, Zhide. Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society. **Reproduction**, v. 154, n. 4, p.123-131, 2017.

LUMENG CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, v. 117, n.1, p. 175–184, 2007.

MAFFEIS, Claudio; MORANDI, Anita. Effect of maternal obesity on foetal growth and metabolic health of the offspring. **Obesity facts**, v. 10, n. 2, p. 112-117, 2017.

MAHUTTE, Neal *et al.* Obesity and Reproduction. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v. 40, n. 7, p. 950-966, 2018.

MEGURO, Shinichi; HASUMURA, Takahiro; HASE, Tadashi. Body fat accumulation in zebrafish is induced by a diet rich in fat and reduced by supplementation with green tea extract. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120142, 2015.

MICHEL, Maximilian *et al.* Leptin signaling regulates glucose homeostasis, but not adipostasis, in the zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 11 p.3084-3089, 2016.

MILAGRO, Fermín I. *et al.* CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA methylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake. **Chronobiology international**, v. 29, n. 9, p. 1180-1194, 2012.

MOLYNEAUX, Emma *et al.* Obesity and mental disorders during pregnancy and postpartum: a systematic review and meta-analysis. **Obstetrics and gynecology**, v. 123, n. 4, p. 857, 2014.

MYERS JR, Martin G. *et al.* Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 11, p. 643-651, 2010.

MYLES, Ian A. *et al.* Parental dietary fat intake alters offspring microbiome and immunity. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 6, p. 3200-3209, 2013.

NAKAMURA, Kazuto; FUSTER, José J.; WALSH, Kenneth. Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. **Journal of cardiology**, v. 63, n. 4, p. 250-259, 2014.

NG, Sheau-Fang *et al.* Chronic high-fat diet in fathers programs  $\beta$ -cell dysfunction in female rat offspring. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 963, 2010.

NISHIMURA, Yuhei *et al.* Zebrafish as a systems toxicology model for developmental neurotoxicity testing. **Congenital anomalies**, v. 55, n. 1, p. 1-16, 2015.

OKA, Takehiko *et al.* Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. **BMC physiology**, v. 10, n. 1, p. 21, 2010.

OKAZAKI, Fumiyoshi *et al.* Microbiome Alteration in Type 2 Diabetes Mellitus Model of Zebrafish. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 867, 2019.

O'REILLY, James R.; REYNOLDS, Rebecca M. The risk of maternal obesity to the long-term health of the offspring. **Clinical endocrinology**, v. 78, n. 1, p. 9-16, 2013.

ORIO F, Muscogiuri *et al.* Obesity, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease risk: nauptodate in the management of polycystic ovary syndrome. **European Journal of Obstetrics e Gynecology and Reproductive Biology**, v. 207, p. 214-219, 2016.

OZANNE, Susan E. Epigenetic signatures of obesity. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 10, p. 973-974, 2015.

PANTHAM, Priyadarshini; AYE, Irving LM H.; POWELL, Theresa L. Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. **Placenta**, v. 36, n. 7, p. 709-715, 2015.

POLOTSKY, Alex J. *et al.* Association of adolescent obesity and lifetime nulliparity: The Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). **Fertility and sterility**, v. 93, n. 6, p. 2004-2011, 2010.

RAN, Gaiet *al.* Resveratrol ameliorates diet-induced dysregulation of lipid metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). **PloS one**, v. 12, n. 7, p. e0180865, 2017.

REILLY, John J. *et al.* Early life risk factors for obesity in childhood: cohort study. **Bmj**, v. 330, n. 7504, p. 1357, 2005.

RHOTON-VLASAK, Alice S. *et al.* Obesity and reproduction: a study to determine how effectively medical education enhances awareness of the reproductive risks related to obesity. **JBRA assisted reproduction**, v. 21, n. 4, p. 330, 2017.

RICART, W. *et al.* Maternal glucose tolerance status influences the risk of macrosomia in male but not in female fetuses. **Journal of Epidemiology & Community Health**, v. 63, n. 1, p. 64-68, 2009.

SALZWEDEL, Andrew P. *et al.* Maternal Adiposity Influences Neonatal Brain Functional Connectivity. **Frontiers in human neuroscience**, v. 12, p. 514, 2019.

SCHMIDT, Rebecca; STRÄHLE, Uwe; SCHOLPP, Steffen. Neurogenesis in zebrafish—from embryo to adult. **Neural development**, v. 8, n. 1, p. 3, 2013.

SEIDELL, Jacob C.; HALBERSTADT, Jutka. The global burden of obesity and the challenges of prevention. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 66, n. Suppl. 2, p. 7-12, 2015.

SELI, Emre *et al.* Minireview: metabolism of female reproduction: regulatory mechanisms and clinical implications. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 6, p. 790-804, 2014.

SHARP, Gemma C. *et al.* Maternal pre-pregnancy BMI and gestational weight gain, offspring DNA methylation and later offspring adiposity: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. **International journal of epidemiology**, v. 44, n. 4, p. 1288-1304, 2015.

SONG, Youngsup; CONE, Roger D. Creation of a genetic model of obesity in a teleost. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 9, p. 2042-2049, 2007.

SOUBRY, Adelheid *et al.* Obesity-related DNA methylation at imprinted genes in human sperm: results from the TIEGER study. **Clinical epigenetics**, v. 8, n. 1, p. 51, 2016.

SPENCE, R. *et al.* The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.

TALMOR A, Dumphy B. Female Obesity and Infertility. **Best Practice Research Clinical Obstetrics Gynaecol**, v. 29, n. 4, p. 498-506, 2015.

TALTON, Omonseigho O. *et al.* Lean maternal hyperglycemia alters offspring lipid metabolism and susceptibility to Diet-Induced obesity in mice. **Biology of reproduction**, v. 94, n. 2, p. 009, 2019.

VAN DIJK, Susan J. *et al.* Recent developments on the role of epigenetics in obesity and metabolic disease. **Clinical epigenetics**, v. 7, n. 1, p. 66, 2015.

VARGAS, Rafael; VÁSQUEZ, Isabel Cristina. Effects of overfeeding and high-fat diet on cardiosomatic parameters and cardiac structures in young and adult zebrafish. **Fish physiology and biochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1761-1773, 2017.

WEISBERG, Stuart P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.

WEST, David B.; YORK, Barbara. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. **The American journal of clinical nutrition**, v. 67, n. 3, p. 505-512, 1998.

WILSON, Randall M. *et al.* Maternal obesity alters immune cell frequencies and responses in umbilical cord blood samples. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 26, n. 4, p. 344-351, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42665/1/WHO\\_TRS\\_916.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42665/1/WHO_TRS_916.pdf) Acesso em: 01 dez. 2018.

YEN, Terence T. *et al.* Triacylglycerol contents and in vivo lipogenesis of ob/ob, db/db and Avy/a mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 441, n. 2, p. 213-220, 1976.

YU, Min *et al.* Maternal high-fat diet affects Msi/Notch/Hes signaling in neural stem cells of offspring mice. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 227-231, 2014.

ZANG, Liqing; MADDISON, Lisette A.; CHEN, Wenbiao. Zebrafish as a model for obesity and diabetes. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 6, p. 91, 2018.

ZANG, Liqing; SHIMADA, Yasuhito; NISHIMURA, Norihiro. Development of a novel zebrafish model for Type 2 diabetes mellitus. **Scientificreports**, v. 7, n. 1, p. 1461, 2017.

## SEGUNDA PARTE

### ARTIGO

## THE INFLUENCE OF OBESITY INDUCED BY THE DIET ON REPRODUCTIVE PARAMETERS AND OFFSPRING IN ZEBRAFISH

Bárbara do Carmo Rodrigues Virote<sup>1</sup>, Amanda Maria Siqueira Moreira<sup>1</sup>, José Gilmar da Silva Souza<sup>2</sup>, Tássia Flávia Dias Castro<sup>1</sup>, Naiara Melo<sup>2</sup>, William Franco Carneiro<sup>2</sup>, Cristina Delarete Drummond<sup>3</sup>, André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna<sup>1</sup>, Luis David Solis Murgas<sup>1\*</sup>

1 Department of Veterinary Medicine, Central Animal Housing, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.

2 Department of Zootecny, Central Animal Housing, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.

3 Department of Health Science, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.

\*Correspondence author: DR. Luis David Solis Murgas, Central Animal Housing, Department of Veterinary Medicine. Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil. (number +55 (35) 3829-1728, e-mail: lsmurgas@prp.ufla.br).

**Keywords:** Metabolic disturb. *Danio rerio*. Transgenerational disease



## ABSTRACT

Obesity is a transgenerational epigenetic metabolic disturbance. Animal models of obesity like zebrafish (*Danio rerio*) are useful to understand the signaling pathways involved on this condition. In this study, we analyzed, on zebrafish, the effect of maternity and paternity obesity on reproduction and offspring (F1). Animals of both genders were used, divided into two groups; the control group (C) which received a balanced diet, and the obesity group induced by overfeeding (DIO). The feeding protocol was conducted for eight weeks and the animals were reproduced weekly. To verify the impact of obesity on the parents, we made histologic assessment through morphometry of adipose tissue (AT) visceral and subcutaneous, and we measured the hepatosomatic (GSI) and gonadosomatic (HSI) indexes. The impact of overfeeding was evaluated on reproduction, spawning, fertility and fertilization rate. On the offspring were analyzed the mortality rate, hatching, lordosis, and tail deformity. Glucose and triglycerides plasma levels were measure in zebrafish adult and offspring. As a result, we identified that the induction of obesity caused hypertrophy on AT and an increase of HSI, in both sexes and an increase of GSI on the females. The obesity not caused infertility of the zebrafish. However, overfeeding caused high mortality rate of offspring, morphologic deformities and high plasmatic levels of glucose and triglycerides, with 100% of mortality at 60 dpf. We concluded that the induction of obesity through overfeeding didn't have any effect on the reproductive capacity of zebrafish, however, it caused negative effects on its offspring with the high occurrence of deformities and mortality.

## **1. INTRODUCTION**

Obesity is an alarming threat of pandemic proportions, that presents significant growth in the latest decades (SELLAYAH *et al.*, 2019). It's widely recognized that inappropriate feeding habits and sedentary lifestyle are the main responsible for the high incidence of obesity and are responsible for the development of severe chronic complications, like metabolic diseases, Type 2 Diabetes Mellitus, cardiovascular diseases, and others (SANCHEZ-GARRIDO *et al.*, 2018). It is also known that obesity is an epigenetic and transgenerational disturbance (CHEN *et al.*, 2016), that was observed on epidemiologic evidences and experiments, that join the nutritional estate of the parents to metabolic characteristics on the offspring (PORTHA *et al.*, 2019).

Recently the zebrafish (*Danio rerio*) has presented as a great model for obesity studies, for presenting mechanisms involved on appetite regulation, insulin regulation and lipids storage, just like mammals (OKA *et al.*, 2010; ZANG *et al.*, 2018). The zebrafish is a model that presents fertilization and external embryonic development, and the embryos are transparent which enables the precocious observation of any morphologic change without the need for an invasive intervention in the model (KIMEL *et al.*, 1995). These characteristics permit the zebrafish to have a potential to consolidate itself as an excellent model on transgenerational studies involving obesity, but the model has been used just a few (LEIBOLD E HAMMERSCHMIDT, 2015; NEWMAN *et al.*, 2016).

There is in the literature some methods of induction to obesity on zebrafish through hypercaloric diet or overfeeding, that were used with different purposes, such as cardiovascular disease induction and Type 2 Diabetes Mellitus (VARGAS E VÁSQUEZ, 2017; ZANG *et al.*, 2017). However, studies involving obese individuals with an evaluation of the reproductive aspects and the offspring have not been carried out. The aim of this study was to induce obesity on the adult zebrafish through overfeeding and to evaluate the reproductive parameters, as well as, the possible changes on these individuals offspring.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Declaration of ethics principles**

All the experimental proceeds on this study were approved according to the ethics committee on animal experimentation of Federal University of Lavras, MG, Brazil, on the number 084/2017 and according to the guidelines of care and usage of laboratory animals of National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA).

## 2.2. Zebrafish maintenance

The experiment was conducted at the Fish Section of Central Animal Housing of UFLA. A total of 260 adult zebrafish, both gender, were used with an average weight of  $0,36 \pm 0,09$  g and five months old. The animals were kept on a automated rack for the specie (Rack Hydrus, model ZEB-40), in polycarbonate aquariums of 2,5L each (11,5 X 34,5 X 15,5 cm), with a recirculation system. During the experimental period, the matrices were kept in photoperiod with 14:10 hours (light: dark) (DAMMSKI *et al.*, 2011), temperature of 28 °c and pH 7.

## 2.3 Experimental design

Ten animals were host in each aquarium, five of each gender, separated by perforated acrylic partitions (ALBR industry and commerce Ltda), that permitted the water change between compartments, however, it was impossible to have physical contact, creating a constant incitement for reproduction due to the free pheromone contact.

The animals were divided into the following groups according to the food kind:

- Control group (C): balance food for the species
- Obese group (DIO): overfeeding

The aquariums were distributed randomly inside the rack, regardless of the treatment. It was used twenty-six aquariums with the following distribution: five aquariums of group C and five aquariums of group DIO intended to reproduction management. Of the aquariums used, sixteen aquariums for body weigh analyses, histology, biochemical analysis, hepatosomatic e gonadosomatic index, being divided half for each group.

## 2.4. Diets

The diets were based on a study conducted by ZANG *et al.*, (2017), during eight weeks. All animals were fed commercial feed, Otohime B2 contains a minimum of 11% crude fat, 51% crude protein 2.3% crude calcium, 1.5% phosphorus, 3% fiber and 6% moisture. The ration has a grain size of 0.36 to 0.65 mm and the energy density of 3.39 kcal/g.

On the supply of the ration, the fish from DIO group were fed five times per day *ad libitum*, with the maximum offer quantity of 120 mg/fish/day, while the animals of the control group received only two feeding with a total offer of 20 mg/fish/day.

All fish consumed also 1500 *Artemia* of nauplii per fish per day. As suggested by Gonzales (2012), spawning success is significantly higher in females fed with *Artemia*. Each animal in DIO group consumed 428 calories divided into 6 daily meals, and each animal of the control group, consumed 88 calories divided in 3 daily meals (Table 1).

Table1 - Time feeding protocol

<b>Feed type</b>	<b>Control</b>	<b>DIO</b>
Ration	8:00	8:00
Ration	—	10:00
Ration	12:00	12:00
Ration	—	14:00
Ration	—	16:00
<i>Artêmia</i>	18:00	18:00

## 2.5 Adult zebrafish body weight

To evaluate the body weight during the experimental period, weekly the adult animals, except the ones used for reproduction, were anesthetized with benzocaine (250mg/L<sup>-1</sup> by immersion on watery solution) and weighted.

## 2.6 Biochemical analysis

Biochemical analyzes of blood glucose and triglycerides were performed at the end of the eighth week of feeding, immediately after euthanasia was performed by anesthetic deepening with benzocaine (250mg/L<sup>-1</sup> by immersion on watery solution).

Six males and six females, at 12 hour fasting were randomly selected from each group and used to assess blood glucose. The blood was collected through the puncture of the caudal vein (CASTRO *et al.*, 2018) and the body glucose (mg/dL) was evaluated with a glucometer (Accu-Check Active<sup>®</sup>).

Six males and six females zebrafish in each group were used for the analysis of triglycerides concentration (TG). The animals were euthanized and entire body macerated to obtain a suspension with isopropyl alcohol. The supernatant was isolated and the concentrations of triglycerides were evaluated by semiautomatic spectrophotometer, through the commercial kit for TG assessment (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brazil -K117), according to the manufacturer instructions.

## 2.7 Hepatosomatic (HSI) and Gonadosomatic (GSI) index

Twenty females and eighteen males from each group were euthanized at the eighth week for HSI and GSI evaluation. Immediately after the euthanasia, the liver and the gonads were removed and weighted. The HSI and GSI were obtained using the following formula:

$$\text{HSI} = (\text{LW}/\text{AW}) \times 100, \text{ where LW=liver weight; AW= animal weight;}$$

(1)

$$\text{GSI} = (\text{GW}/\text{AW}) \times 100, \text{ where GW= gonad weight; AW= animal weight}$$

(2)

## 2.8 Histology

Eight females and ten males from each group collected at the end of the last feeding week were used for histological analysis. The animals were euthanized and stored in paraformaldehyde, processed and included in paraffin blocks. Cross sections of 9  $\mu\text{m}$  thickness of entire animals body were stained with hematoxylin and eosin (HE). All morphometric analyses were performed with the software ImageJ<sup>®</sup> (National Institutes Of Health, Bethesda, Maryland, USA)

To assessment adipose tissue it was observed the minors and the larger diameters of each adipose to calculate the average diameter of the adiposes located on the subcutaneous compartment and visceral (Image-Pro Plus<sup>®</sup> version 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Through the histological assessment it was also identified the maturation stage of the gonads according to the VAZZOLER (1996) classification: immature (stage A), on maturation (stage B) and mature (stage C). It was also identified the maturation phases of the oocytes: germ cells (phase I), oocytes with reservation stock that will start vitellogenesis (phase II), oocytes with lipid vitellogenesis (phase III), oocytes with lipid and protein vitellogenesis (phase IV) and oocytes with complete vitellogenesis (phase V), the last was chosen to have a morphometry evaluation since it was the last phase, with oocyte ready to be eliminated from the follicle.

## 2.9 Reproduction

Adults fish reproduction was induced during eight weeks in group C and DIO. The reproduction protocol used was to remove the animals from the rack and stow them on the breeding grounds proper for the reproduction. A day before spawning, males and females were separated (Proportion of 1:1). The day after in the morning, before the end of the dark period, the animals were mixed in same place, and after 2 hours the embryos were collected and placed in Petri dishes (50 embryos per dish) containing medium *Egg water* (GALINDO-VILLEGAS *et al.*, 2012).

The embryos were then classified and separated as excellent, coagulated and anomalies abnormal, through an optical light microscope (Motic BA 310) with an expansion of 40X. All the embryos that didn't present any visible changes were considered excellent, such as size, color, and uniform texture (Fig. 1A). The coagulated embryos presented coagulation on its inside and white color (Fig. 1B). The embryos with overt anomalies, asymmetries, formation of vesicles or damaged membranes presented malformation, corion injuries and changes on color and size (Fig. 1C).

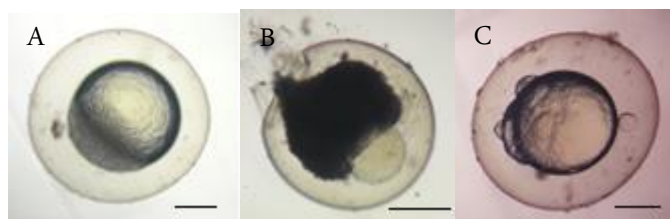


Figure 1: Images representing the zebrafish embryos classified as excellent (A), coagulated (B), and abnormal (C). Scale = 250  $\mu\text{m}$

The reproductive parameters were evaluated according to the following analyses.:

- Total Spawning: the total number of all embryos (excellent, coagulated and anomalies) during a spawning event of each family.
- Fertility: counting of the excellent embryos number, evaluated as described previously, released during the spawning of each family.
- Fertility index: set 24 hours post fertility (hpf) with the embryos that were viable, with normal cell division in the species parameters, using the following equation (GONZALES Jr, 2012).

Fertility index (%): (fertilized embryos number/total embryos number produced during a spawning event per family) X 100%.

## 2.10 The offspring evaluation

It was evaluated the mortality rate, hatching, edema, lordosis and tail deformity until 120 hpf. Based on the normal species parameters, any other characteristic that did not correspond to the normal species development was considered as morphologic change (KIMMEL *et al.*, 1995; OECD, 2013).

Individual mortality and the development stage was evaluated every day, being removed and counted all the embryos that didn't have a heart beating, blood circulation, or were in the degeneration process.

Due to the high mortality rate after 60 days post fertilization (dpf) of the offspring on group DIO the animals were anesthetized (benzocaine 100 mg/L<sup>-1</sup>), weighted and collected for biochemistry evaluation, glucose, and triglycerides, according to the protocol previously described.

## 2.11 Statistical analysis

The data were submitted to the Shapiro Wilk normality test when attended the assumption, the ANOVA was realized ANOVA by the Minitab<sup>®</sup> version 1.8 program (Minitab LLC, Stage College, PA).

Data without normality, the interaction was evaluated by the generalized procedure of linear models, and the comparisons were realized by the Mann-Whitney using the *software* R (R Development Core Team 2014).

## 3. RESULTS

### 3.1 Changes observed on the adult zebrafish

#### 3.1.1 Adult zebrafish body weight

The overfeeding during the eight weeks resulted in body weight gain of the females on group DIO 20% higher than on group C ( $P < 0,05$ ) (Fig. 2A). Concerning the males there were no difference between the weight gain in both groups ( $P > 0,05$ ) (Fig.2B).

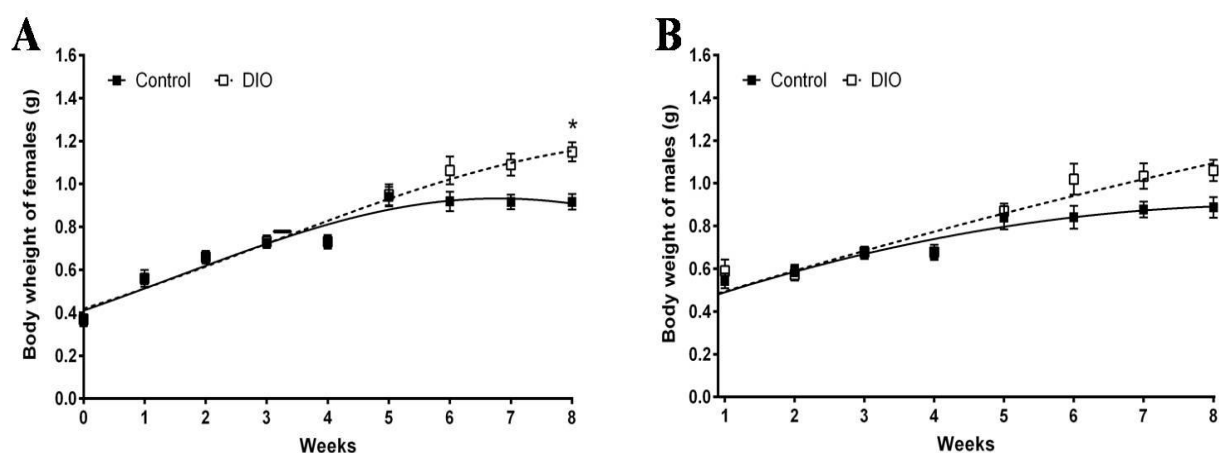


Figure 2: Evaluation of parents body weight. Evolution of body weight on female zebrafish(n=15) (A) and male (n=15) (B) during the eight feeding weeks. All the values are an average  $\pm$  standard average error (\*) are significantly different between groups on the indicated week ( $P < 0,05$ ).

#### 3.1.2 Zebrafish adult biochemistry

Related to blood glucose level, the females of the DIO group gained glucose levels 67% higher ( $P < 0,05$ ) comparing to animals of group C (Fig. 3A). In males there was no significant difference ( $P > 0,05$ ) between the groups (Fig. 3B). Related both to males and females, wasn't observed any significant difference ( $P > 0,05$ ) on the triglycerides rates between groups (Fig.3C-D).

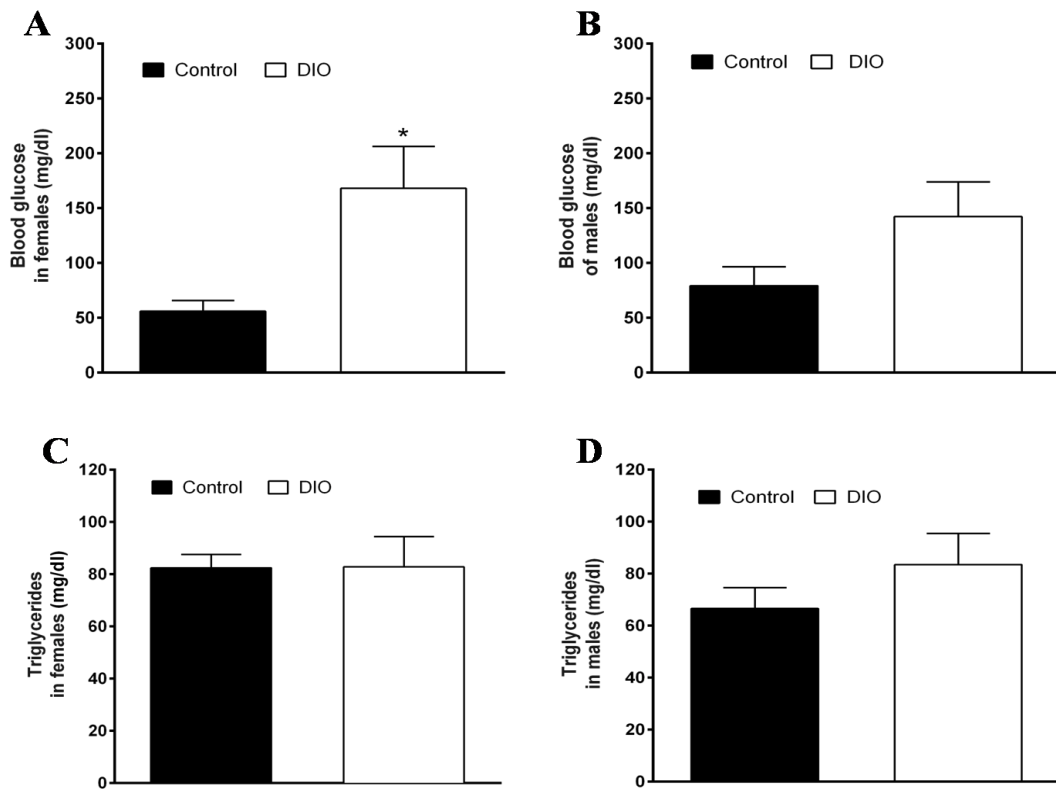


Figure 3: Evaluation biochemistry of parents. Blood glucose evaluation on zebrafish females ( $P < 0,01$ ,  $n=6$ ) (A) and males ( $P > 0,05$ ,  $n=6$ ) (B). Triglycerides evaluation (TG) of parents. TG evaluation on zebrafish females ( $P > 0,05$ ,  $n=6$ ) (C) and males ( $P > 0,05$ ,  $n=6$ ) (D). All the values are an average  $\pm$  standard average error (\*) are significantly different between groups on the indicated week. ( $P < 0,05$ ).

### 3.1.3 Hepatosomatic and Gonadosomatic index

The gained on HSI have shown significant growth of the zebrafish liver size ( $P < 0,05$ ) in group DIO 72% and 90% on females and males respectively (Fig. 4A–B). The females GSI of DIO group was 33% higher the females control (Fig. 4C), but concerning to the males, there were no differences ( $P > 0,05$ ) significantly between both groups (Fig. 4D).



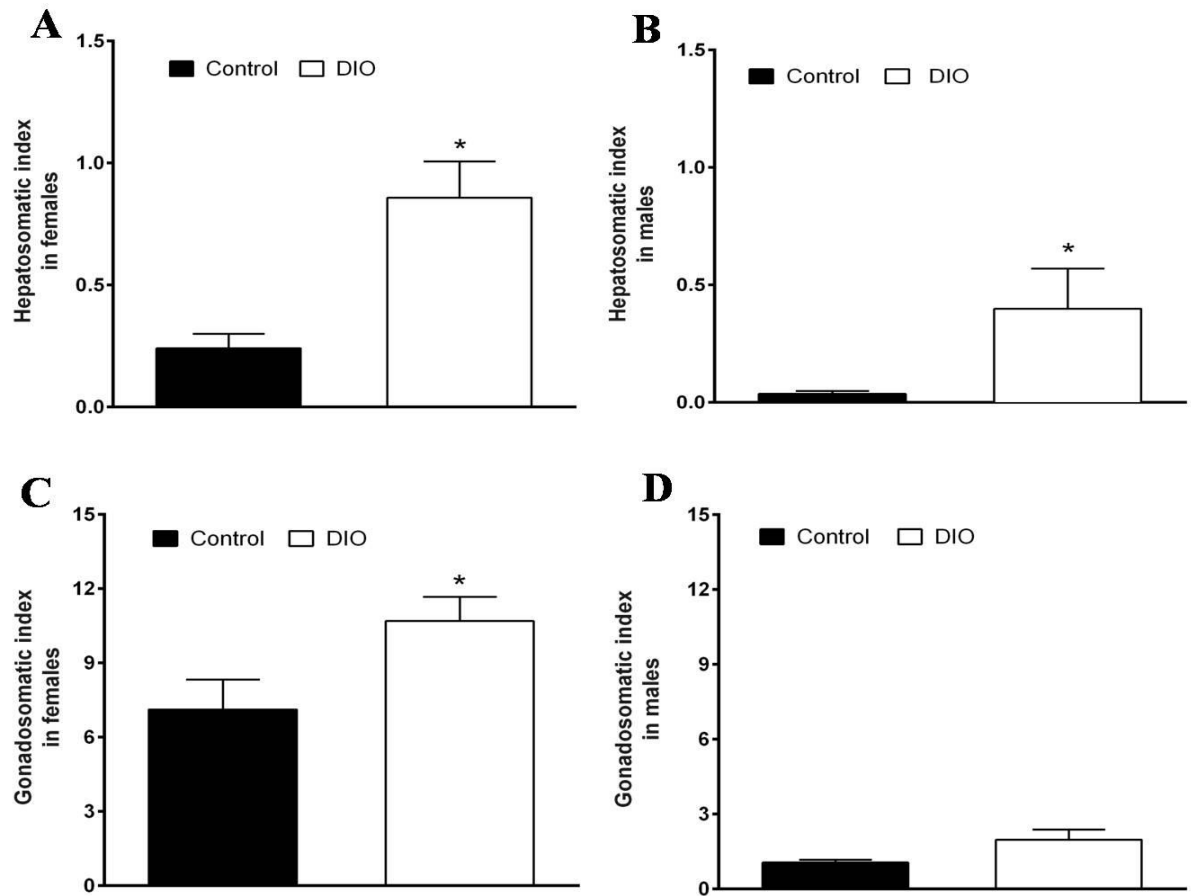


Figure 4: Evaluation hepatosomatic and gonadosomatic index of parents. HSI on zebrafish females ( $P < 0.01$ ,  $n=20$ ) (A) and on males ( $P < 0.05$ ,  $n=18$ ) (B). IGS on zebrafish females ( $P < 0.01$ ,  $n=20$ ) (C) and males ( $P > 0.05$ ,  $n=18$ ) (D). All the values are an average  $\pm$  standard average error (\*) are significantly different between groups on the indicated week. ( $p < 0.05$ ).

### 3.1.4 Histological analysis

#### 3.1.4.1 Adipose tissue

On a morphometric evaluation of the adipose tissue it was identified that the visceral and subcutaneous adipocytes had shown higher average diameter on animals in DIO group comparing to animals of the control group. The females in DIO group presented an increase of 42% on the average diameter of subcutaneous adipocytes ( $P < 0.001$ ) and 47% on the average diameter of visceral adipocytes ( $P < 0.001$ ), comparing to females of the control group (Fig. 5 A-B). Diet effects on the adipocytes size were unobtrusive on males (Fig. 5 C-D), that had an increase of 27% ( $P < 0.001$ ) on the subcutaneous adipocytes size and 35% of the visceral adipocytes ( $P < 0.001$ ) related to the males of the control group.

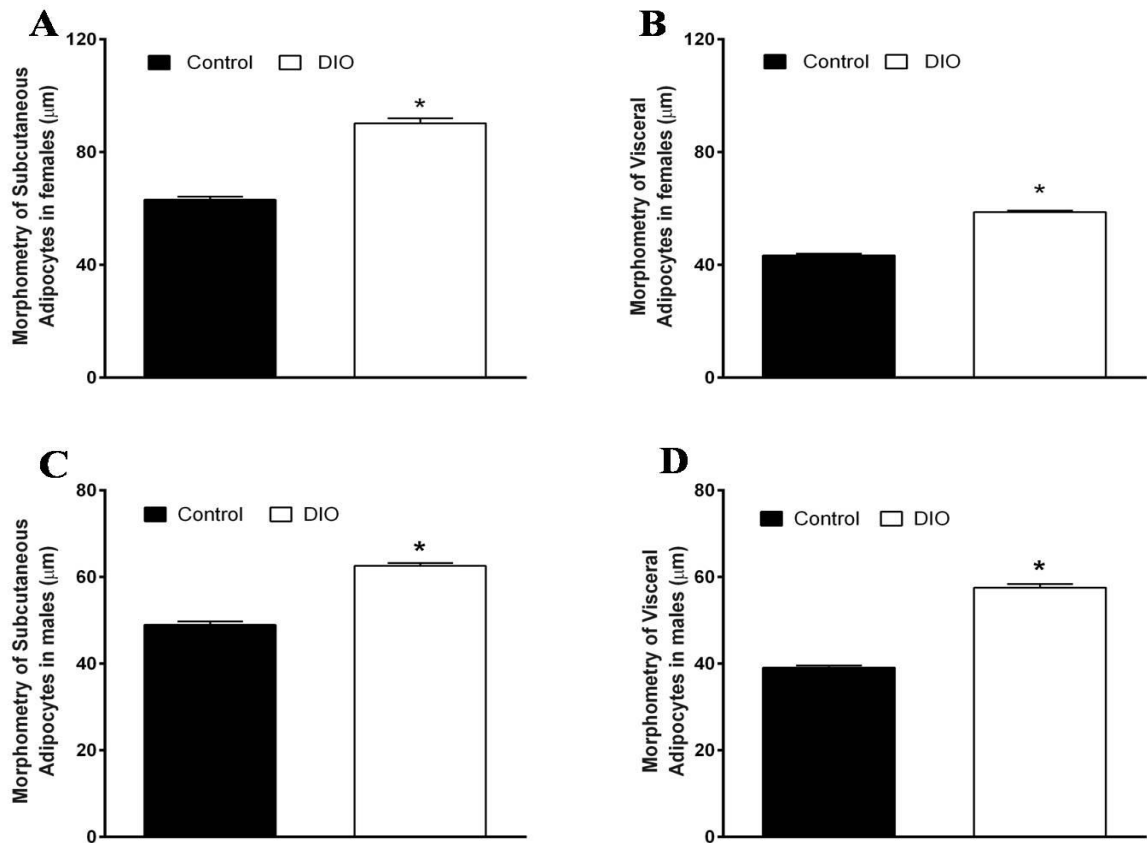


Figure 5: Evaluation of visceral and subcutaneous adipose tissue at the end of the last feeding week. Zebrafish females evaluated ( $P < 0,01$ ,  $n=8$ ) (A-B) and males ( $P < 0,05$ ,  $n=10$ ) (C-D). All the values are an average  $\pm$  standard average error (\*) are significantly different between groups ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.4.2 Gonads

In both groups, all females were in the stage of mature ovarian development (Stage C), since they had a larger amount of oocytes on complete vitellogenesis (Phase V). Related to the adipocytes size, females in DIO group had shown an increase of 28% ( $P < 0,001$ ) in relation to females of the control group (Fig. 6).

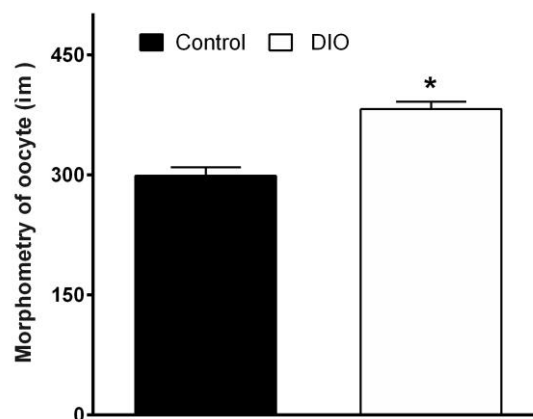


Figure 6: Evaluation of oocyte size. Zebrafish females analyze ( $P < 0,01$ ,  $n=8$ ). All the values are an average  $\pm$  standard average error (\*) are significantly different between groups ( $P < 0,05$ ).

## 3.2 Obesity effects on zebrafish reproduction capacity

### 3.2.1 Total spawning

The animals of the DIO group had a higher spawning on the second feeding week in relation to group C (+88%  $P < 0,05$ ). It was also observed that both groups had shown different spawning behaviors during the eight feeding weeks ( $P < 0,05$ ) (Fig. 7).

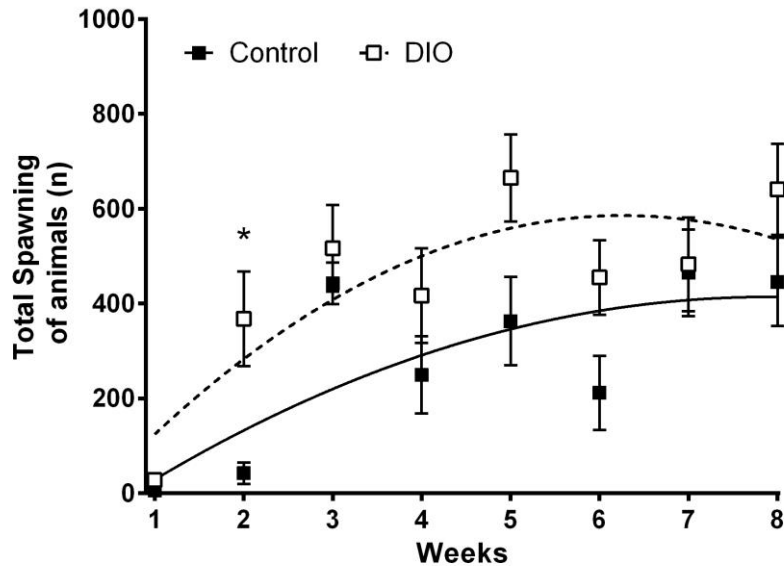


Figure 7: Total spawning (n) of DIO groups and control groups during the eight feeding weeks. All the values are an average  $\pm$  standard average error (\*) are significantly different between groups ( $P < 0,05$ ).

### 3.2.2 Fertility and fertilization rate

The animals in DIO group had bigger fecundity ( $P < 0,05$ ) (Fig. 8). It wasn't observed any significant difference ( $P < 0,05$ ) on the fertilization rate (Appendix 1) between groups.

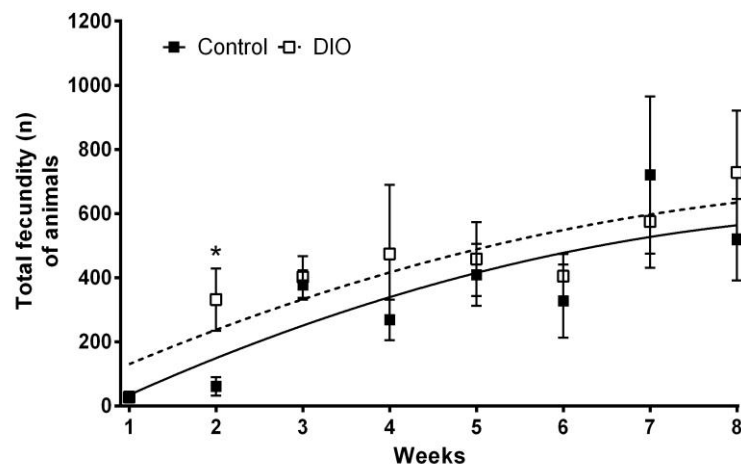


Figure 8: Total fecundity (n) of DIO groups and control groups. All the values are an average  $\pm$  standard average error (\*) are significantly different between groups ( $P < 0,05$ ).

### 3.3 Parental obesity induction effects on zebrafish offspring

#### 3.3.1 Embryonic mortality at 120 hpf

The embryonic mortality rate observed at 120 hpf of the DIO group formed an upward curve with statistical difference ( $P < 0.05$ ) in relation to the rate of embryonic mortality in control group, evidenced from the seventh week of overfeeding, during the 8 weeks of food protocol. Contrary to what was verified with the embryos of the animals of the control group that was shown constant. (Fig. 9).

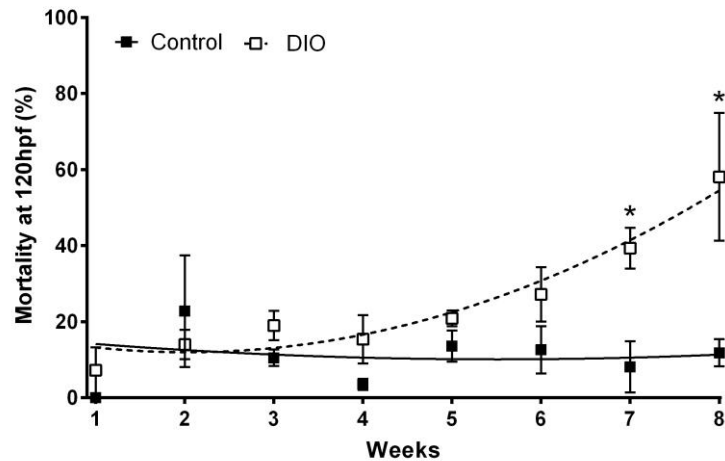


Figure 9: Evaluation of mortality rate on the offspring of treatment of DIO and control groups with 120 hpf. All the values are an average  $\pm$  standard average error (\*) are significantly different between groups on the indicated weeks. ( $P < 0,05$ ).

#### 3.3.2 Hatching rate

The hatching rate had an average 34% less ( $P < 0,05$ ) on the offspring of DIO animals group on the last feeding week than control (Fig. 10).

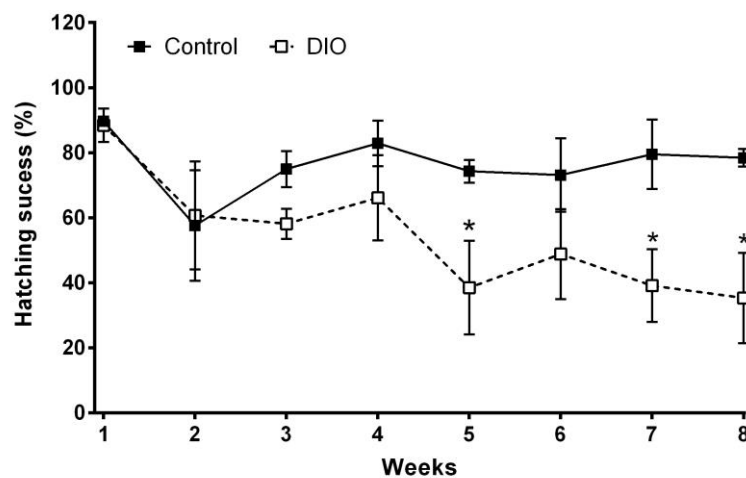


Figure 10: Evaluation of hatching rate on offspring of DIO and control groups with 120 hpf. All the values are an average  $\pm$  standard average error (\*) are significantly different between groups on the indicated week. ( $P < 0,05$ ).

### 3.3.3 Embryonic development

The evaluated deformities were higher ( $P < 0,05$ ) on a frequency of 90% of edema (Fig. 11A), 83% of lordosis (Fig. 11B), and 8% of tail deformity (Fig. 11C) on the DIO group offspring in relation to with the offspring of control group.

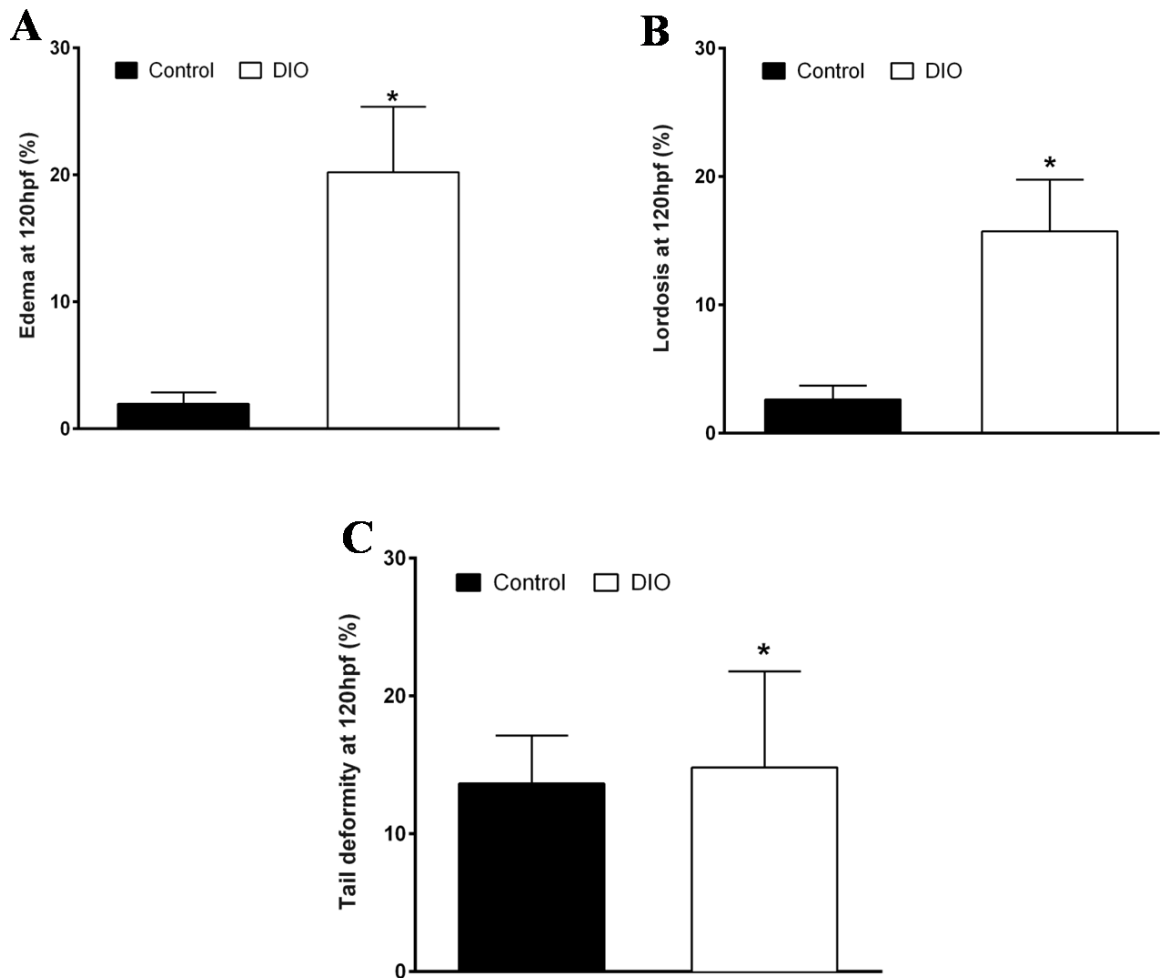


Figure 11: Evaluation of deformity rate in offspring of control and DIO groups with 120 hpf. Evaluation of edema rate (11 A), lordosis (11B) and tail deformity (11 C). All the values are an average  $\pm$  standard average error (\*) are significantly different between groups on the indicated week ( $P < 0,05$ ).

### 3.3.4 Mortality rate in juvenile offspring

During the trial, it was observed that the offspring obtained from DIO group animals had shown a mortality rate of 100 % on the 60 dpf. In contrast, the offspring of the control group had a mortality rate below 10%. Just to emphasize that either the offspring from the DIO group or the one from control group received the same conditions of shelter and feeding.

### 3.3.5 Biochemistry offspring evaluation

The offspring biochemical evaluation was conducted in animals that survived until the 60 dpf. The biochemical results had shown that offspring from DIO group had gained blood glucose 64% and triglycerides 15 % ( $p < 0,01$ ) higher than the control group respectively (Fig. 12 A-B).

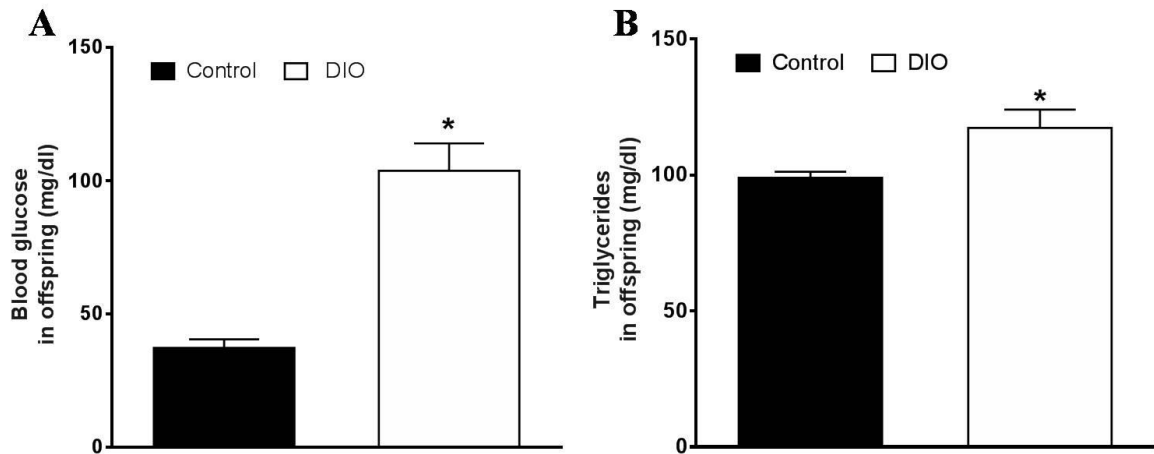


Figure 12: Evaluation of offspring biochemical of control and DIO groups. Blood glucose ( $P < 0,01$ ,  $n=16$ ) (A) and triglycerides analyze ( $P < 0,01$ ,  $n=5$ ) (B). All the values are an average  $\pm$  standard average error (\*) are significantly different between groups. ( $P < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSION

Our results showed that overfeeding in zebrafish causes a gain in body weight, leading to an increase in HSI and hypertrophy of adipose tissue. These changes in zebrafish did not alter their reproductive capacity. There were observed in their offspring in the embryonic phase deleterious impacts such as deformities and high mortality rate, and in the juvenile phase it was observed metabolic disorder, which caused the lethality of all animals.

The published literature until the present days has a lack of information about reproductive parameters analyzes on zebrafish samples with metabolic disturbs, such as overweight and obesity. The few studies conducted the moment had shown just the comparison between sub nutrition and overfeeding on zebrafish reproduction (LEIBOLD E HAMMERSCHMIDT, 2015; NEWMAN *et al.*, 2016), which makes difficult observe the effects of induction to obesity on reproduction. There was a lack of a systematic and wide study of overfeeding effects on the reproduction and offspring of zebrafish.

The results showed that zebrafish had a significant increase in body mass, through overfeeding in the eighth week. One of the causes for increase body mass may be linked to the increase in HSI. The result is a good indication of non-alcoholic liver disease (NAFLD), because the liver

has limited capacity to store fat and, therefore, increased synthesis and storage of lipids can lead to hepatomegaly (FABRINI *et al.*, 2010).

Another important factor for the weight gain of females in DIO group was the increase of visceral and subcutaneous adipose tissue. In teleost fish, such as Zebrafish, the deposition and mobilization of lipids are altered in response to nutritional manipulation and the genes responsible for the differentiation, lipolysis and endocrine regulation of adipocytes are mammalian homologues (MINCHIN *et al.*, 2017). As occurs in mammals, the regional distribution of adipose tissue is implicated in a wide range of disorders, such as insulin resistance, diabetes and cardiovascular diseases (MINCHIN *et al.*, 2018).

As observed by ZANG *et al.* (2017), we obtained hyperglycemia in zebrafish females also in the eighth feeding week. An important aspect of this data, already observed in humans, is the influence of hyperglycemia and maternal overfeeding on offspring development, leading to fetal macrosomia and excess adiposity in the offspring and increasing the risk of childhood obesity (MA, RONALD *et al.*, 2017).

The correlation between maternal hyperglycemia and changes in offspring development was also observed in our results, in which the offspring of the DIO group also presented hyperglycemia with 60 dpf, given this, to date not reported in the literature, and new studies are necessary to understand the mechanisms underlying this condition in zebrafish. Data reported in mammals, such as humans and mice, have shown that a hyperglycemic maternal environment can lead to methylations and acetylations during oocyte development causing negative epigenetic changes (OU *et al.*, 2019).

The results obtained herein show different phenotypes depending on the sex of the animal, because, unlike the ones observed in females, in males, there was no difference in body weight gain, GSI or alteration in blood glucose rates. This result differs from the findings of ZANG *et al.* (2017) on which we base our feeding protocol. This difference in response with the same obesity induction protocol is also described by NEWMAN *et al.* (2016), demonstrating the need for a standardization of the conditions of animal facilities, in addition to feeding.

A comparison with males of the same age, healthy females have lower skeletal muscle mass and higher fat mass. These data were also observed in this study with the morphometry analysis of adipose tissue that showed higher adipocytes hypertrophy in females than in males, due to overfeeding. As a consequence, there is a possibility of more free fatty acids circulating in females and higher lipid content, factors that may promote a higher incidence of insulin resistance in females compared to males (MAUVAIS-JARVIS, FRANCK, 2018).

The results of male weight gain corroborate with the data shown by Meguro *et al.* (2015), indicating that the distribution of body fat in zebrafish females was higher than in males, and

that these differences are similar to those of humans. Although the males not show clear signs of obesity, such as females in DIO group, such as significant weight gain, hyperglycemia and elevated triglycerides, males of the DIO group showed an increase in IHS. The liver is considered the organ most vulnerable to altered nutritional programming and plays an important role in the maintenance of lipid and glucose homeostasis to damage induced by hepatic oxidative stress (YZYDORCZYK, CATHERINE *et al.*, 2017).

Another important result reported was the greater hypertrophy of subcutaneous and visceral adipose tissue of males in DIO group, even though there was no difference in weight gain. The increase in adiposity is a worrying factor, since, as already observed in mice, it can unbalance the release of gonadotrophins in the hypothalamic-pituitary axis, which may compromise the adequate spermatogenic event (ARASE *et al.*, 2011; CARDOSO *et al.*, 2017). In this study we used the feeding protocol with a total duration of 8 weeks, perhaps with the extension of this protocol, it is possible to identify greater metabolic damages in males.

Data demonstrates that paternal obesity also affects offspring health, inducing a worsening of insulin secretion and glucose tolerance over time (NG *et al.*, 2010). As in humans, studies on the potential effects of obesity and overfeeding on the epigenetics of spermatozoa in fish are limited (HOUFFLYN *et al.*, 2017).

An important point for the study of the supply of food for zebrafish is the fact that nutrient availability exerts a deep influence on the growth, metabolism and sexual maturation that are key issues related to a good reproduction in the fish (ZHU *et al.*, 2015; KUZUHARA *et al.*, 2019). With the overfeeding protocol performed on zebrafish, spawning and fecundity rate was higher at the beginning of the reproduction stimulus, afterwards, there was no difference with the control group.

It has already been verified that feeding frequency in zebrafish does not affect their reproductive capacity, provided that the minimum amount of feed offered is higher than 5% of their body weight (LAWRENCE *et al.*, 2012). Zebrafish females require a large number of lipids to produce oocytes, so to produce eggs a certain amount of fatty acids, specifically polyunsaturated fatty acids (KOLB *et al.*, 2018). The fact that the DIO group has been exposed to a greater supply of nutrients may have optimized gonadal development and fertility, favoring better spawning, as observed in this study (MONTEIRO *et al.*, 2018).

During the reproductive cycle, the weight of the female gonads may suffer changes due to the accumulation of reserve material in the maturing oocytes, serving as an indication of the functional status of the ovary (COSTA *et al.*, 2005). Our results also showed that the accumulation of nutrients offered also influenced the GSI and the size of the oocytes in phase V. The increase of GSI by overfeeding has already been reported by other studies with



zebrafish (LEIBOLD & HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2015; BUERGUER *et al.*, 2019), showing that much of the energy supplied to the zebrafish can be converted to a greater accumulation of vitellogenin (KATTI *et al.*, 2017).

The best spawning observed in DIO group can also be explained by the fact that fish reproduction is controlled by the state of the body's energy reserves and is sensitive to different metabolic stimuli (GIOACCHINI *et al.*, 2010). For complete activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and its proper functioning in adulthood, they are critically dependent on adequate body energy reserves (HILL *et al.*, 2008).

Among the control and DIO groups, there was no difference in fertilization rate, indicating that zebrafish does not develop overfeeding related infertility as described in humans (Giviziez *et al.*, 2016).

Similar results were also found by studies that evaluated the effect of overfeeding on zebrafish reproduction, demonstrating that obesity affects fish and mammalian reproduction in a remarkably different way (LEIBOLD and HAMMERSCHMIDT, 2015; NEWMAN *et al.*, 2016). One of the possible hypotheses for this result is the fact that oocyte formation and maturation are different between fish and mammals, and may have adverse sensitivities to obesity (DESHPANDE *et al.*, 2013; GURAYA *et al.*, 2012).

In addition to the evaluated reproductive parameters, the effect of induction on parental obesity was also evaluated in zebrafish first generation (F1) embryo development. This study was necessary because many studies have identified epigenetic changes related to the nutritional status of offspring parents, demonstrating that genes play an important role in predisposing individuals to obesity in humans, rodents and non-human primates (MAFFEIS *et al.*, 2017; ZAMBRANO *et al.*, 2010; MCCURDY *et al.*, 2009). It has been shown that having one or both of the obese parents, especially the mother, increases the risk of obesity in the offspring, causing several comorbidities and abnormalities (HAIRE-JOSHU *et al.*, 2016; OZANNE, 2015; MAHUTTE *et al.*, 2018).

Our results showed that the offspring in DIO group obtained a higher rate of deformities such as edema, lordosis and deformity in the tail, presenting in the last week of feeding also a higher mortality rate and consequently less hatching. It demonstrate that in long term, the excess nutrients for the zebrafish have a negative effect on their offspring.

As deformities in development and mortality rate were induced by parents' exposure to obesity induction and the consequences reported are similar to parental toxicity tests in zebrafish, a hypothesis would be of the causes for these events to also be similar as endocrine disruption or in HPG axis transcripts, as GH, from parents and during the early stages of fish life (MU *et al.*, 2015, CAO *et al.*, 2019).

New studies will be of extreme importance to validate such questions since GH regulates somatic growth, organ and tissue development and metabolic processes in fish and their absence can cause alterations in post-embryonic somatic growth and adipogenesis being a good indicator for the relationship with overfeeding problems (MCMENAMIN *et al.*, 2013, LIU *et al.*, 2014).

The offspring in DIO group also showed biochemical changes at two months of age, as they presented hyperglycemia and high levels of triglycerides reaching 100% mortality at 60dpf. Noting that the offspring of the two groups, DIO and control, received the same conditions of maintenance and feeding, therefore, the causes for this result is a consequence of feeding of the parents. These results have never been reported so far in the literature using zebrafish as a model for obesity, and therefore the mechanisms underlying this condition are unknown.

## **5. CONCLUSION**

In this study, the induction of obesity by overfeeding in the parents led to the hypertrophy of visceral and subcutaneous adipose tissue, causing in females an increase in HIS and gain of body mass and hyperglycemia, but did not affect their reproductive capacity. Therefore, offspring from overfed animals presented deleterious consequences, such as morphological deformities, metabolic disorders such as hyperglycemia and elevated triglycerides causing 100% lethality around 60 dpf of age.

Therefore, our results show that zebrafish submitted to obesity induction, even though it does not present infertility, as reported in mammals, presents a transgenerational characteristic of this condition, with a negative and deleterious impact on the offspring.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARASE, Shigeki, *et al.* "Endocrine disrupter bisphenol A increases in situ estrogen production in the mouse urogenital sinus." **Biology of reproduction**, v. 84, n. 4, p. 734-742, 2011.

BUERGER, Amanda N. *et al.* Examining the responses of the zebrafish (*Danio rerio*) gastrointestinal system to the suspected obesogen diet ethylhexyl phthalate. **Environmental Pollution**, v. 245, p. 1086-1094, 2019.

CASTRO, T. F. D. *et al.* Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult *Danio rerio* exposed to tebuconazole-based commercial product. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 62, p. 140-146, 2018.

CAO, Fangjie *et al.* Parental exposure to a zoxytrobins causes developmental effects and disrupts gene expression in F1 embryonic zebrafish (*Danio rerio*). **Science of The Total Environment**, v. 646, p. 595-605, 2019.

CARDOSO, A. M. *et al.* Obesogens and male fertility. **Obesity reviews**, v. 18, n. 1, p. 109-125, 2017.

COSTA, ANA PAULA RIBEIRO *et al.* Indicadores quantitativos da biologia reprodutiva de fêmeas de piau-vermelho no Rio Paraíba do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 8, p. 789-795, 2005.

CHEN, Qi *et al.* Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. **Science**, v. 351, n. 6271, p. 397-400, 2016.

DAMMSKI, A. P. *et al.* **Zebrafish - Manual de criação em Biotério**. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, p. 20-1, 2011.

DESHPANDE, Prasad A.; PANCHARATNA, A. Oogonial proliferation, oogenesis, folliculogenesis and vitellogenesis in the ovary of zebrafish (*Danio rerio*): A histological and histochemical analysis. **Int J Curr Res**, v. 6, p. 1565-1567, 2013.

FABBRINI, E; SULLIVAN, S; KLEIN, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 679-689, 2010.

GALINDO-VILLEGAS, *Jet al.* Regulation of immunity and disease resistance by commensal microbes and chromatin modifications during zebrafish development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 201209920, 2012.

GIOACCHINI, GIORGIA *et al.* Increase of fecundity by probiotic administration in zebrafish (*Danio rerio*). **Reproduction**, v. 140, n. 6, p. 953- 959, 2010.

GIVIZIEZ, Christiane R. *et al.* Obesity and anovulatory infertility: a review. **JBRA assisted reproduction**, v. 20, n. 4, p. 240, 2016.

GONZALES, JR; JOHN, M. Preliminary evaluation on the effects of feeds on the growth and early reproductive performance of zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 51, n. 4, p. 412-417, 2012.

GURAYA, Sardul S. Biology of ovarian follicles in mammals. **Springer Science & Business Media**, 2012.

HAIRE-JOSHU, Debra; TABAK, Rachel. Preventing obesity across generations: evidence for early life intervention. **Annual review of public health**, v. 37, p. 253-271, 2016.

HILL, Jennifer W.; ELMQUIST, Joel K.; ELIAS, Carol F. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 294, n. 5, p. E827-E832, 2008.

HOUFFLYN, Sam; MATTHYS, Christophe; SOUBRY, Adelheid. Male obesity: epigenetic origin and effects in sperm and offspring. **Current molecular biology reports**, v. 3, n. 4, p. 288-296, 2017.

KATTI, Pancharatna A. *et al.* IGF1 stimulates differentiation of primary follicles and their growth in ovarian explants of zebrafish (*Danio rerio*) cultured in vitro. **Journal of biosciences**, v. 42, n. 4, p. 647-656, 2017.

KIMMEL, C. B. *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

KOLB, Amy; HILDEBRANDT, Friedhelm; LAWRENCE, Christian. Effects of Diet and Social Housing on Reproductive Success in Adult Zebrafish, *Danio rerio*. **Zebrafish**, v. 15, n. 5, p. 445-453, 2018.

KUZUHARA, Hirotsune *et al.* Food availability before aestivation governs growth and winter reproductive potential in the capital breeding fish, *Ammodytes japonicus*. **PloSone**, v. 14, n. 3, p. e0213611, 2019.

LANDGRAF K *et al.* Short-term overfeeding of zebrafish with normal or high-fat diet as a model for the development of metabolically healthy versus unhealthy obesity. **BMC Physiol**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2017.

LAWRENCE, Christian *et al.* The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquaculture**, v. 368, p. 103-108, 2012.

LEIBOLD, Sandra; HAMMERSCHMIDT, Matthias. Long-term hyperphagia and caloric restriction caused by low-or high-density husbandry have differential effects on zebrafish postembryonic development, somatic growth, fat accumulation and reproduction. **PloSone**, v. 10, n. 3, p. e0120776, 2015.

LIU, Wanjing *et al.* Microcystin-LR exposure to adult zebrafish (*Danio rerio*) leads to growth inhibition and immune dysfunction in F1 offspring, a parental transmission effect of toxicity. **Aquatic toxicology**, v. 155, p. 360-367, 2014.

MA, Ronald CW; POPKIN, Barry M. Intergenerational diabetes and obesity—A cycle to break? **PLoS Medicine**, v. 14, n. 10, p. e1002415, 2017.

MAFFEIS, Claudio; MORANDI, Anita. Effect of maternal obesity on foetal growth and metabolic health of the offspring. **Obesity facts**, v. 10, n. 2, p. 112-117, 2017.

MAHUTTE, NEAL *et al.* Obesity and Reproduction. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v. 40, n. 7, p. 950-966, 2018.

MAUVAIS-JARVIS, Franck. Gender differences in glucose homeostasis and diabetes. **Physiology&behavior**, v. 187, p. 20-23, 2018.

MCCURDY, Carrie E. *et al.* Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 2, p. 323-335, 2009.

MCMENAMIN, Sarah K. *et al.* Dwarfism and increased adiposity in the gh1 mutant zebrafish vizzini. **Endocrinology**, v. 154, n. 4, p. 1476-1487, 2013.

MEGURO, Shinichi; HASUMURA, Takahiro; HASE, Tadashi. Body fat accumulation in zebrafish is induced by a diet rich in fat and reduced by supplementation with green tea extract. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120142, 2015.

MINCHIN, J. E. N.; RAWLS, J. F. In vivo imaging and quantification of regional adiposity in zebrafish. In: **Methods in cell biology**, v. 138, p. 3-27, 2017.

MINCHIN, James EN *et al.* Deep phenotyping in zebrafish reveals genetic and diet-induced adiposity changes that may inform disease risk. **JournalofLipidResearch**, v. 59, n. 8, p. 1536-1545, 2018.

MONTEIRO, Joana *et al.* The impact of two different cold-extruded feeds and feeding regimens on zebrafish survival, growth and reproductive performance. **Journal of developmental biology**, v. 6, n. 3, p. 15, 2018.

MU, Xiyan *et al.* Occurrence and origin of sensitivity toward difenoconazole in zebrafish (*Danio reio*) during different life stages. **Aquatic Toxicology**, v. 160, p. 57-68, 2015.

NEWMAN, TRENT *et al.* Dietary intake influences adult fertility and offspring fitness in zebrafish. **PloSone**, v. 11, n. 11, p. e0166394, 2016.

NG, SHEAU-FANG *et al.* Chronic high-fat diet in fathers programs  $\beta$ -cell dysfunction in female rat offspring. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 963, 2010.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. (2013). Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. Guidelines for the Testing of Chemicals.

OKA, TAKEHIKO *et al.* Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. **BMC physiology**, v. 10, n. 1, p. 21, 2010.

OU, Xiang-Hong; ZHU, Cheng-Cheng; SUN, Shao-Chen. Effects of obesity and diabetes on the epigenetic modification of mammalian gametes. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 6, p. 7847-7855, 2019.

OZANNE, Susan E. Epigenetic signatures of obesity. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 10, p. 973-974, 2015.

PORTHA, Bernard; GRANDJEAN, Valérie; MOVASSAT, Jamileh. Mother or Father: Who Is in the Front Line? Mechanisms Underlying the Non-Genomic Transmission of Obesity/Diabetes via the Maternal or the Paternal Line. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 233, 2019.

R Development Core Team. R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, 2014.

SANCHEZ-GARRIDO, Miguel Angel *et al.* Intergenerational influence of paternal obesity on metabolic and reproductive health parameters of the offspring: male-preferential impact and involvement of Kiss1-mediated pathways. **Endocrinology**, v. 159, n. 2, p. 1005-1018, 2018.

SELLAYAH, Dyan *et al.* Maternal Obesity During Pregnancy and Lactation Influences Offspring Obesogenic Adipogenesis but Not Developmental Adipogenesis in Mice. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 495, 2019.

SPENCE, R. *et al.* The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, London, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.

VARGAS, Rafael; VÁSQUEZ, Isabel Cristina. Effects of overfeeding and high-fat diet on cardiosomatic parameters and cardiac structures in young and adult zebrafish. **Fish physiology and biochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1761-1773, 2017.

VAZZOLER, A. E. A. M. *et al.* Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. **Maringá: Eduem**, v. 169, 1996.

YZYDORCZYK, CATHERINE *et al.* Transient postnatal overfeeding causes liver stress-induced premature senescence in adult mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12911, 2017.

ZAMBRANO, E. *et al.* RAPID REPORT: dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. **The Journal of physiology**, v. 588, n. 10, p. 1791-1799, 2010.

ZANG, LIQING; MADDISON, LISETTE A.; CHEN, WENBIAO. Zebrafish as a model for obesity and diabetes. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 6, 2018.

ZANG, LIQING; SHIMADA, YASUHITO; NISHIMURA, NORIHIRO. Development of a novel zebrafish model for Type 2 diabetes mellitus. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1461, 2017.

ZHOU, YIN *et al.* Diet-Induced Paternal Obesity Impairs Cognitive Function in Offspring by Mediating Epigenetic Modifications in Spermatozoa. **Obesity**, v. 26, n. 11, p. 1749-1757, 2018.

ZHU, Zhiming *et al.* Effects of ration levels on growth and reproduction from larvae to first-time spawning in the female *Gambusia affinis*. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 3, p. 5604-5617, 2015.



## APPENDIX 1

Appendix 1: Fertilization Rate (% [n]) of the Control and DIO groups during the eight weeks of feeding

Weeks	Control	DIO
1	89,66 ± 0,0	89,00 ± 6,6
2	49,64 ± 18,5	73,80 ± 8,1
3	77,20 ± 5,49	64,80 ± 4,4
4	84,00 ± 7,01	73,25 ± 8,78
5	84,00 ± 2,35	53,30 ± 14,0
6	81,00 ± 7,64	74,20 ± 11,6
7	84,33 ± 8,29	82,33 ± 4,3
8	85,25 ± 2,59	58,30 ± 20.7

All the values are an average ± standard average error.