



BÁRBARA DO CARMO RODRIGUES VIROTE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TRANSGERACIONAL DA INDUÇÃO A
OBESIDADE POR DIETA NO ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)**

**LAVRAS – MG
2024**

BÁRBARA DO CARMO RODRIGUES VIROTE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TRANSGERACIONAL DA INDUÇÃO A
OBESIDADE POR DIETA NO ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)**

Tese 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 Animal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

Prof. Dra. Mônica Rodrigues Ferreira Machado
Co-orientadora

Prof. Dr. André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna
Co-orientador

**LAVRAS – MG
2024**

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.

Avaliação do efeito transgeracional da indução a obesidade por
dieta no zebrafish (*Daniorerio*) / Bárbara do Carmo Rodrigues
Virote. - 2024.

105 p.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Coorientador(a): Mônica Rodrigues Ferreira Machado, André
Rodrigues da Cunha Barreto Vianna.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Síndrome Metabólica. 2. Peixes. 3. Transgeracional. I.
Murgas, Luis David Solis. II. Machado, Mônica Rodrigues Ferreira.
III. Vianna, André Rodrigues da Cunha Barreto. IV. Título.

BÁRBARA DO CARMO RODRIGUES VIROTE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TRANSGERACIONAL DA INDUÇÃO A
OBESIDADE POR DIETA NO ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)**

**EVALUATION OF THE TRANSGENERATIONAL EFFECT OF OBESITY
INDUCTION BY DIET IN ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)**

Tese 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 Animal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 30 de janeiro de 2024.
Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard UFMG
Dra. Mônica Rodrigues Ferreira Machado UFJ
Dr. André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna UFPR
Dra. Sandra Aparecida Benite-Ribeiro UFJ

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

Prof. Dra. Mônica Rodrigues Ferreira Machado
Co-orientadora

Prof. Dr. André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna
Co-orientador

**LAVRAS – MG
2024**

AGRADECIMENTOS

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

A minha mãe Jussara que é a base de tudo o que eu consegui até hoje, dedico todo meu amor e agradecimento. Ao meu marido Alisson, que teve compreensão nos meus momentos de desespero, apoio incondicional nas minhas decisões e teve um esforço exímio para ser o melhor companheiro em cada etapa dessa trajetória.

À minha irmã de coração, Kiara, que esteve ao meu lado em todos os momentos, oferecendo apoio incondicional e incentivo durante toda a jornada deste doutorado. É difícil colocar em palavras o quanto sou grata por tudo o que você fez para garantir o sucesso deste projeto. Sua ajuda e companhia foram essenciais para mim.

Um agradecimento especial a Lara Nesteruk por me apresentar a importância de enfrentar a realidade, buscar o conhecimento de maneira lógica e basear as decisões éticas em princípios objetivos. Foram norteadores para mim, em vários momentos dessa jornada.

Ao meu professor e orientador Murgas, que é um exemplo de profissional e ser humano. É um privilégio indescritível ter contado com a orientação singular dele ao longo desses anos. Agradeço pelas inúmeras oportunidades proporcionadas, pelo constante incentivo, pela confiança depositada em meu trabalho, pelo apoio, e, acima de tudo, pela amizade sincera cultivada durante nossa jornada acadêmica conjunta. Um agradecimento especial, repleto de gratidão, à sua esposa Adriana, por abrir as portas que deram início à minha trajetória acadêmica.

À minha coorientadora, Mônica, por sua confiança desde o início, ao proporcionar todas as oportunidades necessárias para a realização deste projeto. Que honra poder contar com o apoio de uma profissional que sempre admirei! Trabalhar no LabFish ao longo do ano de 2022 foi verdadeiramente enriquecedor, proporcionando um crescimento profissional que se revelou inestimável. Os momentos compartilhados foram marcados por valiosas oportunidades, cafés deliciosos e uma troca de conhecimento que ficará para sempre em minha memória.

Ao meu coorientador André, o primeiro idealizador desse trabalho. Mesmo distante fisicamente, sua presença esteve sempre notável ao longo da execução do projeto, oferecendo todo o suporte necessário.

Expresso minha profunda gratidão também à professora Ana Lúcia e ao Renato, que me acolheram de braços abertos e foram fundamentais em todas as etapas das análises moleculares. Agradeço sinceramente por toda a orientação, apoio e valioso aprendizado proporcionados por essa colaboração.

Aos meus colegas de trabalho do biotério por todo o carinho, amizade, compreensão e ajuda nesse tempo que trabalhamos juntos.

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.

RESUMO

O presente estudo buscou investigar os efeitos de uma dieta hipercarboidrática na indução da obesidade em zebrafish adultos ao longo das gerações. Para isso, foram utilizados animais de ambos os sexos, que, durante doze semanas, foram divididos em dois grupos conforme dieta fornecida. O grupo Controle, alimentado com uma dieta equilibrada para a espécie, enquanto o grupo Dieta Rica em Carboidrato (HCD) recebeu uma alimentação com alto teor de carboidratos. Na última semana do protocolo alimentar, os animais da geração parental (P) foram submetidos ao manejo de reprodução. Neste, com o intuito de investigar isoladamente influências maternas e paternas, foi realizado cruzamentos específicos de sexo entre os grupos parentais, gerando assim quatro grupo experimentais na geração F1. Ao atingirem a maturidade sexual, cada um dos grupos foi subdividido em dois subgrupos: um que recebeu a dieta Controle, enquanto o outro foi submetido ao consumo HCD, resultando em oito grupos na geração F1 adulta que foram submetidos ao mesmo protocolo alimentar que a geração P. Ao final, os grupos também foram submetidos ao manejo reprodutivo, culminando na produção da geração F2 que não foi submetida aos cruzamentos intergrupais. Para avaliar o impacto da dieta nos animais adultos ao final de cada protocolo alimentar, das gerações P e F1, foram realizadas análises do peso corporal, morfometria dos adipócitos subcutâneo e visceral, análises bioquímicas e enzimáticas. Adicionalmente, foi avaliada a regulação transcricional de genes associados ao comportamento alimentar, neuroinflamação e epigenética. Como resultado na geração P, houve um aumento significativo do peso corporal dos animais do grupo HCD a partir da quinta semana ($p < 0,05$), sendo induzido uma condição semelhante a obesidade em todos os parâmetros analisados. Além disso, os animais apresentaram comportamento semelhante a ansiedade e neles foram identificadas alterações na regulação transcricional de genes cujos produtos são associados ao consumo alimentar e perfil inflamatório. Machos e fêmeas da geração F1, descendentes de pais obesos e submetidas ao consumo HCD, também apresentam alteração na regulação genes relacionados a neuroinflamação e epigenética. O consumo da HCD não afetou a capacidade reprodutiva dos diferentes grupos analisados nas gerações P e F1. Entretanto, foram identificadas alterações nos perfis inflamatórios e na atividade das enzimas antioxidantes na prole dos machos e fêmeas que consumiram HCD ao longo das gerações. Esses achados fornecem dados inéditos para uma melhor compreensão dos efeitos transgeracionais da obesidade induzida por dietas ricas em carboidratos em zebrafish.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Síndrome Metabólica, Peixes.

ABSTRACT

The present study aimed to investigate the effects of a high-carbohydrate diet on the induction of obesity in adult zebrafish across generations. To achieve this, animals of both sexes were used and, for twelve weeks, were divided into two groups based on the diet provided. The Control group was fed a balanced diet for the species, while the High Carbohydrate Diet (HCD) group received a high-carbohydrate diet. In the last week of the feeding protocol, the parental generation (P) animals underwent reproductive management. Specific sex crossings between parental groups were conducted to independently investigate maternal and paternal influences, resulting in four experimental groups in the F1 generation: F1C; F1HCD; F1P; and F1M. Upon reaching sexual maturity, each group was subdivided into two subgroups: one receiving the Control diet, while the other was subjected to HCD consumption. This resulted in eight groups in the adult F1 generation that underwent the same feeding protocol as the P generation. Finally, the groups were also subjected to reproductive management, leading to the production of the F2 generation, which was not subjected to intergroup crossings. To assess the impact of the diet on adult animals at the end of each feeding protocol, for both P and F1 generations, analysis of body weight, subcutaneous and visceral adipocyte morphometry, biochemical, and enzymatic analyses were performed. Additionally, transcriptional regulation of genes associated with feeding behavior, neuroinflammation, and epigenetics modifications was evaluated. Results from the P generation showed a significant increase in the body weight of HCD group animals from the fifth week onwards ($p < 0.05$), inducing a condition similar to obesity in all analyzed parameters. Furthermore, these animals exhibited anxiety-like behavior, and alterations in the transcriptional regulation of genes associated with food consumption and inflammatory profile were identified. Male and female F1 generation descendants of obese parents subjected to HCD also showed changes in the regulation of genes related to neuroinflammation and epigenetics modifications. HCD consumption did not affect the reproductive capacity of the different groups analyzed in the P and F1 generations. However, alterations in inflammatory profiles and the activity of antioxidant enzymes were identified in the offspring of males and females that consumed HCD across generations. These findings provide unprecedented data for a better understanding of the transgenerational effects of obesity induced by high-carbohydrate diets in zebrafish.

Keywords: Oxidative stress; Metabolic Syndrome; Fish.

INDICADORES DE IMPACTO

O estudo apresentado nesta tese investigou os impactos transgeracionais da obesidade induzida por uma dieta rica em carboidratos em zebrafish (*Danio rerio*). Os resultados obtidos fornecem insights cruciais para uma melhor compreensão dos efeitos do excesso de carboidratos no metabolismo desses animais, contribuindo para o avanço do conhecimento científico sobre a obesidade e seus mecanismos. Esses achados têm implicações significativas para a saúde pública, fornecendo informações valiosas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e intervenções preventivas mais eficazes contra a obesidade. Além disso, o estudo demonstra a relevância do modelo animal zebrafish para investigações sobre obesidade e fornece uma base sólida para futuras pesquisas nessa área. Quanto aos impactos extensionistas, o trabalho envolveu colaborações com a sociedade externa à UFLA, incluindo parceiros de pesquisa de diversas Universidades como UFMG, UFJ e UFPR. Os resultados estão alinhados com várias áreas temáticas da Política Nacional de Extensão, incluindo saúde, meio ambiente e tecnologia e produção. Além disso, os impactos do estudo contribuem para o cumprimento dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, como o ODS 3 (Saúde e Bem-Estar) e o ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis), ajudando o Brasil a avançar em direção à Agenda 2030 de desenvolvimento sustentável. Em resumo, este trabalho representa uma contribuição significativa para a compreensão e mitigação dos impactos da obesidade, além de demonstrar o potencial do zebrafish como modelo para estudos translacionais na área da saúde.

IMPACT INDICATORS

The study presented in this thesis investigated the transgenerational impacts of obesity induced by a high-carbohydrate diet in zebrafish (*Danio rerio*). The findings provide crucial insights into a better understanding of the effects of excess carbohydrates on the metabolism of these animals, contributing to the advancement of scientific knowledge about obesity and its mechanisms. These findings have significant implications for public health, providing valuable information for the development of more effective therapeutic strategies and preventive interventions against obesity. Additionally, the study demonstrates the relevance of the zebrafish animal model for research on obesity and provides a solid foundation for future research in this area. Regarding extensionist impacts, the work involved collaborations with society outside UFLA, including research partners from various universities such as UFMG, UFJ, and UFPR. The results align with several thematic areas of the National Extension Policy, including health, environment, and technology and production. Furthermore, the impacts of the study contribute to the fulfillment of the United Nations Sustainable Development Goals (SDGs), such as SDG 3 (Good Health and Well-being) and SDG 12 (Responsible Consumption and Production), helping Brazil advance towards the 2030 Agenda for sustainable development. In summary, this work represents a significant contribution to understanding and mitigating the impacts of obesity, as well as demonstrating the potential of the zebrafish as a model for translational studies in the field of health.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	12
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 A OBESIDADE.....	13
2.1.1 Etiologia	10
2.1.2 Epidemiologia	13
2.1.3 Fisiopatologia.....	14
2.1.4 O papel da inflamação.....	17
2.1.5 Estresse Oxidativo.....	19
2.1.6 Aspectos transgeracionais	20
2.1.6.1 Teoria da programação fetal – Teoria de Barker.....	22
2.2 ZEBRAFISH COMO MODELO PARA OBESIDADE	24
2.2.1 Metabolismo de carboidratos	25
2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	27
2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
 SEGUNDA PARTE- ARTIGOS	41
ARTIGO 1 - Induction of obesity by a high-carbohydrate diet in zebrafish modulates genes related to feeding behavior and inflammation.....	41
 ARTIGO 2 - Avaliação dos efeitos da ingestão da dieta com alto teor de carboidratos em fêmeas e machos de zebrafish ao longo de duas gerações.....	70

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica multifatorial decorrente do desequilíbrio crônico entre a ingestão de calorias e o gasto energético, sendo definida pela Organização Mundial da Saúde como um acúmulo excessivo de gordura que pode afetar o metabolismo. A prevalência da obesidade está aumentando de forma desordenada nas últimas décadas em diferentes países, tornando-se uma epidemia mundial e um fator risco para outras comorbidades relacionadas (WHO, 2020).

Dentro desse cenário, a prevalência da obesidade tem crescido significativamente em homens e mulheres durante a idade reprodutiva, um dado preocupante visto que estudos mostram que a obesidade materna e/ou paterna pode acarretar consequências a longo prazo na prole, aumentando o risco de obesidade e doenças metabólicas ao longo de todas as fases da vida (Suárez et al., 2023).

Essa é uma resposta pelos mecanismos genéticos ocasionadas pela obesidade, como também por indução de alterações epigenéticas, que podem afetar o fenótipo da prole, influenciando assim o risco posterior de obesidade e suas comorbidades (Reichetzeder, 2021). Porém, os mecanismos biológicos subjacentes que medeiam os efeitos transgeracionais da obesidade ainda não são totalmente elucidados dentro da literatura. Tornando-se imprescindível a utilização de modelos animais que conseguem preencher muitas dessas lacunas, sendo que idealmente, o modelo deve ser de fácil observação comportamental, apresentar curto intervalo entre gerações, permitindo estudos de multigerações em um período razoável (Baker *et al.*, 2014).

Dentro desse cenário, 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 da dieta com alto teor de carboidratos em machos e fêmeas e analisar seu impacto transgeracional.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A OBESIDADE

2.1.1 Etiologia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a obesidade como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura que determina prejuízos à saúde, sendo a causa fundamental um desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e gastas (WHO, 2020).

A obesidade é classificada, principalmente, pelo índice de massa corporal (IMC, kg/m^2), que é um critério limitado, porém, um método simples e eficaz em rastreios de saúde pública e pesquisas epidemiológicas. É considerado, de acordo com a OMS, como obesidade grau I, IMC entre 30 e 34,9 Kg/m^2 , obesidade grau II, IMC de 35 a 39,9 kg/m^2 e obesidade grau III, $\text{IMC} \geq 40 \text{kg/m}^2$ (Damaso et al., 2022).

As causas que predispõem um indivíduo a obesidade estão relacionadas a interação de fatores fisiológicos, genéticos, metabólicos, ambientais, comportamentais, culturais e sociais (Oliveira, 2022). Muitas doenças e condições crônicas são diretamente causadas ou adversamente afetadas pela obesidade, o que a torna uma preocupação de saúde pública global. Estas incluem diabetes mellitus tipo 2 (DM2), esteatose hepática não alcoólica, doença renal crônica, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial sistêmica (HAS), apneia do sono, distúrbios musculoesqueléticos e certos tipos de câncer como o endométrio, mama, ovário, próstata, fígado, vesícula biliar, rim e cólon. Essas e outras condições estão diretamente relacionadas à obesidade e diminuem a longevidade e a qualidade de vida (Mayoral et al., 2020).

2.1.2 Epidemiologia

A prevalência da obesidade se intensificou de maneira desordenada nas últimas três décadas em praticamente todos os países do mundo, constituindo uma epidemia, que tem representado uma crise emergente da saúde pública nos últimos anos (Endalifer et al., 2020; Safei et al., 2021).

O relatório de nutrição de 2017 da OMS mostrou que 2 bilhões de adultos estão com sobrepeso/obesidade e 41 milhões de crianças estão com sobrepeso em todo o

mundo, e atualmente é classificada como a quinta causa mais comum de morte por ter uma grande influência sobre vários fatores de risco associados a diferentes tipos de doenças (Jaacks et al., 2019).

Esse panorama mundial foi intensificado com a pandemia da COVID-19, por causa do isolamento social e o bloqueio impostos às populações com o intuito de controlar a proliferação do vírus (Pellegrini et al., 2020). Como consequência, a obesidade aumentou devido a estas mudanças drásticas nas rotinas diárias, grande parte das pessoas se tornaram reféns do estresse, tiveram alterações no padrão de sono, deixaram de praticar atividade física, e aumentaram o consumo de alimentos processados e industrializados (Steenblock et al., 2022). Nos EUA, a pandemia de COVID-19 promoveu ganho de massa corporal em adultos, sendo aqueles já obesos mais suscetíveis (Seal et al., 2022). No entanto, foi visto que crianças e adolescente foram ainda mais expostos ao risco de mudanças negativas no estilo de vida e ganho de peso durante este período de confinamento (CENA et al., 2021).

No Brasil, segundo a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) do Ministério da Saúde (MS), a frequência de excesso de peso teve um aumento de 72% nos últimos treze anos, partindo de 11,8% em 2006 para aproximadamente 20% em 2019. Considerando o índice de massa corporal (IMC) como principal fator indicador de sobrepeso e obesidade, em relação aos adultos, há mais homens (57,1%) com sobrepeso (IMC maior que 25) do que mulheres (53,9%). Além disso, 12,9% das crianças brasileiras entre 5 e 9 anos de idade têm obesidade, assim como 7% dos adolescentes na faixa etária de 12 a 17 anos (Vigitel, 2021).

2.1.3 Fisiopatologia

A partir da década de 1940, ficou evidente que o hipotálamo desempenha um papel importante no metabolismo energético com funções de regulação do peso corporal, auxílio no controle da ingestão de alimentos, regulação do gasto energético e o armazenamento da gordura no organismo (Hetherington et al., 1940; Williams et al., 2020). Em particular, a região do núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) contém dois microcircuitos peptídicos que controlam o balanço energético com funções antagônicas: a pró-opiomelanocortina (POMC) sinaliza saciedade e reduz a ingestão alimentar e o peptídeo relacionado ao agouti /neuropeptídeo-Y (AgRP/NPY) sinaliza a fome e estimula a ingestão de alimentos (Vohra et al., 2022).

Por isso, tornou-se um importante alvo para estudos sobre a obesidade, a compreensão do balanço energético de longo prazo, com o estímulo de hormônios como a leptina secretada pelo tecido adiposo branco (GASQUES et al., 2022) e o circuito relacionado ao comportamento alimentar de curto prazo, com influência da via AgRP/NPY (Gjermani et al., 2021) (Figura 1).

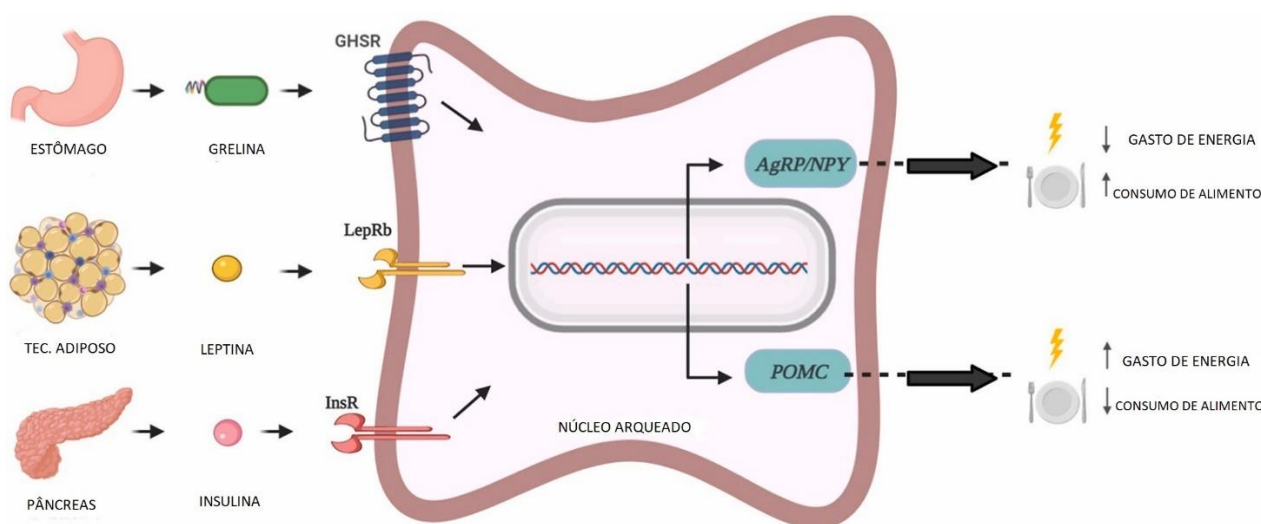


Figura 1: Representação simplificada dos mecanismos hipotalâmicos de regulação do balanço energético. Fonte: Adaptado de (Vohra et al., 2022).

Durante a alimentação, a leptina, hormônio peptídeo de 167 aminoácidos, liga-se ao receptor da leptina (LEPR), principalmente no núcleo arqueado, ativando a pró-opiomelanocortina (POMC), que atua como precursor do hormônio estimulante α -melanócito (α -MSH) (Mantzoros et al., 2011). Após essa ligação há um estímulo à redução do consumo de alimento e o aumento do gasto calórico na via conhecida como sistema da leptina-melanocortina (Gasques et al., 2022). Em indivíduos obesos são observados níveis aumentados de leptina proporcionalmente ao seu peso corporal e a massa adiposa, consolidando a resistência à leptina (Gjermani et al., 2021).

Entretanto, mesmo que a leptina seja um dos principais hormônios relacionado com a obesidade, a compreensão completa de como esses fatores estão mecanicamente ligados ou como essas vias são alteradas, ainda não está totalmente elucidado na literatura (Obradovic et al., 2021). Embora já se tenha conhecimento que a leptina deve passar pela barreira hematoencefálica (BHE) por meio de um transportador específico e saturável, e os mecanismos de dessensibilização e *downregulation*, causando a degradação dos receptores ou inibição reversível podem ser causados por diversos fatores circulantes.

Como por exemplo, a inibição por *feedback* via supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3) e proteína tirosina fosfatase 1B, visto que a expressão desses reguladores negativos está elevada no hipotálamo de animais obesos e são relacionados a altos níveis de triglicerídeos (Banks et al., 2004; Wauman et al., 2017; Izquierdo et al., 2019).

Dentro do sistema da leptina-melanocortina, um dos principais papéis da leptina no SNC é ativar os neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo que expressam a POMC (Rodrigues et al., 2003). Este pró-hormônio, identificado pela primeira vez em 1977, é expresso na hipófise e no hipotálamo, funciona em uma variedade de processos fisiológicos que vão desde a analgesia até a obesidade, dando origem a peptídeos bioativos, como a corticotrofina (ACTH), as melanocortinas - MSH (α , β e γ) e a β -endorfina.

As enzimas que convertem POMC em MSH incluem convertases de pró-hormônio (PCs), carboxipeptidases (CPs) e monooxigenase peptidil- α -amidating (PAM) (Lindberg et al., 2021). Alterações que geram mutações inativadoras das enzimas PCs e/ou CPs, e assim alteram a produção de melanocortinas, especialmente de MC4R, também desempenham um papel crítico na obesidade.

Outra via de controle da homeostase energética, envolve os estímulos orexigênicos de curto prazo, sendo os principais participantes o neuropeptídeo relacionado a agouti (AgRP) e o neuropeptídeo Y (NPY), que estimulam a ingestão de alimentos e reduzem o gasto energético (Gjermeni et al., 2021). O NPY é produzido por neurônios do sistema nervoso simpático e induz vasoconstrição e expansão do tecido adiposo, sendo liberado em casos de balanço energético negativo, ou seja, em jejum (Kuo et al., 2007). O AgRP também é um neuropeptídeo estimulador do apetite, que atua nos mesmos neurônios que o NPY, também é estimulado por concentrações plasmáticas diminuídas de leptina e insulina, que inibem tonicamente esses neurônios (Gjermeni et al., 2021). Em 1996, Erickson et al. relataram que o NPY é produzido em maior quantidade no hipotálamo de camundongos obesos. Posteriormente, foi visto que a injeção intracerebroventricular crônica de NPY em roedores normais imita o fenótipo de deficiência de leptina, incluindo obesidade, hiperfagia, termogênese reduzida, fertilidade diminuída e inibição da produção de hormônio do crescimento (Spezani, 2020).

Em consonância com a importância dos neurônios hipotalâmicos na fisiopatologia da obesidade, é importante ressaltar que hormônios como a grelina, colecistocinina e as incretinas funcionam como mensageiros de níveis de energia periférica para o sistema nervoso central, ativam neurônios aferentes vagais que transmitem o sinal do trato

gastrointestinal para áreas do cérebro posterior, incluindo o núcleo do trato solitário (Gjermeni et al., 2021). No núcleo arqueado do hipotálamo, esses hormônios ativam neurônios envolvidos na regulação do apetite, assim como NPY e o AgRP (Grill et al., 2012).

2.1.4 O papel da inflamação

O tecido adiposo é o principal local de armazenamento de energia no corpo, sendo dividido em Tecido Adiposo Subcutâneo (TAS) e Tecido Adiposo Visceral (TAV), essa divisão possui diferença tanto em função quanto na histologia. O TAV é um órgão composto principalmente por adipócitos firmemente apoiados em tecido conjuntivo com uma densa rede de capilares que inclui células-tronco, pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e células imunes, já o TAS possui como seu maior componente adipócitos grandes e esféricos, responsáveis pelo armazenamento de ácidos graxos (AG) que são liberados quando ocorre um balanço energético negativo, como no jejum (Trayhurn, 2013; Silveira, 2020).

Os adipócitos que constituem esses tecidos sintetizam e secretam inúmeros peptídeos bioativos, chamados adipocinas (que podem ou não ser citocinas), as quais possuem atividades endócrinas, autócrinas e parácrinas com funções modulatórias da inflamação e do sistema imune (Prado et al., 2019; Silveira, 2020).

Nesse contexto, quando o tecido adiposo se expande patologicamente, causando hipertrofia e/ou hiperplasia dos adipócitos, no quadro da obesidade, a angiogênese local não acompanha essa expansão, ocorrendo inadequado suprimento de sangue e de oxigênio, levando à hipóxia tecidual local (Engin, 2017).

Mediante ao baixo fluxo de sangue no tecido adiposo branco (TAB), esse se adapta funcional e metabolicamente, sob a regulação da expressão de certos genes e de outros fatores de transcrição que estimulam a secreção de uma série de adipocinas pró-inflamatórias que configuram a base para a resposta inflamatória (Trayhurn, 2013).

Por isso que, na obesidade, ocorre uma micro inflamação decorrente da baixa tensão de O₂ que ocorre na maioria dos adipócitos hipertrofiados. Essa hipóxia nos adipócitos resulta no aumento da produção de leptina, do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e diminui a produção de adiponectina, o que se relaciona com a ativação da inflamação (Taylos et al., 2021) (Figura 2).

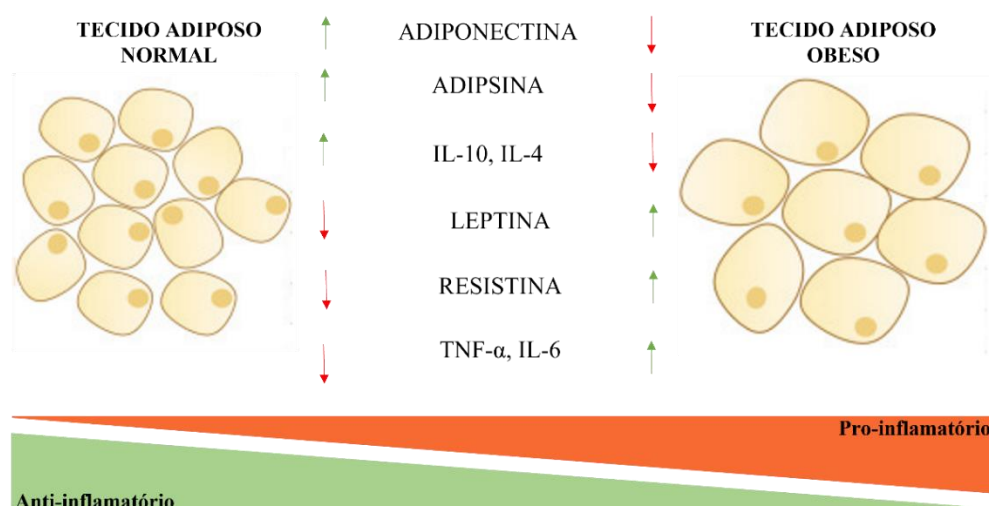


Figura 2: Alterações do perfil de secreção de adipocinas em resposta a obesidade
 Fonte: Adaptado de (Taylor et al., 2021).

Posteriormente, o quadro da inflamação crônica de baixo grau, acarreta a produção exacerbada de sinais inflamatórios pelos adipócitos estimulando a diferenciação de macrófagos M1 que por sua vez liberam óxido nítrico, TNF- α , IL-6 e IL-1 (Weisberg et al., 2003). Como consequência, os macrófagos e adipócitos, estimulam mutuamente a atividade inflamatória um do outro e contribuem significativamente para uma inflamação sistêmica crônica do indivíduo obeso (Berg; Scherer, 2005).

Além disso, há aumento do número de mastócitos, células dendríticas (DCs), CD4⁺, linfócitos Th1, Th17 e T citotóxicos CD8⁺ no tecido adiposo obeso (Taylor et al., 2021) (Figura 3).

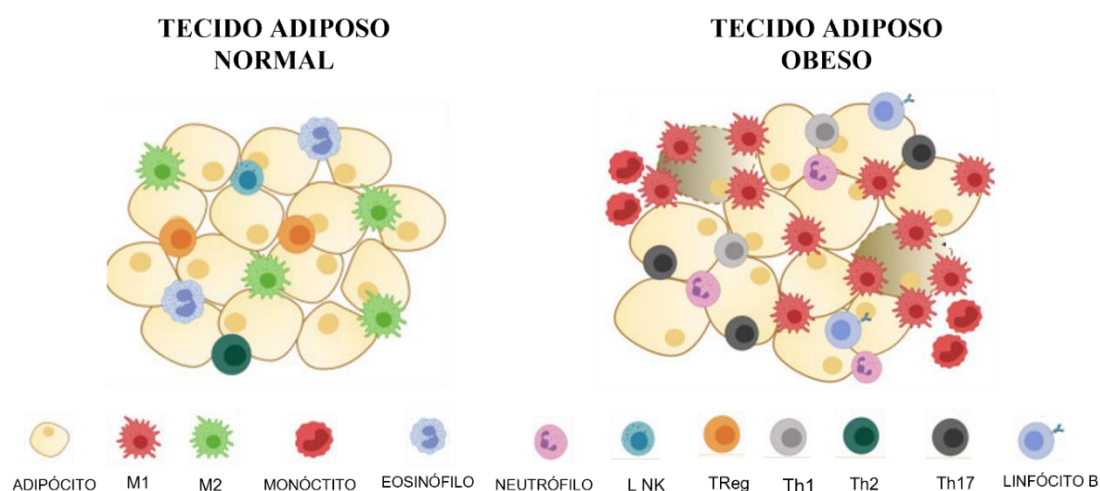


Figura 3: Alterações das células imunes em resposta a obesidade no tecido adiposo. M1: macrófagos fenótipo M1, M2: macrófagos fenótipo M2, Th1: linfócitos T *helper* 1, Th2: linfócito T *helper* 2, Th17: linfócitos T *helper* 17, T reg: linfócitos T reguladores

Fonte: Adaptado de (Taylor et al., 2021; Silveira, 2020).

Em resposta a essa inflamação crônica em baixo grau, há evidências com relação a resistência à insulina (RI) em obesos, comprometendo a ação biológica da insulina para manter a homeostase glicêmica e lipídica, o que resulta gradualmente em manifestações de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (Guria et al., 2023).

A RI é uma complicação metabólica, na qual as células do músculo esquelético, fígado e tecido adiposo se tornam menos responsivos à ação da insulina. É uma condição caracterizada por falhas graves na captação da glicose, síntese de glicogênio e oxidação da glicose (Ormazabal et al., 2018). Em resposta a esse quadro metabólico, as células β do pâncreas secretam nível mais elevados de insulina, acarretando hiperinsulinemia, hiperglicemia persistente e DM2 (Zatterale et al., 2020).

A primeira evidência de associação entre RI e inflamação foi hipotetizada quando, após a administração de componentes anti-inflamatórios observou-se reversão do quadro da homeostase da glicose em pacientes obesos (Williamson, 1901; Yuan et al., 2001). Posteriormente, foi demonstrado em estudos mais refinados e aprofundados que componentes pró-inflamatórios aumentados na obesidade, como a IL-1 β diminui a captação de glicose, reduzindo a expressão do transportador de glicose tipo 4 (Ballak et al., 2015). Como também a IL-6 leva a um comprometimento da sinalização da insulina, por inibição da fosforilação da tirosina tanto no fígado quanto no tecido adiposo, como também estimula apoptose nas células β (Akbari; Hassan-Zadeh, 2018; Zatterale et al., 2020).

Recentemente, as consequências da inflamação crônica advindas da obesidade ganharam atenção especial durante a pandemia da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) que causa a doença coronavírus 2019 (COVID-19). Isso porque foram observadas associações entre aumento de hospitalização, probabilidade de necessitar de tratamento em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e maiores taxas de mortalidade em pacientes com COVID-19 com sobrepeso e/ou obesidade (Du et al., 2021; De Nooijer et al., 2023).

2.1.5 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é a redução da capacidade de agentes antioxidantes, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase, e o aumento na produção de espécies reativas do oxigênio. Quando as enzimas são liberadas

em excesso ocasionam efeitos deletérios em proteínas e fragmentação do DNA levando a certas doenças inflamatórias e oxidativas (Poprac et al., 2017).

Esses danos celulares, que se encontram aumentados em indivíduos obesos, predis põem às comorbidades já citadas, como hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, eventos tromboembólicos, diabetes mellitus, além de neoplasias.

No entanto, a geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico. Eles são necessários para que funções como a sinalização celular e a defesa contra micro-organismos ocorram de maneira adequada. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas (Do Nascimento et al., 2022). Porém, a produção excessiva pode conduzir a lesões oxidativas. Segundo França et al. (2017) existem pelo menos 3 mecanismos através dos quais a obesidade pode acarretar o estresse oxidativo:

1. A obesidade aumenta a necessidade metabólica do miocárdio, com o consequente aumento do consumo de oxigênio. Com isso, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como os superóxidos e os peróxidos de hidrogênio aumenta devido à maior respiração mitocondrial. Se a produção dessas espécies de oxigênio exceder a capacidade antioxidante da célula, o estresse oxidativo pode ocorrer, resultando em peroxidação lipídica;
2. A obesidade é caracterizada pela lesão celular progressiva e cumulativa devido à quantidade de tecido adiposo acumulados nos compartimentos corporais. Como consequência há liberação de citocinas, como o fator de necrose tumoral, que gera espécies reativas de oxigênio;
3. Um último mecanismo proposto é que através de uma dieta hiperlipêmica se altere o metabolismo do oxigênio, pois as moléculas dos ácidos graxos com duplas ligações são vulneráveis a reações oxidativas e consequentemente podem levar a peroxidação lipídica.

2.1.6 Aspectos transgeracionais

A obesidade é uma doença complexa resultante da interação entre fatores ambientais, genéticos e epigenéticos. As principais características genéticas da obesidade consistem nas mutações em genes chaves que controlam o apetite e o metabolismo. Sendo que pode ser explicada de duas formas: síndrômica (provocada por alterações no cromossomo) e não síndrômica (sendo monogênica ou poligênica) (Duarte, 2022).

A obesidade sindrômica é rara, possui alta variabilidade fenotípica e frequentemente é associada a anormalidades cromossômicas, como aneuploidias, microdeleções e duplicações (Carvalho et al., 2022; Kehinde et al., 2022). É uma variação acompanhada de diversas comorbidades, entre elas dismorfismo craniofacial, deficiências do neurodesenvolvimento e várias formas de malformações congênitas (Singh et al., 2017). As deficiências do neurodesenvolvimento podem se manifestar com restrições significativas no funcionamento cognitivo e podem ser acompanhadas por comportamentos adaptativos que tendem a ser aparentes na infância ou adolescência (Kehinde et al., 2022).

Esse tipo de obesidade é associada a várias síndromes, como a síndrome Prader-Willi, causada pela falta de expressão dos genes herdados do pai no cromossomo 15q11.2-q13, que gera anormalidades endócrinas, como deficiência do hormônio do crescimento, insuficiência renal, hipotireoidismo e hipogonadismo (Cassidy et al., 2012; Littleton et al., 2020). As síndromes de Bardet-Biedl e de Alström, que são transmitidas de forma autossômica recessiva e causam dificuldades de aprendizagem e visão, anormalidades genitais, renais e estruturais, como polidactilia, braquidactilia e sindactilia (Suspitsin; Imyanitov, 2016; Geets et al., 2019).

Por outro lado, a obesidade monogênica não sindrômica é caracterizada por mutações em um único gene, cuja expressão raramente é afetada pelo meio. Os casos deste tipo de obesidade são considerados raros, estão associados a apenas 5% dos casos de obesidade na população, embora sejam a forma mais grave da doença (Albuquerque et al., 2017). Dentre os genes afetados estão os pertencentes ao sistema leptina-melanocortina hipotalâmico, como os genes da leptina (LEP) e seu receptor (LEPR), da pró-opiomelanocortina (POMC) e do receptor de melanocortina tipo 4 (MC4R) (Littleton et al., 2020).

Em casos de mutações autossômicas recessivas homozigóticas no gene da leptina, acarreta a expressão de fenótipos de várias doenças, incluindo hiperfagia, hiperinsulinemia, disfunção do sistema imunológico e infertilidade (Salum et al., 2021). Sendo já visto também que pacientes com mutações nos genes MC4R possuem dificuldade na perda de peso até mesmo após serem submetidos a cirurgia bariátrica (Li et al., 2019).

Entretanto, a maioria dos indivíduos com obesidade apresentam a obesidade poligênica ou multifatorial. A susceptibilidade para obesidade poligênica difere de indivíduo para indivíduo e é influenciada por um somatório de variantes genéticas e

ambientais (Duarte, 2022). Durante a última década, estudos de varredura do genoma (GWAS) surgiram como uma poderosa ferramenta para buscar identificar *locus* associados com doenças poligênicas complexas, como a obesidade (Locke et al., 2015). Esses tipos de análises de poligenes derivados de GWAS são considerados excelentes aliados para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos moleculares envolvidos na regulação do peso corporal (Hinney; Hebebrand, 2008).

Com a utilização de GWAS, cerca de 127 locais informativos no genoma humano foram relatados para mostrar ligação com a obesidade, e mais de 500 genes relacionados à obesidade (Duis et al., 2022; Mahmoud et al., 2022).

Outro estudo analisou dados de transcriptômica de 549 indivíduos obesos relacionando os dados em 20 tecidos diferentes. Eles identificaram que os genes mais alterados relacionados com o aumento do IMC são os expressos no tecido adiposo, esôfago, pâncreas, hipófise e pele (Hao et al., 2018).

2.1.7.1 Teoria da programação fetal – Teoria de Barker

Nos últimos 30 anos, a prevalência da obesidade tem crescido significativamente em homens e mulheres durante a idade reprodutiva (Suárez et al., 2023). Um dado preocupante, visto que na literatura científica há diversos estudos que relacionam a ocorrência da obesidade materna e/ou paterna, ao maior risco de desenvolvimento de doenças na prole ao nascimento, na infância, na adolescência e na vida adulta (Maffei et al., 2017).

Isso ocorre, pois os fatores genéticos desempenham um papel importante na determinação da suscetibilidade individual ao ganho de peso e à obesidade, porém, variáveis ambientais, como nutrição e estilo de vida, podem contribuir para essa tendência. Essas variáveis têm a capacidade de alterar a expressão gênica sem afetar a sequência do DNA, fenômeno conhecido como epigenética (Mahmoud et al., 2022). Isto levou a um crescente interesse dentro da comunidade científica em compreender o papel potencial da epigenética como um mediador de interações gene-ambiente subjacentes ao desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades associadas (Vandijk et al., 2015).

A primeira hipótese sugerindo o papel da epigenética no desenvolvimento de doenças metabólicas, descreveu que os eventos iniciais da vida afetam os resultados da saúde do indivíduo também na idade adulta (Suárez et al., 2023). No entanto, esse campo

de estudo só foi aprofundado e alcançou relevância com o desenvolvimento de novas tecnologias laboratoriais, sendo possível ser elucidado que as alterações epigenéticas significativas são constituídas por metilação do DNA, modificações de histonas, a acetilação é a mais conhecida, como também outros mecanismos como fosforilação, ribosilação e ubiquitilação (Rönn et al., 2015; Sadakierska-Chudy; Filip, 2015).

Um dos primeiros trabalhos que abriram as portas para essa área da ciência foi o estudo de 1986 publicado por David Barker e Charles Osmond, no qual evidenciaram, por meio de dados epidemiológicos, que na Inglaterra e País de Gales havia uma relação entre o estado nutricional dos pais com a mortalidade infantil e a prevalência de isquemia cardíaca e, posteriormente, também correlacionou o baixo peso ao nascer com o desenvolvimento de hipertensão e outras doenças cardíacas na vida adulta (Barker; Osmond, 1986; Barker et al., 1989).

Posteriormente, essa relação entre o estado nutricional dos pais e a saúde da prole, em períodos sensíveis do desenvolvimento ficou conhecido como “janelas de programação” (Ferreira, 2022). Evidencia-se na literatura científica que modificações fisiológicas que venham ocorrer durante estas fases podem comprometer o desenvolvimento de órgãos e/ou sistemas da prole ao longo de toda a vida (Barker, 2007).

Os estudos que correlacionaram aspectos nutricionais dos indivíduos em fases iniciais do desenvolvimento com o surgimento de fisiopatologias ao decorrer da vida, culminaram na publicação da “Hipótese do Fenótipo Poupador”, que propõe a importância de um aspecto nutricional de qualidade durante o período gestacional e nos anos iniciais de vida, assim garantindo o desenvolvimento saudável dos órgãos e sistemas (Barker, 1997). Assim, um ambiente de pior disponibilidade de nutrientes nessa fase levaria a adaptações fisiológicas que aumentaria as chances de sobrevivência neste ambiente de escassez de nutrientes. Todavia, em um ambiente de normalidade ou sobrecarga de nutrientes, as adaptações fisiológicas originariam patologias, como por exemplo, a obesidade e o diabetes do tipo 2 (Barker, 2007).

Após muitas décadas desde a publicação dos primeiros estudos de Barker, sua hipótese tem sido progressivamente ampliada, e uma série de pesquisas adicionais na literatura científica têm contribuído para essa área. Evidências emergentes indicam que a plasticidade fenotípica pode ser iniciada desde a fase de formação do oócito até estágios mais avançados do desenvolvimento, como a puberdade (Ferreira, 2022). A partir da concepção de que não apenas a probabilidade de incidência de doenças, mas também o estado de saúde geral de um indivíduo estão interligados, surgiu o conceito de DOHaD,

representando "Origens do Desenvolvimento da Saúde e Doença". Atualmente, essa área científica está firmemente estabelecida, contando com uma ampla rede de pesquisadores colaborativos em todo o mundo (Pietrobelli et al., 2016).

Atualmente, a hipótese de Barker tem um grande impacto não somente no estudo da obesidade, como também nas áreas da reprodução, da ciência básica no estudo do diabetes, doenças cardiovasculares, osteoporose, e é cada vez mais importante em estudos de câncer, doenças mentais e diversas outras condições patológicas. Uma área de estudo conhecida como uma 'mudança revolucionária', indicando que também está abrindo caminho na consciência pública e popular sobre o assunto da transgeracionalidade das doenças (Scott; Yoshizawa, 2022).

2.2 ZEBRAFISH COMO MODELO PARA O ESTUDO DA OBESIDADE

Como visto anteriormente, a regulação do consumo e gasto de energia envolve muitos órgãos, entre eles o cérebro, intestino, fígado, pâncreas, 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.

Diante desse cenário, o zebrafish (*Danio rerio*) tornou-se um excelente modelo para estudar esse tipo de comorbidade, pois possui os principais órgãos que são importantes para a regulação da homeostase energética (Zang et al., 2018). Além disso, possui as principais funções bem conservadas como a regulação do apetite, regulação da insulina e armazenamento de lipídios (Seth et al., 2013; Zang et al., 2018). Em conjunto com a sua versatilidade, o uso do zebrafish com técnicas recentes em microscopia avançada, análise transcriptômica e metabolômica, permite a aceleração na compreensão dos processos metabólicos e os seus distúrbios associados (Russo et al., 2023).

O primeiro modelo de zebrafish obeso induzido por dieta (DIO) foi publicado em 2010, através de uma superalimentação com artemias 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).

Posteriormente, o zebrafish foi usado também para estudo do desenvolvimento de comorbidades associados à obesidade, como doenças cardiovasculares, e diabetes mellitus tipo 2 (DM2), mostrando ter respostas semelhante a humanos frente a

medicamentos antidiabéticos como a metformina e glibenclamida, desta forma, o zebrafish demonstrou ser adequado para identificação de alvos terapêuticos e triagem química (Bounele *et al.*, 2016; Zang *et al.*, 2017).

Após a consolidação do zebrafish como modelo para doenças metabólicas, vários grupos de pesquisa desenvolveram diferentes métodos para simular com sucesso as patologias humanas como diabetes e obesidade. Entre as metodologias utilizadas, incluem a obesidade induzida por dieta (DIO), dietas ricas em gordura (HFD), modelos hiperglicêmicos, com técnicas distintas para hiperglicemia aguda e crônica, e modelos geneticamente modificados (Heckler; Kroll, 2017; Wiggenhauser; Kroll, 2019; Abookasis *et al.*, 2020; Dorsemans *et al.*, 2017).

Porém, atualmente, muitos laboratórios dependem de dietas comerciais para os protocolos de indução a obesidade, que podem ter composição e/ou origem desconhecidas (Williams e Watts, 2019). Esses ingredientes podem conter componentes dietéticos bioativos não detectados ou não relatados (Watts *et al.*, 2012). Por isso, torna-se imprescindível a compreensão das necessidades nutricionais do zebrafish, assim como a execução de dietas manipuladas para os protocolos de indução a obesidade.

2.2.1 Metabolismo de carboidratos

Os carboidratos são uma importante fonte de energia para os animais, sendo biomoléculas orgânicas chamadas polissacarídeos. Esses polissacarídeos quando digeridos sofrem hidrólise originando monossacarídeos, como por exemplo a glicose (González; Silva, 2007).

A glicose é absorvida de forma rápida, sendo utilizada como fonte de energia imediata. Quando há excesso de sua ingestão, ela é armazenada no organismo dos animais sob a forma de glicogênio, processo chamado de glicogênese (Pratt, 2014).

Os principais estoques de glicogênio são encontrados no músculo esquelético, que serve como reserva energética para a síntese de trifosfato de adenosina (ATP) durante a contração muscular, e no fígado, a função do glicogênio hepático mantém a concentração de glicose sanguínea. Pode ocorrer uma variação nos níveis de glicogênio hepático, por exemplo, os níveis são altos logo após a alimentação e, depois diminuem lentamente à medida que é utilizado para ajudar a manter os níveis de glicose sanguínea entre a alimentação e durante o jejum (Eliseu, 2015).

Em quadros de obesidade, o excesso de glicogênio pode ser armazenado também no tecido adiposo e provoca efeitos prejudiciais, como já demonstrando em camundongos (Duran et al., 2012). Nesses casos, possui a capacidade de modificar o padrão de secreção de adipócitos, diminuindo a liberação de adipocina, adiponectina antiinflamatória, e possui um efeito pró-inflamatório nos macrófagos (Ceperuelo-Mallafre et al., 2016).

Especificamente, para a alimentação de peixes teleósteos, os carboidratos representam um grupo de nutrientes controversos, pois não apresentam um requerimento específico na dieta, mas é a fonte de energia mais barata para a formulação de rações (Da Silveira et al., 2009). Entretanto, os níveis de carboidratos que podem ser utilizados nas dietas dos peixes variam amplamente entre 7% até 40%, dependendo principalmente, de qual é o hábito alimentar de cada espécie, sendo sua digestão relativamente rápida (Seixas Filho et al., 1999).

As espécies de peixes onívoros, como o zebrafish, aceitam bem até 20% de carboidratos na dieta (Da Silveira et al., 2009). Entretanto, a comparação para a forma de utilização de carboidratos entre peixes e mamíferos permanece controverso dentro da literatura pelas diferenças dos hábitos alimentares e pela produção insuficiente de insulina, principalmente dos peixes onívoros (Ma et al., 2020). Embora os sistemas de resposta neurais e hormonais para manter níveis de glicose tenha se mostrado essencial e conservado entre eles (Yuan et al., 2021).

Recentemente, foi evidenciado na literatura a capacidade da programação nutricional em zebrafish sob efeito da utilização de carboidratos (Lu et al., 2022). Um trabalho realizado por Fang et al. (2014) demonstrou que o zebrafish alimentado nas primeiras fases de vida com alto teor de carboidratos apresentou expressão alterada de enzimas relacionadas com a digestão, transporte e metabolismo de carboidratos.

Entretanto, embora já tenha sido relatado que dieta com alto teor de carboidratos pode causar modificações no metabolismo da glicose, que pode ser transmitida para a próxima geração no zebrafish, os mecanismos subjacentes a esse fenômeno ainda não estão totalmente elucidados (Lu et al., 2022).

2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Sabendo-se o impacto da obesidade na saúde pública global, e mais especificamente do seu efeito negativo na reprodução e potencial efeito transgeracional para a prole, foi constatado nessa revisão que muitos mecanismos subjacentes a essa condição ainda não foram totalmente elucidados na literatura. É notável que mais estudos são necessários, para a elucidação de vias metabólicas da doença, e a partir disso a utilização de modelos animais se mostra imprescindível.

Diante deste cenário, o modelo zebrafish (*Danio rerio*) tem sido usado para estudos sobre a obesidade e suas comorbidades, por apresentar características fisiológicas necessárias para o estudo da doença e ainda apresentar vantagens como alta taxa reprodutiva, desenvolvimento embrionário rápido e transparente, o que possibilita analisar como a obesidade pode afetar a reprodução e sua prole desde as primeiras fases de desenvolvimento, com avaliação em de diferentes gerações em um curto espaço de tempo. Dessa forma, são gerados resultados sólidos, confiáveis e valiosos para um melhor entendimento da doença e ser a base para a descobertas de novas alternativas terapêuticas para a obesidade.

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOOKASIS, David et al. Evaluation the effect of acute hyperglycemia on cerebral tissue properties with diffuse optical imaging systems. In: **Neurophotonics**. SPIE, p. 73-78, 2020. <https://doi.org/10.1117/12.2551867>.

AHMAD, Rahnuma; HAQUE, Mainul. Obesity: A Doorway to a Molecular Path Leading to Infertility. **Cureus**, v. 14, n. 10, 2022. <https://doi.org/10.7759/cureus.30770>.

AKBARI, Mohamad; HASSAN-ZADEH, Vahideh. IL-6 signalling pathways and the development of type 2 diabetes. **Inflammopharmacology**, v. 26, p. 685-698, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10787-018-0458-0>.

ALBUQUERQUE, David et al. The contribution of genetics and environment to obesity. **British medical bulletin**, v. 123, n. 1, p. 159-173, 2017. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldx022>.

AYERS, Kristen et al. Melanocortin 4 Receptor Pathway Dysfunction in Obesity: Patient Stratification Aimed at MC4R Agonist Treatment. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 103, n. 7, p. 2601-2612, 2018. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00258>.

BAIG, Mukhtiar et al. Relationship of serum leptin and reproductive hormones in unexplained infertile and fertile females. **Cureus**, v. 11, n. 12, 2019. <https://doi.org/10.7759/cureus.6524>.

BALDINI, Giulia; PHELAN, Kevin. The Melanocortin Pathway and Control of Appetite-progress and Therapeutic Implications. **Journal of Endocrinology**, v. 241, n. 1, p. r1-r33, 2019. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0596>.

BALLAK, Dov et al. IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: Focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. **Cytokine**, v. 75, n. 2, p. 280-290, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.005>.

BANKS, William et al. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. **Diabetes**, v. 53, n. 5, p. 1253-1260, 2004. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.5.1253>.

BARBAGALLO, Federica et al. Molecular mechanisms underlying the relationship between obesity and male infertility. **Metabolites**, v. 11, n. 12, p. 840, 2021. <https://doi.org/10.3390/metabo11120840>.

BARKER, David et al. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **The Lancet**, v. 334, n. 8663, p. 577-580, 1989. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)90710-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(89)90710-1).

BARKER, David. Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. **British medical bulletin**, v. 53, n. 1, p. 96-108, 1997. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a011609>.

BARKER, David. The origins of the developmental origins theory. **Journal of internal medicine**, v. 261, n. 5, p. 412-417, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x>.

BARKER, David; OSMOND, Clive. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **The Lancet**, v. 327, n. 8489, p. 1077-1081, 1986. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)91340-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)91340-1).

BOURNELE, Despina; BEIS, Dimitris. Zebrafish models of cardiovascular disease. **Heart failure reviews**, v. 21, n. 6, p. 803-813, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10741-016-9579-y>.

BROUGHTON, Darcy; MOLEY, Kelle. Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. **Fertility and sterility**, v. 107, n. 4, p. 840-847, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.01.017>.

CAMPBELL, Jared et al. Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: a systematic review and meta-analysis. **Reproductive biomedicine online**, v. 31, n. 5, p. 593-604, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.07.012>.

CARVALHO, Laura et al. Genetic investigation of syndromic forms of obesity. **International Journal of Obesity**, v. 46, n. 9, p. 1582-1586, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41366-022-01149-5>.

CASSIDY, Suzanne et al. Prader-willi syndrome. **Genetics in medicine**, v. 14, n. 1, p. 10-26, 2012. <https://doi.org/10.1038/gim.0b013e31822bead0>.

CENA, Hellas et al. COVID-19 pandemic as risk factors for excessive weight gain in pediatrics: the role of changes in nutrition behavior. a narrative review. **Nutrients**, v. 13, n. 12, p. 4255, 2021. <https://doi.org/10.3390/nu13124255>.

CEPERUELO-MALLAFRÉ, Victòria et al. Adipose tissue glycogen accumulation is associated with obesity-linked inflammation in humans. **Molecular metabolism**, v. 5, n. 1, p. 5-18, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.10.001>.

CHAUDHURI, Gargi et al. Obesity and male infertility: multifaceted reproductive disruption. **Middle East Fertility Society Journal**, v. 27, n. 1, p. 8, 2022. <https://doi.org/10.1186/s43043-022-00099-2>.

CHILDS, Gwen et al. The importance of leptin to reproduction. **Endocrinology**, v. 162, n. 2, p. bqaa204, 2021. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa204>.

DA SILVEIRA, Ulisses; LOGATO, Priscila; DA CONCEIÇÃO PONTES, Edvânia. Utilização e metabolismo dos carboidratos em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 1, p. 817-836, 2009.

DAMASO, Ênio Luís. **Fatores de risco sociodemográficos e reprodutivos associados à obesidade e à síndrome metabólica em uma população de mulheres brasileiras da cidade de Ribeirão Preto: estudo de coorte**. 2022. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DE NOOIJER, Aline et al. Adipocytokine plasma concentrations reflect influence of inflammation but not body mass index (BMI) on clinical outcomes of COVID-19 patients: A prospective observational study from the Netherlands. **Clinical Obesity**, v. 13, n. 2, p. e12568, 2023. <https://doi.org/10.1111/cob.12568>.

DESPRÉS, Jean-Pierre; LEMIEUX, Isabelle. Abdominal obesity, and metabolic

syndrome. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 881-7, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature05488>.

DO NASCIMENTO, Ozanildo; DE ALMEIDA, Sylvia. Estresse oxidativo e sinalizadores inflamatórios como marcadores do quadro de obesidade: Uma breve revisão narrativa. **RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN 2675-6218**, v. 3, n. 8, p. e381746-e381746, 2022. <https://doi.org/10.47820/recima21.v3i8.1746>.

DORSEMAN, Anne-Claire et al. Acute and chronic models of hyperglycemia in zebrafish: a method to assess the impact of hyperglycemia on neurogenesis and the biodistribution of radiolabeled molecules. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 124, 2017. <https://doi.org/10.3791/55203>.

DU, Yanbin et al. Association of body mass index (BMI) with critical COVID-19 and in-hospital mortality: a dose-response meta-analysis. **Metabolism**, v. 117, p.154373, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154373>.

DUARTE, Guilherme Coutinho Kullmann. **Investigação da atuação de mecanismos genéticos, epigenéticos e via das adipocitocinas na obesidade**. 2022. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DURAN, Jordi et al. Deleterious effects of neuronal accumulation of glycogen in flies and mice. **EMBO molecular medicine**, v. 4, n. 8, p. 719-729, 2012. <https://doi.org/10.1002/emmm.201200241>.

DUIS, Jessica; BUTLER, Merlin G. Syndromic and Nonsyndromic Obesity: Underlying Genetic Causes in Humans. **Advanced Biology**, v. 6, n. 10, p. 2101154, 2022. <https://doi.org/10.1002/adbi.202101154>.

ELISEU, Francine Balbinot. **Estudo de alterações no metabolismo de carboidratos do bioindicador *Danio rerio* (zebrafish) em águas contendo íons xantato**. 2015. Dissertação de Mestrado. Centro Universitário La Salle – UNILASALLE.

ENDALIFER, Melese; DIRESS, Gedefaw. Epidemiology, predisposing factors, biomarkers, and prevention mechanism of obesity: a systematic review. **Journal of obesity**, v. 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6134362>.

ENGİN, Atilla. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on preadipocytes and macrophages: hypoxia hypothesis. **Adv. Exp. Med. Biol.**, n. 960, p. 305-326, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_13.

ERICKSON, Jay; HOLLOPETER, Gunther; PALMITER, Richard. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. **Science**, v. 274, n. 5293, p. 1704-1707, 1996. <https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1704>.

FANG, Liu et al. Programming effects of high-carbohydrate feeding of larvae on adult glucose metabolism in zebrafish, *Danio rerio*. **British journal of nutrition**, v. 111, n. 5, p. 808-818, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0007114513003243>.

FERREIRA, Lucas Araújo et al. **Efeito transgeracional da obesidade materna por superalimentação precoce sobre os parâmetros biométricos da prole na vida adulta**. 2022. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás.

FRANÇA, Bruna Karoline et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE jornal português de gastroenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jpg.2013.04.002>.

GASQUES, Luciano Seraphim et al. Obesidade genética não sindrômica: histórico, fisiopatologia e principais genes. **Arq. ciências saúde UNIPAR**, v. 4, p. 159-174, 2022. <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v26i2.2022.8737>.

GEETS, Ellen; MEUWISSEN, Marije EC; VAN HUL, Wim. Clinical, molecular genetics and therapeutic aspects of syndromic obesity. **Clinical genetics**, v. 95, n. 1, p. 23-40, 2019. <https://doi.org/10.1111/cge.13367>.

GJERMENI, Erind et al. Obesity—an update on the basic pathophysiology and review of recent therapeutic advances. **Biomolecules**, v. 11, n. 10, p. 1426, 2021. <https://doi.org/10.3390/biom11101426>.

GOLDSAMMLER, Michelle; MERHI, Zaher; BUYUK, Erkan. Role of hormonal and inflammatory alterations in obesity-related reproductive dysfunction at the level of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, p. 1-10, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0366-6>.

GRILL, Harvey; HAYES, Matthew. Hindbrain neurons as an essential hub in the neuroanatomically distributed control of energy balance. **Cell metabolism**, v. 16, n. 3, p. 296-309, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.015>.

GURIA, Suktara et al. Adipose tissue macrophages and their role in obesity-associated insulin resistance: an overview of the complex dynamics at play. **Bioscience Reports**, v. 43, n. 3, p. BSR20220200, 2023. <https://doi.org/10.1042/BSR20220200>.

HAO, Ruo-Han et al. Gene expression profiles indicate tissue-specific obesity regulation changes and strong obesity relevant tissues. **International Journal of Obesity**, v. 42, n. 3, p. 363-369, 2018. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.283>.

HECKLER, Karl; KROLL, Jens. Zebrafish as a model for the study of microvascular complications of diabetes and their mechanisms. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 9, p. 2002, 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18092002>.

HETHERINGTON, A. W.; RANSON, S. W. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **The Anatomical Record**, v. 78, n. 2, p. 149-172, 1940. <https://doi.org/10.1002/ar.1090780203>.

HINNEY, Anke; HEBEBRAND, Johannes. Polygenic obesity in humans. **Obesity facts**, v. 1, n. 1, p. 35-42, 2008. <https://doi.org/10.1159/000113935>.

IZQUIERDO, Andrea et al. Leptin, obesity, and leptin resistance: where are we 25 years later?. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2704, 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11112704>.

JAACKS, Lindsay et al. The obesity transition: stages of the global epidemic. **The lancet Diabetes & endocrinology**, v. 7, n. 3, p. 231-240, 2019. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30026-9](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30026-9).

KEHINDE, Tawakalitu et al. Syndromic obesity with neurodevelopmental delay: opportunities for targeted interventions. **European Journal of Medical Genetics**, p. 104443, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2022.104443>.

KUO, Lydia et al. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. **Nature medicine**, v. 13, n. 7, p. 803-811, 2007. <https://doi.org/10.1038/nm1611>.

LA VIGNERA, Sandro et al. The ketogenic diet corrects metabolic hypogonadism and preserves pancreatic β -cell function in overweight/obese men: A single-arm uncontrolled study. **Endocrine**, v. 72, p. 392-399, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12020-020-02518-8>.

LI, Yangyang et al. Monogenic obesity mutations lead to less weight loss after bariatric surgery: a 6-year follow-up study. **Obesity surgery**, v. 29, p. 1169-1173, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11695-018-03623-4>.

LINDBERG, Iris; FRICKER, Lloyd D. Obesity, POMC, and POMC-processing enzymes: surprising results from animal models. **Endocrinology**, v. 162, n. 12, p. bqab155, 2021. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqab155>.

LITTLETON, Sheridan; BERKOWITZ, Robert; GRANT, Struan. Genetic determinants of childhood obesity. **Molecular diagnosis & therapy**, v. 24, n. 6, p. 653-663, 2020. <https://doi.org/10.1007/s40291-020-00496-1>.

LOCKE, Adam E. et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. **Nature**, v. 518, n. 7538, p. 197-206, 2015. <https://doi.org/10.1038/nature14177>.

LU, Ke et al. DNA methylation of pck1 might contribute to the programming effects of early high-carbohydrate diets feeding to the glucose metabolism across two generations in zebrafish (*Danio rerio*). **Fish Physiology and Biochemistry**, p. 1-15, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10695-022-01149-2>.

MA, Qiang et al. High-carbohydrate diet promotes the adaptation to acute hypoxia in zebrafish. **Fish physiology and biochemistry**, v. 46, p. 665-679, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00742-2>.

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. <https://doi.org/10.1159/000456668>.

MAHMOUD, Ranim; KIMONIS, Virginia; BUTLER, Merlin G. Genetics of obesity in humans: A clinical review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11005, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms231911005>.

MANTZOROS, Christos et al. Leptin in human physiology and pathophysiology. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 4, p. E567-E584, 2011. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00315.2011>.

MARTINS, Ana et al. Leptin modulates human Sertoli cells acetate production and glycolytic profile: a novel mechanism of obesity-induced male infertility?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 9, p. 1824-1832, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.06.005>.

MAYORAL, Laura et al. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. **The Indian journal of medical research**, v. 151, n. 1, p. 11, 2020. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1768_17.

MEDENICA, Sanja et al. Female infertility in the era of obesity: The clash of two pandemics or inevitable consequence?. **Clinical Endocrinology**, v. 98, n. 2, p. 141-152, 2023. <https://doi.org/10.1111/cen.14785>.

MUSCOGIURI, Giovanna et al. Low-grade inflammation, CoVID-19, and obesity: clinical aspect and molecular insights in childhood and adulthood. **International Journal of Obesity**, v. 46, n. 7, p. 1254-1261, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41366-022-01111-5>.

NAVARRO-PANDO, José et al. Inhibition of the NLRP3 inflammasome prevents ovarian aging. **Science advances**, v. 7, n. 1, p. eabc7409, 2021. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc7409>.

OBRADOVIC, Milan et al. Leptin and obesity: role and clinical implication. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 585887, 2021. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.585887>.

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. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-10-21>.

OKAZAKI, Fumiyoshi et al. Microbiome Alteration in Type 2 Diabetes Mellitus Model of Zebrafish. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 867, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37242-x>.

OLIVEIRA, Bruno Affonso Parenti de. **Marcadores moleculares relacionados ao metabolismo energético e sua associação com oxidação de substratos e taxa metabólica de repouso em mulheres com obesidade grau III pré e pós cirurgia bariátrica**. 2022. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ORMAZABAL, Valeska et al. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. **Cardiovascular diabetology**, v. 17, p. 1-14, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0762-4>.

PELLEGRINI, Marianna et al. Changes in weight and nutritional habits in adults with obesity during the “lockdown” period caused by the COVID-19 virus emergency. **Nutrients**, v. 12, n. 7, p. 2016, 2020. <https://doi.org/10.3390/nu12072016>.

PIETROBELLI, Angelo et al. Putting the Barker theory into the future: time to act on preventing pediatric obesity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 11, p. 1151, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111151>.

POPRAC, Patrik et al. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 7, p. 592-607, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.005>

PRADO, Wagner et al. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. **Rev. Bras. de Med. do Esporte**, v. 15, n. 5, p. 378-383, 2019. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922009000600012>.

PRATT, Charlotte; VOET, Judith; VOET, Donald. **Fundamentos de bioquímica: A Vida em Nível Molecular**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

REICHETZEDER, Christoph. Overweight and obesity in pregnancy: Their impact on epigenetics. **European journal of clinical nutrition**, v. 75, n. 12, p. 1710-1722, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41430-021-00905-6>.

RODRIGUES, Adriane; SUPLICY, Henrique; RADOMINSKI, Rosana. Controle neuroendócrino do peso corporal: implicações na gênese da obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, p. 398-409, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302003000400012>.

RÖNN, Tina; LING, Charlotte. DNA methylation as a diagnostic and therapeutic target in the battle against Type 2 diabetes. **Epigenomics**, v. 7, n. 3, p. 451-460, 2015. <https://doi.org/10.2217/epi.15.7>.

RUSSO, Caterina et al. Inflammation and Obesity: The Pharmacological Role of Flavonoids in the Zebrafish Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2899, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24032899>.

SADAKIERSKA-CHUDY, Anna; FILIP, Małgorzata. A comprehensive view of the epigenetic landscape. Part II: Histone post-translational modification, nucleosome level, and chromatin regulation by ncRNAs. **Neurotoxicity research**, v. 27, p. 172-197, 2015. <https://doi.org/10.1007/s12640-014-9508-6>.

SAFAEI, Mahmood et al. A systematic literature review on obesity: Understanding the causes & consequences of obesity and reviewing various machine learning approaches used to predict obesity. **Computers in biology and medicine**, v. 136, p. 104754, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104754>.

SALUM, Kaio et al. When leptin is not there: a review of what nonsyndromic monogenic obesity cases tell us and the benefits of exogenous leptin. **Frontiers in endocrinology**, v. 12, p. 722441, 2021. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.722441>.

SCOTT YOSHIZAWA, Rebecca. The Barker hypothesis and obesity: Connections for transdisciplinarity and social justice. **Social Theory & Health**, v. 10, p. 348-367, 2022. <https://doi.org/10.1057/sth.2012.11>.

SEAL, Adam et al. COVID-19 pandemic and stay-at-home mandates promote weight gain in US adults. **Obesity**, v. 30, n. 1, p. 240-248, 2022. <https://doi.org/10.1002/oby.23293>.

SEIXAS FILHO, José et al. Atividade de amilase em quimo de três espécies tropicais de peixes teleósteos de água doce. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.28, p.907-913, 1999. <https://doi.org/10.1590/S1516-35981999000500001>.

SETH, Asha; STEMPEL, Derek; BARROSO, Inês. The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. **Disease models & mechanisms**, v. 6, n. 5, p. 1080-1088, 2013. <https://doi.org/10.1242/dmm.011346>.

SHARP, Gemma 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. <https://doi.org/10.1093/ije/dyv042>.

SILVEIRA, Cylmara Gargalak Aziz. **Avaliação de biomarcadores de inflamação e de permeabilidade intestinal em adolescentes obesos**. 2020. Tese de Doutorado. Universidade Nove de Julho.

SILVESTRIS, Erica et al. Obesity as disruptor of the female fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, p.1-13, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0336-z>.

SINGH, Siddharth et al. Obesity in IBD: epidemiology, pathogenesis, disease course and treatment outcomes. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 14, n. 2, p. 110-121, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.181>.

SPENCE, Rowena 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. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>.

SPEZANI, Renata et al. Impacto do jejum intermitente no hipotálamo de camundongos obesos induzidos por dieta. 2020. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

STEENBLOCK, Charlotte et al. Obesity and COVID-19: What are the Consequences?. **Hormone and Metabolic Research**, v. 54, n. 08, p. 496-502, 2022. <https://doi.org/10.1055/a-1878-9757>.

SUÁREZ, Rosario et al. Epigenetics in Obesity and Diabetes Mellitus: New Insights. **Nutrients**, v. 15, n. 4, p. 811, 2023. <https://doi.org/10.3390/nu15040811>.

SUSPITSIN, Evgeny; IMYANITOV, Evgeny. Bardet-biedl syndrome. **Molecular syndromology**, v. 7, n. 2, p. 62-71, 2016. <https://doi.org/10.1159/000445491>.

TAYLOR, Erin. The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity. **Clinical Science**, v. 135, n. 6, p. 731-752, 2021. <https://doi.org/10.1042/CS20200895>.

TRAYHURN, P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. **Physiol.Rev.**, v. 93, p. 1-21, 2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2012>.

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. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0101-5>.

VOHRA, Muhammad et al. AgRP/NPY and POMC neurons in the arcuate nucleus and their potential role in treatment of obesity. **European journal of pharmacology**, v. 915, p. 174611, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174611>.

WANG, Xiaotong et al. Exogenous leptin affects sperm parameters and impairs blood testis barrier integrity in adult male mice. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, p. 1-11, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0368-4>.

WATTS, Stephen; POWELL, Mickie; D'ABRAMO, Louis. Fundamental approaches to the study of zebrafish nutrition. **ILAR journal**, v. 53, n. 2, p. 144-160, 2012. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.144>.

WAUMAN, Joris; ZABEAU, Lennart; TAVERNIER, Jan. The leptin receptor complex: heavier than expected?. **Frontiers in endocrinology**, v. 8, p. 30, 2017. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00030>.

WAUTERS, Machteld; CONSIDINE, Robert; VAN GAAL, Luc. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. **European journal of endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 293-311, 2000. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1430293>.

WIGGENHAUSER, Lucas; KROLL, Jens. Vascular damage in obesity and diabetes: Highlighting links between endothelial dysfunction and metabolic disease in zebrafish and man. **Current vascular pharmacology**, v. 17, n. 5, p. 476-490, 2019. <https://doi.org/10.2174/1570161116666181031101413>.

WILLIAMS, David; NAWAZ, Asif; EVANS, Marc. Drug therapy in obesity: a review of current and emerging treatments. **Diabetes Therapy**, v. 11, p. 1199-1216, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13300-020-00816-y>.

WILLIAMS, Michael; WATTS, Stephen. Current basis and future directions of zebrafish nutrigenomics. **Genes & Nutrition**, v. 14, p. 1-10, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12263-019-0658-2>.

WILLIAMSON, R. T. On the treatment of glycosuria and diabetes mellitus with sodium salicylate. **British medical journal**, v. 1, n. 2100, p. 760, 1901. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.2100.760>.

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 Acesso em: 12 abr. 2023.

YUAN, Minsheng et al. Reversal of obesity-and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . **Science**, v. 293, n. 5535, p. 1673-1677, 2001. <https://doi.org/10.1126/science.1061620>.

YUAN, Xiao-Chen et al. The feedback regulation of carbohydrates intake on food intake and appetite in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 1395-1403, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00914-5>.

ZANG, Liqing; MADDISON, Lisette; CHEN, Wenbiao. Zebrafish as a model for obesity and diabetes. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 6, p. 91, 2018. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00091>.

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. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01432-w>.

ZATTERALE, Federica et al. Chronic adipose tissue inflammation linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Frontiers in physiology**, p. 1607, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01607>.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

**"INDUCTION OF OBESITY BY A HIGH-CARBOHYDRATE DIET
IN ZEBRAFISH MODULATES GENES RELATED TO FEEDING
BEHAVIOR AND INFLAMMATION"**

Journal of Nutritional Biochemistry

Impact Factor: 5.6

Versão em processo de submissão

"INDUCTION OF OBESITY BY A HIGH-CARBOHYDRATE DIET IN ZEBRAFISH MODULATES GENES RELATED TO FEEDING BEHAVIOR AND INFLAMMATION"

"The Effects of a High-Carbohydrate Diet in Zebrafish"

Bárbara do Carmo Rodrigues Virote¹, Kiara Cândido Duarte da Silva¹, Renato Elias Moreira Júnior², Lorrânny Pereira de Assis Valadares³, Stefânia Priscilla de Souza¹, Igo Gomes Guimarães³, Ana Lúcia Brunialti-Godard², André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna⁴, Mônica Rodrigues Ferreira Machado³, Luis David Solis Murgas^{1*}

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

2 Department of Genetics, Ecology, and Evolution, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

3 Department of Animal Bioscience, Federal University of Jataí, Jataí, Brazil.

4 Department of Biosciences, Federal University of Paraná, Palotina, Paraná, Brazil.

*Corresponding Author: Dr. Luis David Solis Murgas, Central Animal Facility – Fish Section, Department of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras (UFLA, Brazilian acronym), Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil. (phone: +55 (35) 3829-1728, e-mail: lsmurgas@ufla.br).

ABSTRACT

The increasing prevalence of obesity in diverse populations worldwide has consistently been correlated with dietary patterns characterized by high carbohydrate intake. In this context, the present study aimed to investigate the effects of a high-carbohydrate diet on the induction of obesity in adult zebrafish. Animals of both sexes were used and, over a twelve-week period, divided into two groups based on the provided diet. The Control group was fed a balanced diet with appropriate proportions of carbohydrates, lipids, and proteins for the species, while the High-Carbohydrate Diet (HCD) group received a diet with a high carbohydrate content. To assess the impact of the diet on the animals, weekly body weight analysis was conducted. At the end of the experiment, behavioral evaluation, histology of visceral and subcutaneous adipose tissue, and biochemical and enzymatic analyses were performed. Additionally, the transcriptional regulation of genes associated with feeding behavior (*leptin*, *orexin*, and *galanin*) and inflammation (*il-4*, *il-10*, *il-6* and *tnf- α*) was evaluated. With this dietary protocol, a significant increase in body weight was observed in the HCD group from the fifth week onward. At the end of the dietary protocol, a condition obesity like was induced in the HCD group, accompanied by hypertrophy of visceral and subcutaneous adipocytes and elevated plasma glucose and triglyceride levels. Moreover, the animals exhibited anxiety-like behavior, and alterations in the transcriptional regulation of genes associated with feeding behavior and inflammatory profiles were identified. The results of this study establish a zebrafish model for a condition resembling obesity induced by high-carbohydrate diet consumption. Distinct characteristics were observed in females and males, rendering it a potential model to provide valuable insights into the physiological mechanisms underlying the disease in both sexes and to aid in the search for new therapeutic interventions.

Keywords: Obesity. *Danio rerio*. Oxidative Stress. Anxiety

INTRODUCTION

Obesity is considered a global health problem, exhibiting characteristics of a pandemic disease (Luniewski et al., 2023). According to the World Health Organization (WHO), it is estimated that more than 1.9 billion adults are overweight or obese (Who, 2017; Blüher, 2019). Although it has a multifactorial cause and several classifications, obesity is commonly the result of a positive energy balance, particularly when it involves the consumption of foods rich in carbohydrates and saturated fats (Reis et al., 2023). Several studies have demonstrated that different neuroendocrine pathways are modulated in individuals with obesity, and inflammation and oxidative stress play a key role, especially when related to cognitive or mental disorders such as anxiety and depression (Firth et al., 2019, Martins et al., 2019).

For a refined understanding of how these diseases are interconnected, and particularly to elucidate the effect of each isolated macronutrient, the use of animal models is essential. In this context, Oka and collaborators (2010) demonstrated the applicability of zebrafish to the study of obesity. Based on this, several research groups have developed various protocols using this animal model to replicate the signs and symptoms, as well as the physiological effects of obesity (Zang et al., 2019; Tian et al., 2021; Russo et al., 2023). This is done in order to investigate the pathways modulated by the disease and contribute to the development of new drugs and therapeutic interventions.

Among the different protocols for inducing obesity in zebrafish, diet-induced obesity (DIO) stands out, which involves the administration of high-fat diets (HFDs) (Heckler; Kroll, 2017). Additionally, there are hyperglycemic/diabetic models that include specific techniques to induce acute or chronic hyperglycemia, as well as approaches employing genetically modified models (Wiggenhauser and Kroll, 2019; Abookasis et al., 2020).

Although many studies use commercial diets in obesity-inducing protocols, the possibility for a partially unknown composition and the uncertain origin of their bioactive ingredients may lead to controversial findings in studies using zebrafish as a model for this condition (Watts et al., 2012; Williams; Watts, 2019). Thus, the use of diets specifically formulated for obesity induction protocols in zebrafish may contribute to increasing the reproducibility and reliability of the results in this study area. In this context, there is a need to develop new protocols to induce obesity in zebrafish, especially through the formulation of new diets with well-defined nutritional components.

Most studies in animal models aimed at elucidating the potential mechanisms of obesity employ high-fat diets (Speakman, 2019; Wali et al., 2020). However, high-carbohydrate diets, which are also significant components of foods contributing to obesity, have been less explored in the literature, especially in assessing the different responses in both sexes (Gearhardt; Hebebrand, 2021; Türkoğlu et al., 2021). Therefore, the present study aims to induce obesity with a diet rich in carbohydrates in zebrafish and to evaluate the behavioral, morphometric, biochemical, enzymatic, and molecular parameters, as well as to elucidate possible differences between males and females.

METHODOLOGY

Animals

A total of 120 zebrafish of the AB strain (*Danio rerio*) at 5 months of age, of both sexes, were obtained from the Laboratory of Biotechnology and Physiology of Fish (LABFISH) of the Federal University of Jataí (UFJ, Brazilian acronym) - Brazil. The fish were kept in a rack with a controlled water circulation system ($\pm 28^{\circ}\text{C}$; PH 7; photoperiod 14L:10D), and these parameters were checked daily. Each aquarium had its own filtration system located at the back, based on filter media associated with an acrylic blanket, allowing filtration by a closed water system for each experimental group. Twice a week, the following water parameters were checked: hardness, dissolved oxygen, ammonia, nitrite, and nitrate. The experimental procedures of this study were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of UFJ under number 001/2023 and are in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, Brazilian acronym).

Diets

In the present study, two semi-purified diets were used, the Control diet, which was developed according to the study by Kaushik et al. (2011). This diet resembles a commercial feed for teleost fish in terms of composition, with similar proportions of lipids, proteins, and carbohydrates. The high-carbohydrate diet (HCD diet) was designed based on the control diet, but with an increased carbohydrate level. This elevation was achieved by the addition of cornstarch, accompanied by a reduction in the amounts of soybean oil, fish oil, and canola oil. The compositions of the diets were analyzed according to the methodology recommended by AOAC (2005), for crude protein

(Method 968.05), ether extract (Method 960.39) and ashes (Method 942.05). Table 1 presents the ingredients and proximate composition of the diets.

Table 1: Ingredients in (g/kg) and compositions (wet weight) of the control diet and HCD for zebrafish (*Danio rerio*)

Ingredient	Diet (g/kg)	
	Control	HCD
Soy protein	50	50
Casein	370	370
Fish meal	20	20
Albumin	240	240
Dextrin	20	20
Filling	15.80	15.80
Hagar	1	1
Sucrose	1	1
Fish oil	50	25
Canola oil	20	10
Corn starch	38	112
Cellulose	10	10
Soybean oil	73	34
Dicalcium phosphate	50.40	50.40
Monosodium phosphate	25	25
Premix Dk3	15	15
BHT	0.75	0.75
<i>Centesimal composition</i>		
Gross energy (kcal/g)	5.321	4.778
Crude protein (%)	60.09	60.19
Ether extract (%)	9.51	4.44
Ash (%)	11.10	11.27

Experimental design and obesity induction protocol

In the experimental design, 2 groups were established, each consisting of 30 males and 30 females. The first group was submitted to a control diet, while the second, called the HCD group, had a high-carbohydrate diet to induce obesity. This feeding protocol was conducted for twelve weeks. During this period, the fish were fed to apparent satiety with the diets described above, receiving four meals a day at 8 a.m., 10 a.m., 2 p.m., and 4 p.m. The average consumption of each animal was recorded daily throughout the experiment. In addition, all the fish also received a daily complementary feed of *Artemia nauplii* per fish per day at 12 noon.

During the once-weekly feeding protocol, 15 adult animals of each sex, from both experimental groups, were randomly selected to be weighed individually. Each animal was weighed in beaker with 80 ml of water, previously filtered before inserting each animal. At the end of the feeding protocol, the behavioral test of the new tank was

performed, followed by submersion into ice water bath (0–4°C) until complete immobilization to the euthanasia following the Guidelines for use of Zebrafish in the NIH Intramural Research Program (Animal Research Advisory Committee Guidelines, 2009). Immediately after euthanasia, some whole animals were fixed for further histological processing, and others were reserved for both evaluation of antioxidant enzyme activity and biochemical analyses. During this process, blood was also collected to assess blood glucose and the brain was dissected to assess the transcriptional regulation of target genes on eating behavior and inflammation.

Histological analysis of subcutaneous and visceral adipose tissue

Immediately after euthanasia, the animals were stored in a 4% formaldehyde solution with 0.1M phosphate buffer, pH 7.2, for 24 h. Subsequently, they were maintained for 12 days in an ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution (0.35M, pH 7.8), in a volume 10 times greater than that of the sample, for decalcification, and the solution was changed every 4 days (Patel et al., 2021). The decalcified fish were cleaved, dehydrated, bleached, and finally included in paraffin blocks. Ten longitudinal serial sections with a thickness of 4 µm were obtained and stained with hematoxylin and eosin for further morphometric analysis.

The digital images were obtained by means of an image capture and analysis system, consisting of an Olympus CX31 trilocular microscope (Olympus Optical do Brasil Ltda) and a camera (SC30Color CMOS Camera for Light Microscopy, Olympus OpticalLtd. Brazil, São Paulo, SP). All morphometric analyses were performed using the ImageJ® software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). To evaluate the morphometry of the adipose tissue of the visceral and subcutaneous compartments, the mean diameter of the adipocytes was obtained through the arithmetic mean between the largest and smallest diameter of each adipocyte (Image-Pro Plus®version 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) (Virote et al., 2020).

Analysis of biochemical parameters (Glucose, Triglyceride and Total Cholesterol)

For glucose analysis, animals from the experimental groups were randomly selected in a 12-hour fasting period. Body glucose (mg/dL) was measured from blood collected through caudal vein puncture, using an Accu-Check Active® glucometer, as described by Castro et al. (2018).

To determine the concentrations of triglycerides and total cholesterol, the body of the animals was first macerated and suspended in isopropyl alcohol. The supernatant was isolated for analysis using enzymatic kits (BioTécnica and Bioclin, Brazil), following the manufacturers' recommendations. These analyses were performed on an automatic biochemistry analyzer Rx Daytona (Randox®, Antrim, United Kingdom) (Martins et al., 2023).

Antioxidant enzyme analysis

To prepare the samples, the entire body of the animals was macerated with a Turrax-type® electrical homogenizer in phosphate buffer saline (PBS), in a ratio of 1:5 (w/v). After maceration and homogenization, the samples were centrifuged at 4°C at 5500 rpm for 30 minutes. The resulting supernatant was collected and stored at -80°C. To determine the protein concentrations, the Bradford method was used, performing spectrophotometric analyses at 595 nm, and using bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976).

The evaluation of superoxide dismutase (SOD) activity was determined based on the autooxidation of pyrogallol using the methods of Madesh and Balasubramanian (1997). The samples were diluted in 50 mM phosphate buffer solution (pH 7.2) and 6 µL of MTT (3-(4,5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and 15 µL of 1.25 mM pyrogallol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Absorbance was read in triplicate using a microplate reader at 570 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, USA). Total SOD activity was expressed in units per milligram of protein, where one unit of SOD activity is defined as the amount of enzyme required to produce 50% superoxide radical dismutation per minute.

Catalase activity (CAT) was measured according to Aebi (1984). Enzyme activity was determined by the H₂O₂ consumption, seen as a decreasing absorbance at 240 nm for 60s. The samples were analyzed in triplicate in a microplate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, USA). Specific CAT activity was reported as units per milligram of protein (one unit is defined as 1 pmol of H₂O₂ consumed per minute).

For lipid peroxidation (LPO), the malondialdehyde concentration was analyzed by the QuantiChrom™ TBARS Assay Kit (DTBA-100) (BioAssay Systems, Hayward, USA) according to the manufacturer's protocol. Absorbance was measured at 535 nm

(Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, USA). Each sample was processed in triplicate.

Molecular analyses

Total RNA isolation and reverse transcription

The animals' brains were dissected on ice and stored at -80°C. Total RNA was extracted using ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System (Promega, Brazil), according to the manufacturer's recommendations. After extraction, the resulting material was diluted in 20µL of ultrapure water, the total RNA was quantified with the DeNovix DS-11 equipment (DeNovix, USA). The samples were stored at -80°C until the complementary DNA (cDNA) synthesis step. For each sample, 500 ng of total RNA was used to make cDNA with oligo (dT₂₀) primers (Prodimol Biotechnology, Brazil), dNTP mix (10 mM), Reaction Buffer 5X (Thermo Fisher Scientific, Brazil), Ribolock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Brazil), and Revertaid transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Brazil), according to the manufacturer's recommendations.

Primer design and real-time PCR (qPCR)

The selection of primers and the conduction of qPCR were carried out in accordance with the methods established by Martins de Carvalho et al. (2018). The sequences (5'→3') of the target genes used and the size of the amplicons are available in Table 2. Transcription expression levels of the target genes were measured using the CFX 96™ Real-Time System Thermal Cycler (BioRad, USA). qPCR reactions for each gene were performed using 10µL KAPA SYBR FAST Universal qPCR Kit (QuantiFast SYBR® Green RT-PCR Kit), 1µL of cDNA (10ng/µL), 0.4µL of primer solution (10pM), and 8.2µL of ultrapure water (Thermo Fisher Scientific, Brazil). In all reactions, a cDNA-template negative control (NTC) was used, and the final reaction volume was maintained at 20µL. PCR amplification was performed without the extension step (95°C for 3 min, followed by 40 cycles of 95°C for 3 seconds and 60°C for 20 sec). Fluorescence levels were measured during the last step of each cycle (60°C). qPCR data were analyzed by the Ct delta-delta method using the reference gene *eef1a1a* and *rpl13a*, for normalization. The relative amount of mRNA of the target genes was calculated as described by Vandesompele et al. (2002).

Table 2: Sequence of primers used in adult zebrafish induced to obesity.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Amplicon pb	Reference
<i>ef1a111</i>	CTACTCTTCTTGATGCCCTTGAT	TGTCTCCAGCCACATTACCAC	309	(PAIVA et al, 2020)
<i>rpl13a</i>	TCTGGAGGACTGTAAGAGGT	AGACGCACAATCTTGAGAGCAG	148	(PAIVA et al, 2020)
<i>leptin</i>	AGCTCTCCGCTCAACCTGTA	CAGCGGGAATCTCTGGATAA	194	(MONDAL et al., 2021)
<i>orexin</i>	CTACGAGATGCTGTGCCGAG	CCAAGAGTGAGAATCCCGAC	102	(YOKOBORI et al., 2011)
<i>galanin</i>	CAGAAACACTCGGGATGGTGA	CTTCTCGCCCCCTTGAC	138	(ESKOVA et al., 2020)
<i>IL-4</i>	TCTCTGCCAAGCAGGAATG	CAGTTTCCAGTCCCGGTATATG	102	(KIRSTEN et al., 2021)
<i>IL-10</i>	CTCTGCTCAGCTTCTTCTT	GCTCCCTCAGTCTTAAAGGAAA	105	(KIRSTEN et al., 2021)
<i>IL-6</i>	GCGTCTGACGTGTATAAAG	GTCGTTTGGTGCTGTGTTTG	96	(KIRSTEN et al., 2021)
<i>tnf-α</i>	GACCACAGCACTTCTACCG	ACATTTTCCTCACTTCGTTTAC	89	(KIRSTEN et al., 2021)

Behavioral analysis - New tank test

After 12 weeks of the dietary protocol, to evaluate the manifestations associated with anxiety and stress behavior, 10 females and 10 males, randomly selected from each group, were subjected to the new tank test (Siebel; Bonan; Silva, 2015). The animals were placed in a new tank measuring 11.5 cm x 34.5 cm x 15.5 cm with a capacity for 3 L of water and were filmed. The images were captured by semi-professional cameras, with precise adjustment of distance and focus for each aquarium, thus eliminating any possibility of external interference during the recording. Subsequently, using the EthoVision XT® (Noldus) software version 14, the swimming activity of the fish was quantified for 360 seconds, disregarding the first 120 seconds of recording (Siebel; Bonan; Silva, 2015). The behavioral parameters analyzed included activity status (average speed), locomotor activity (distance traveled), anxiety-like behavior (staying at the depth of the aquarium), and mobility status (immobile time) (Lunkes et al., 2021).

Statistical analysis

The data are presented as mean $\pm$ SEM and were initially submitted to the Shapiro-Wilk normality test and, if their assumptions were met, they were submitted to the one-way ANOVA test with Tukey HSD post-test. A p-value was considered significant when < 0.05 and represented by an asterisk (*). All analyses were performed using Minitab v.18 (State College, PA, USA) statistical software, and graphs were generated using GraphPad Prism 8.0.1 (Graph Pad Software Inc., United States).

RESULTS

Consumption of a HCD resulted in obesity-like conditions in zebrafish

Throughout the 12 weeks of the dietary protocol, the animals in the HCD group exhibited a significantly higher caloric intake ($p<0.05$) compared to the animals in the control group, culminating in a caloric intake 8.36% ($p<0.05$) higher at the end of the week 12 (Figure 1A). Consequently, starting from the fifth week in females and the sixth week in males, the animals in the HCD group began to demonstrate a more pronounced weight gain ($p<0.05$) compared to their respective controls (Figure 1B). At the end of the dietary protocol, there was an increase in body weight of 36.43% in females and 37.91% in males in the HCD group compared to their controls. This weight gain was accompanied by adipocyte hypertrophy observed in animals of both sexes in the HCD group, with an increase of 77.54% in the size of subcutaneous adipocytes and 71.68% in visceral adipocytes in females, and 213.38% and 38.47%, respectively, in males (Figure 1C). Similarly, biochemical parameters showed a similar trend, with an increase in serum levels of blood glucose, triglycerides, and total cholesterol in females in the HCD group, and an increase in glucose and triglycerides in males in the HCD group, when compared to their respective controls (Figure 1D).

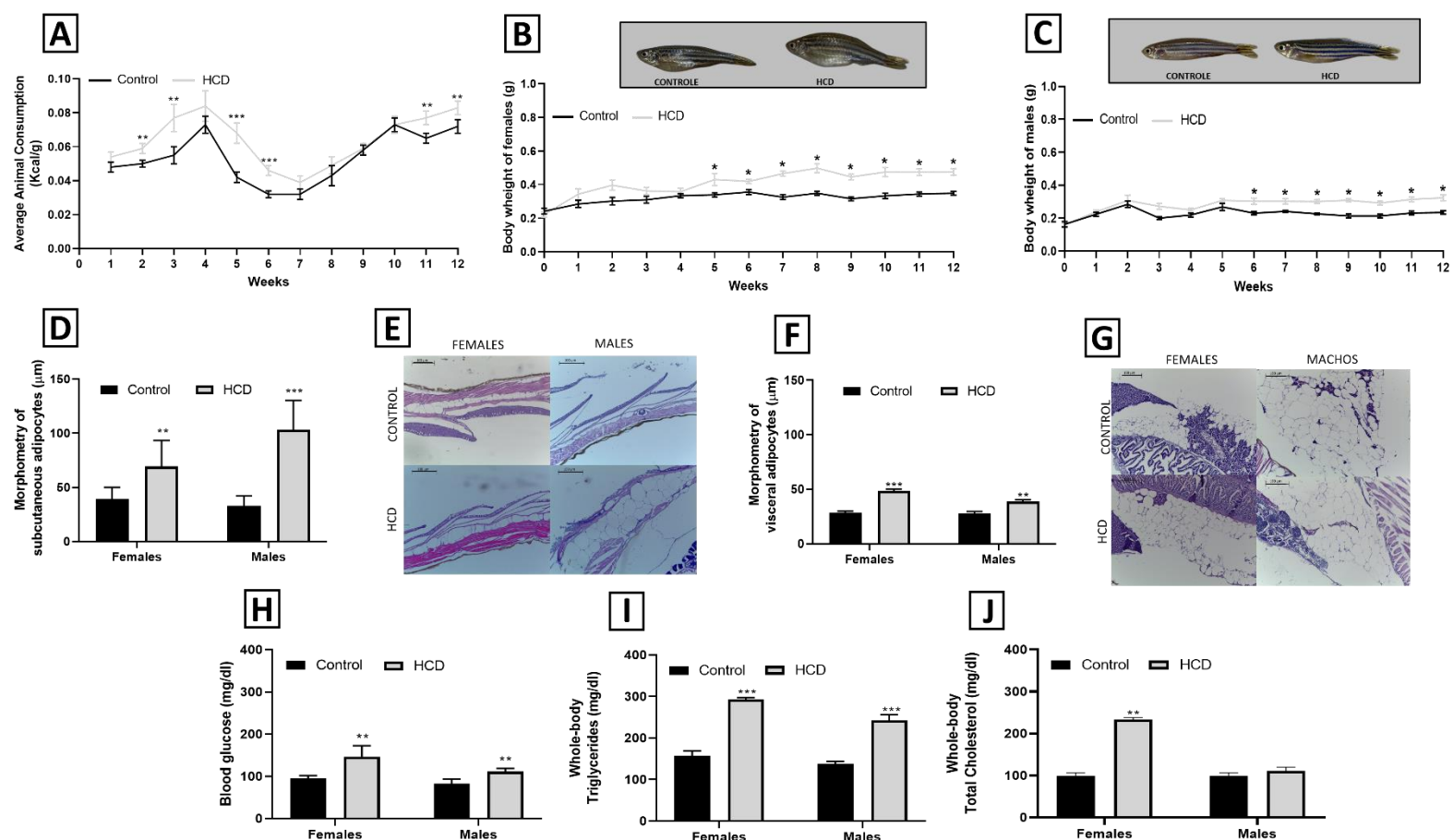


Figure 1: Main morphological and biochemical changes of the animals. (A) Mean calorie intake of the animals over the course of the feeding protocol. (B) Body weight evolution in female (n=15) and (C) male (n=15) zebrafish during the twelve weeks of the feeding protocol. (D) Mean diameter of subcutaneous and visceral adipocytes of zebrafish females (n=10) and (F) males (n=10). Photomicrograph of subcutaneous and visceral adipocytes of (E) females and (G) males. (H) Evaluation of glucose, (I) triglycerides, and (J) total cholesterol in zebrafish (n=6) and males (n=6). Data is represented by mean±SEM. Analysis performed by ANOVA followed by Tukey post-test. (*) indicate significant differences between the groups (P<0.05).

Consumption of a HCD led to increased enzymatic activity in zebrafish

Females and males in the HCD group showed a significant increase in the activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT when compared to the respective controls (P<0.05) (Figures 2A and 2B). However, when the activity of the Tbars enzyme was analyzed, no significant differences were observed between the groups in females (P>0.05). In males, the activity of the Tbars enzyme was increased (P<0.05) compared to the control group (Figure 2C).

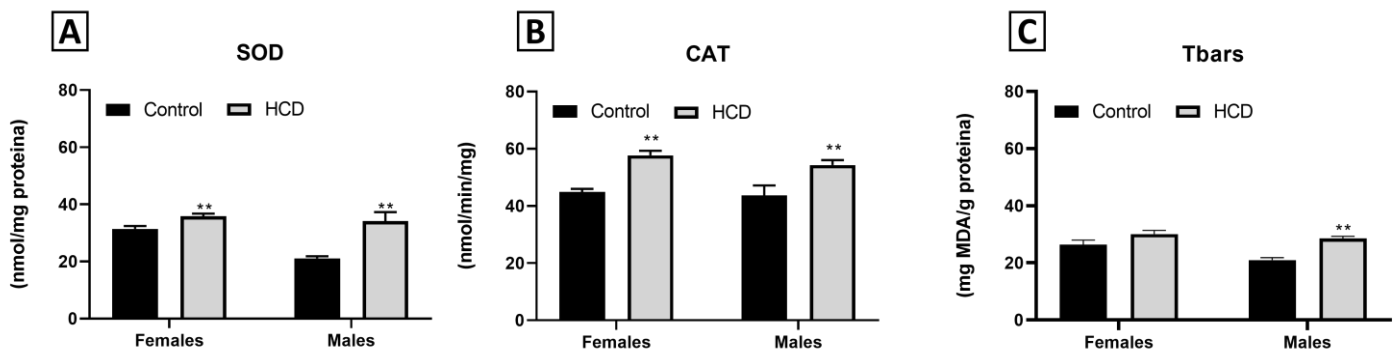


Figure 2: Activity of antioxidant enzymes in females and males. (A) SOD, (B) CAT, and (C) Tbars (n=6). Data is represented by mean±SEM. Analysis performed by ANOVA followed by Tukey post-test. (*) indicate significant differences between the groups (P<0.05).

HCD consumption altered the transcriptional regulation of genes associated with eating behavior and inflammation

Regarding the genes associated with feeding behavior, it was observed that the transcription of the leptin, orexin and galanin was significantly increased in the brain of females in the HCD group when compared to females in the Control group ($P < 0.0001$). Similar results were observed in males in the HCD group, with increased transcription of leptin and orexin receptors in the HCD group, however, unlike in females, there was no increase in galanin transcription in males (Figures 3A - 3C).

Concerning the genes related to inflammation, it was observed that the consumption of HCD caused, in the brain, a decrease in the transcription of the anti-inflammatory gene *il-4* ($P < 0.0001$) in both sexes and a decrease in the transcription of the anti-inflammatory gene *il-10* only in females ($P < 0.0001$). The evaluation of the expression of the pro-inflammatory genes *il-6* and *tnf-α* we observed that both females and males fed with HCD showed increased transcription of these cytokines ($P < 0.0001$) (Figures 3D – 3G).

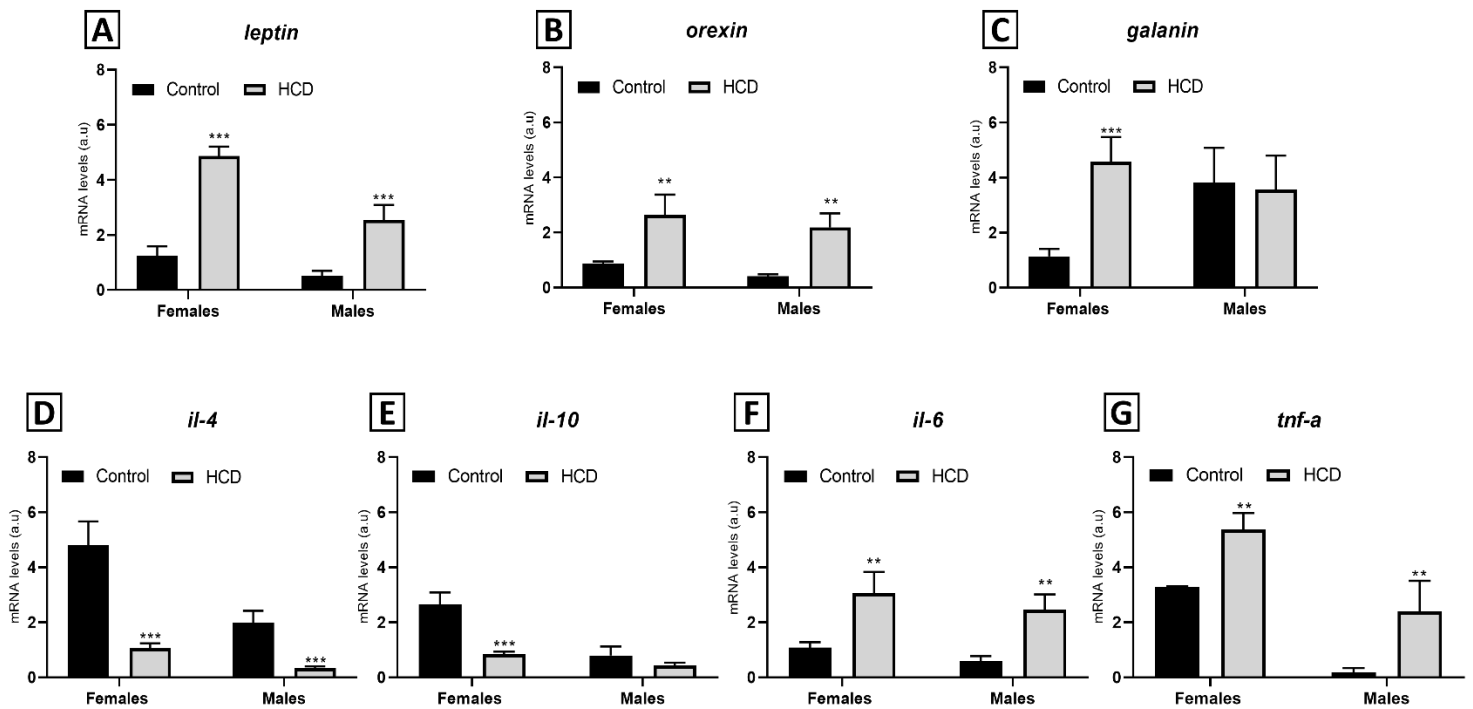


Figure 3: Relative quantification of brain mRNA of genes involved in eating behavior and inflammation . Relative levels of mRNA (a.u) by: (A) leptin, (B) orexin, (C) galanin (D) il-4, (E) il-10, (F) il-6, (G) tnfr-a in the brain of the control and HCD groups (n=10). Data are presented as mean±SEM (*) are significantly different between groups (P < 0.05; ANOVA, Tukey's post-test).

HCD consumption led to differential behavioral changes between the sexes in zebrafish

Through the analysis of the activity status and locomotion of the animals, it was observed that only the females in the HCD group showed a significant decrease (P < 0.05) in the total distance traveled and in the mean speed in relation to the control group (Figures 4A and 4B). Regarding the anxious like behavior, characterized by the predominance of the specimen at the bottom of the aquarium and time of immobility, a significant increase was observed in the HCD group compared to the Control group (P < 0.05), both in females and males (Figures 4C and 4E).

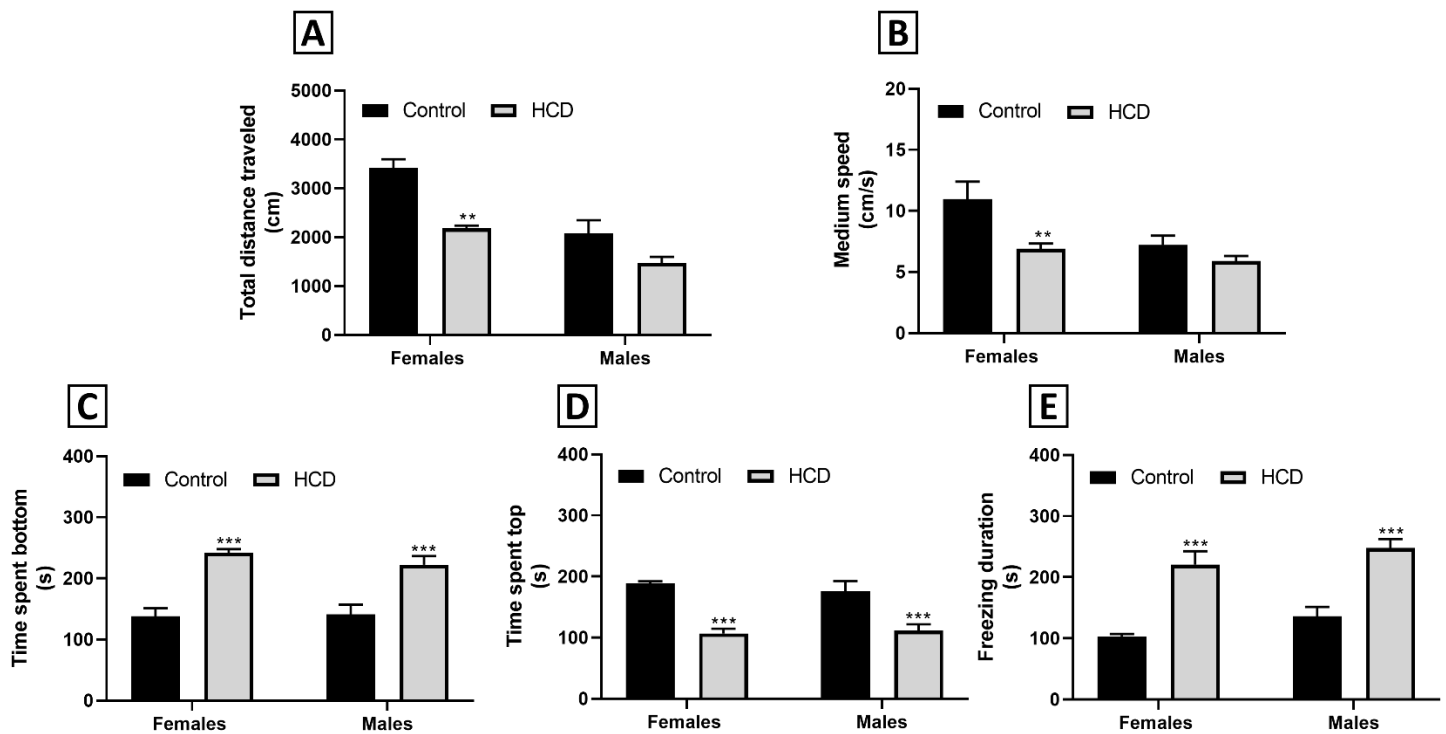


Figure 4: Behavioral analysis of the animals. (A) Activity status (total distance travelled in cm); (B) Locomotor activity (mean speed in cm/s); (C) Anxious-type behavior (percentage of permanence at depth in s) and (D) State of mobility (percentage of immobile time) (n=10). Data are presented as mean±SEM. (*) are significantly different between the groups in the indicated week ($P < 0.05$; ANOVA, Tukey's post-test).

DISCUSSION

In this study, we developed a novel protocol for inducing obesity in zebrafish by administering a high-carbohydrate diet. We observed that the consumption of HCD led to an increase in body weight, hypertrophy of subcutaneous and visceral adipocytes, elevated levels of glucose and triglyceride, and increase activity of antioxidant enzymes. In addition, we noted changes in the transcription regulation of genes related to food consumption and the inflammatory profile in the brain. The animals also exhibited behaviors indicative of anxiety, complementing the phenotypic profile observed in obesity.

With the westernization of dietary patterns, there has been an increase in the consumption of foods rich in carbohydrates and fats (Berticat; Durand; Raymond, 2020). Particularly, the excessive intake of highly refined carbohydrates is linked to the development of metabolic disorders such as obesity, insulin resistance, and diabetes in mammals (Kim et al., 2022). Specifically for fish, studies have indicated that high-carbohydrate diets often cause metabolic disorders such as hyperglycemia, increased lipid

accumulation, and decreased antioxidant system in fish (Kostyniuk et al., 2019; Luo et al., 2020; Zhao et al., 2022; Xi et al., 2023).

The significant increase in body weight of animals of both sexes, which fed on HCD, suggests that the hypertrophy of subcutaneous and visceral adipocytes may be a response to the variation in the macronutrient composition of diets (Ludwig; Ebbeling, 2018; Antunes et al., 2020). In this model, we also observed higher feed intake by the animals of the HCD group of the 8.36% of calories, this behavior may be related to the increase in the transcription of the leptin gene, an adipokine whose secretion plays a pleiotropic role in the regulation of food intake, body mass and lipolysis (Farr; Gavrieli; Mantzoros, 2015, Pérez-Pérez et al., 2020; Peng et al., 2021). In addition, there was hyperregulation of genes related to the transcription of the orexigenic peptides orexin and galanin, which influence eating behavior, increasing the consumption of foods, especially those rich in carbohydrates, indicating a possible significant role in the development of obesity (Tempel et al., 1988; Novak et al., 2005; Gallagher et al., 2023).

Consistent with models of dyslipidemia, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular diseases, commonly linked to obesity (Amor; Perea, 2019), the animals in the HCD group showed hypertrophy of visceral adipocytes, along with elevated glucose and triglycerides. The increase in plasma triglycerides and glucose, along with the accumulation of visceral fat, can lead to the secretion of low-density lipoprotein and reduce insulin sensitivity, culminating in insulin resistance (Borén et al., 2015; Pantoja-Torres et al., 2019; Guerrero-Romero et al., 2010; Nor et al., 2015).

Males in the HCD group also exhibited increased levels of the pro-oxidant marker Tbars and in the activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT, indicating the onset of oxidative stress (Da Silva et al., 2022). Increased production of reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) is related to adipocyte hypertrophy, causing mitochondrial DNA damage, leading to lipotoxicity. Resulting in elevated production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , with an even greater increase in tissue ROS/RNS levels (Marseglia et al., 2014). This chronic effect results in the saturation of antioxidant enzymes, subsequently reducing their activity, a phenomenon commonly observed in obesity (Nijhawan et al., 2019; Lasker et al., 2019; Pérez-Torres et al., 2021).

For behavior analysis, the new tank test is widely used to assess anxiety and depression in zebrafish (Fontana; Alnassar; Parker, 2022; Godino-Gimeno et al., 2023). During this test, the fish are exposed to a new environment, initially swimming to the bottom, and later progressively exploring the upper zone of the tank (Singh et al., 2022).

Anxious behavior in this context is characterized by prolonged time at the bottom of the aquarium (Blaser et al., 2012; Zhang et al., 2018). When such behavior is accompanied by a reduction in swimming activity and increased immobility, it suggests an association with depressive conditions, as immobility reflects a lack of interest in exploration, typical in zebrafish (Pittman; Piato, 2016; Fonseca et al., 2016; Demin et al., 2020). In this study, females subjected to the HCD diet displayed a reduction in swimming activity and an increase in immobility, accompanied with extended time at the bottom of the aquarium, suggesting the development of an anxiogenic condition associated with depressive aspects (Wong et al., 2010; De Abreu et al., 2018). In contrast, males exposed to the same diet exhibited only signs of anxiety, characterized by an altered in the predominance at the bottom of the aquarium and increased immobility time, corroborating previous studies (Wong et al., 2010; Kalueff et al., 2014; Chahardehi et al., 2023).

Evidence in mammals, notably humans, indicates that females with obesity are more likely to report depressive symptoms compared to males (Boukouvalas et al., 2008; Maeng; Milad, 2015; Clark et al., 2022; Demir et al., 2022). However, it is crucial to underscore the paucity of gender differentiation in research examining the effects of obesity on behavior, especially when zebrafish are used as a model. The results indicate the possible influence of sexual dimorphism in understanding the behavioral impacts resulting from obesity induction, emphasizing the relevance of sex hormones, such as testosterone and estrogen, in the interaction with brain components sensitive to nutritional interventions (Vasconcelos et al., 2016; Clark et al., 2022).

Females in the HCD group also showed decreased transcription of the *il-4* and *il-10* genes, related to anti-inflammatory cytokines, while HCD males showed this reduction only in the transcription of the *il-4* gene. Both sexes, however, exhibited increased expression of the pro-inflammatory cytokines *il-6* and *tnf- α* genes in the brain. These findings align with previous studies that highlight the link between dysregulation of inflammatory responses in the central nervous system (CNS) and obesity, as well as associated neuropsychiatric comorbidities, including depressive and anxiety behaviors (Almeida-Suhett et al., 2017; Baker et al., 2017; Fourrier et al., 2019). This association between obesity and anxiety has been documented not only in humans (Tang et al., 2017), but also in rats and mice (Li et al., 2022), as well as in adult zebrafish (Azbazdar et al., 2023).

Research on obesity induced by high-fat diets has been extensive; however, understanding of the progression of metabolic and inflammatory dysfunction resulting

from ingestion of high-carbohydrate diets in zebrafish remains limited. (Oliveira et al., 2013; Gomes et al., 2020; Picolo et al., 2021; Türkoğlu et al., 2021). This is particularly true in terms of behavioral modulations and gender differences manipulating the nutritional content of different diets emerges as an essential tool for investigating the physiology and molecular alterations associated with macronutrients, a field of research still in its early stages in the zebrafish model. The findings of this study, which explore responses to carbohydrate-rich food intake, provide a solid foundation for future investigations, contributing to filling existing gaps in the scientific literature that necessitate further exploration.

FUNDING

This work was funded by the Minas Gerais Vivarium Network – Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG), under the Public Notice RED 00009-14 and APQ-01213-21; National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) under No. 308359/2019-4, and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), under No. 88881.117641/2016-01.

CONFLICT OF INTEREST

We have no financial interest or other potential conflict to declare.

REFERENCES

- ABOOKASIS, David et al. Evaluation the effect of acute hyperglycemia on cerebral tissue properties with diffuse optical imaging systems. In: **Neurophotonics**. SPIE, p. 73-78, 2020. <https://doi.org/10.1117/12.2551867>.
- AEBI, Hugo. Catalase in vitro. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1984. p. 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- ALMEIDA-SUHETT, Camila P., et al. Behavioral changes in male mice fed a high-fat diet are associated with IL-1 β expression in specific brain regions. *Physiology & behavior*, 2017, vol. 169, p. 130-140. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.11.016>.

AMOR, Antonio J.; PEREA, Verónica. Dyslipidemia in nonalcoholic fatty liver disease. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 26, n. 2, p. 103-108, 2019. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000464>.

ANTUNES, M. M. et al. A high-carbohydrate diet induces greater inflammation than a high-fat diet in mouse skeletal muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 53, 2020. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20199039>.

AOAC, Horwitz W. International A: Official Methods of Analysis of the AOAC International. **The Association: Arlington County, VA, USA**, 2000.

AZBAZDAR, Yagmur et al. High-fat diet feeding triggers a regenerative response in the adult zebrafish brain. **Molecular Neurobiology**, v. 60, n. 5, p. 2486-2506, 2023. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03210-4>.

BAKER, Kathryn D., et al. The impact of obesity and hypercaloric diet consumption on anxiety and emotional behavior across the lifespan. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2017, vol. 83, p. 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.10.014>.

BERTICAT, Claire; DURAND, Valérie; RAYMOND, Michel. Refined carbohydrate consumption and facial attractiveness. **Evolutionary Psychology**, v. 18, n. 4, p. 1474704920960440, 2020. <https://doi.org/10.1177/1474704920960440>.

BLASER, Rachel E.; ROSEMBERG, Denis B. Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): dissociation of black/white preference and novel tank test. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36931, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036931>.

BLÜHER, Matthias. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288-298, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>.

BORÉN, Jan et al. Kinetic and related determinants of plasma triglyceride concentration in abdominal obesity: multicenter tracer kinetic study. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 35, n. 10, p. 2218-2224, 2015. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305614>.

BOUKOUVALAS, G. et al. Post weaning high fat feeding affects rats' behavior and hypothalamic pituitary adrenal axis at the onset of puberty in a sexually dimorphic manner. **Neuroscience**, v. 153, n. 2, p. 373-382, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.023>.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

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. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.06.011>.

CHAHARDEHI, Amir Modarresi et al. Zebrafish, a biological model for pharmaceutical research for the management of anxiety. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 4, p. 3863-3872, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08263-1>.

CLARK, Thomas D. et al. Nutrition, anxiety and hormones. Why sex differences matter in the link between obesity and behavior. **Physiology & Behavior**, v. 247, p. 113713, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2022.113713>.

DA SILVA, Thais Pereira et al. Antioxidant, anti-inflammatory and beneficial metabolic effects of botryosphaeran [(1→3)(1→6)-β-d-glucan] are responsible for its anti-tumour activity in experimental non-obese and obese rats bearing Walker-256 tumours. **Cell Biochemistry and Function**, v. 40, n. 2, p. 213-227, 2022. <https://doi.org/10.1002/cbf.3690>.

DE ABREU, Murilo S. et al. Zebrafish models: do we have valid paradigms for depression?. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 94, p. 16-22, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2018.07.002>.

DEMIR, Enver Ahmet et al. Behavioral and cognitive consequences of obesity in parents and offspring in female and male rats: Implications of neuroinflammation and neuromodulation. **Molecular Neurobiology**, v. 59, n. 6, p. 3947-3968, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02831-5>.

DEMIN, Konstantin A. et al. The zebrafish tail immobilization (ZTI) test as a new tool to assess stress-related behavior and a potential screen for drugs affecting despair-like states. **Journal of neuroscience methods**, v. 337, p. 108637, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108637>.

ESKOVA, Anastasia et al. Galanin signaling in the brain regulates color pattern formation in zebrafish. **Current Biology**, v. 30, n. 2, p. 298-303. e3, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.033>.

FARR, Olivia M.; GAVRIELI, Anna; MANTZOROS, Christos S. Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity? **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 22, n. 5, p. 353, 2015. <https://doi.org/10.1097/MED.000000000000184>.

FIRTH, Joseph et al. What is the role of dietary inflammation in severe mental illness? A review of observational and experimental findings. **Frontiers in psychiatry**, v. 10, p. 350, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00350>.

FONSEKA, Trehani M. et al. Zebrafish models of major depressive disorders. **Journal of neuroscience research**, v. 94, n. 1, p. 3-14, 2016. <https://doi.org/10.1002/jnr.23639>.

FONTANA, Barbara D.; ALNASSAR, Nancy; PARKER, Matthew O. The zebrafish (*Danio rerio*) anxiety test battery: comparison of behavioral responses in the novel tank diving and light–dark tasks following exposure to anxiogenic and anxiolytic compounds. **Psychopharmacology**, p. 1-10, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05990-w>.

FOURRIER, Célia et al. Brain tumor necrosis factor- α mediates anxiety-like behavior in a mouse model of severe obesity. **Brain, behavior, and immunity**, v. 77, p. 25-36, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.11.316>.

GALLAGHER, Daniel M.; O'HARTE, Finbarr PM; IRWIN, Nigel. An update on galanin and spexin and their potential for the treatment of type 2 diabetes and related metabolic disorders. **Peptides**, p. 171096, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.171096>.

GEARHARDT, Ashley N.; HEBEBRAND, Johannes. The concept of “food addiction” helps inform the understanding of overeating and obesity: YES. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 113, n. 2, p. 263-267, 2021. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa343>.

GOMES, Julia AS et al. High-refined carbohydrate diet consumption induces neuroinflammation and anxiety-like behavior in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 77, p. 108317, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108317>.

GODINO-GIMENO, Alejandra et al. Obesity Impairs Cognitive Function with No Effects on Anxiety-like Behaviour in Zebrafish. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, p. 12316, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms241512316>.

GUERRERO-ROMERO, Fernando et al. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 7, p. 3347-3351, 2010. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0288>.

HECKLER, Karl; KROLL, Jens. Zebrafish as a model for the study of microvascular complications of diabetes and their mechanisms. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 9, p. 2002, 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18092002>.

KALUEFF, Allan V.; ECHEVARRIA, David J.; STEWART, Adam Michael. Gaining translational momentum: more zebrafish models for neuroscience research. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 55, p. 1-6, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.01.022>.

KAUSHIK, Sadasivam; GEORGA, Ioanna; KOUMOUNDOUROS, Giorgos. Growth and body composition of zebrafish (*Danio rerio*) larvae fed a compound feed from first feeding onward: toward implications on nutrient requirements. **Zebrafish**, v. 8, n. 2, p. 87-95, 2011. <https://doi.org/10.1089/zeb.2011.0696>.

KIM, Hye Rim et al. Anti-obesity effects of multi-strain probiotics in mice with high-carbohydrate diet-induced obesity and the underlying molecular mechanisms. **Nutrients**, v. 14, n. 23, p. 5173, 2022. <https://doi.org/10.3390/nu14235173>.

KIRSTEN, Karina et al. Acute and chronic stress differently alter the expression of cytokine and neuronal markers genes in zebrafish brain. **Stress**, v. 24, n. 1, p. 107-112, 2021. <https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1724947>.

KOSTYNIUK, Daniel J. et al. Profiling the rainbow trout hepatic miRNAome under diet-induced hyperglycemia. **Physiological Genomics**, v. 51, n. 9, p. 411-431, 2019. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00032.2019>.

LASKER, Shoumen et al. High-fat diet-induced metabolic syndrome and oxidative stress in obese rats are ameliorated by yogurt supplementation. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56538-0>.

LI, Yong et al. High fat diet-induced obesity leads to depressive and anxiety-like behaviors in mice via AMPK/mTOR-mediated autophagy. **Experimental Neurology**, v. 348, p. 113949, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113949>.

LUDWIG, David S.; EBBELING, Cara B. The carbohydrate-insulin model of obesity: beyond “calories in, calories out”. **JAMA internal medicine**, v. 178, n. 8, p. 1098-1103, 2018. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2018.2933>.

LUNIEWSKI, Michał; MATYJASZEK-MATUSZEK, Beata; LENART-LIPIŃSKA, Monika. Diagnosis and non-invasive treatment of obesity in adults with type 2 diabetes mellitus: A review of guidelines. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 13, p. 4431, 2023. <https://doi.org/10.3390/jcm12134431>.

LUNKES, L. C. et al. Melatonin administration attenuates acute stress by inducing sleep state in zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 246, n. April, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109044>.

LUO, Yuan et al. Gemfibrozil improves lipid metabolism in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed a high-carbohydrate diet through peroxisome proliferator activated receptor- α activation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 296, p. 113537, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113537>.

MADESH, M.; BALASUBRAMANIAN, K. A. A microtiter plate assay for superoxide using MTT reduction method. **Indian journal of biochemistry and biophysics**, v. 34, p. 535-539, 1997.

MAENG, Lisa Y.; MILAD, Mohammed R. Sex differences in anxiety disorders: interactions between fear, stress, and gonadal hormones. **Hormones and behavior**, v. 76, p. 106-117, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.04.002>.

MARSEGLIA, Lucia et al. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 1, p. 378-400, 2014. <https://doi.org/10.3390/ijms16010378>.

MARTINS, Laís Bhering et al. Pathways linking obesity to neuropsychiatric disorders. **Nutrition**, v. 66, p. 16-21, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.03.017>.

MARTINS DE CARVALHO, Luana et al. High-fat diet withdrawal modifies alcohol preference and transcription of dopaminergic and GABAergic receptors. **Journal of Neurogenetics**, v. 33, n. 1, p. 10-20, 2019. <https://doi.org/10.1080/01677063.2018.1526934>.

MARTINS, Moises Silvestre de Azevedo et al. The Zebrafish (*Danio rerio*) as a Model for Studying Voluntary Physical Exercise and its Effects on Behavior and Metabolism. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 66, 2023. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2023220279>.

MONDAL, Gopinath et al. The Daily Pattern of Expression of Leptin and Ghrelin O-Acyl Transferase Under Various Lighting Schedules in the Whole Brain of Zebrafish (*Danio rerio*). **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 9, p. 676332, 2021. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.676332>.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH et al. Guidelines for use of zebrafish in the NIH intramural research program. 2009.

NIJHAWAN, Priya; ARORA, Sandeep; BEHL, Tapan. Intricate role of oxidative stress in the progression of obesity. **Obesity Medicine**, v. 15, p. 100125, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2019.100125>.

NOR, NS Mohd; LEE, S.; ARSLANIAN, S. A. Triglyceride Glucose (TyG) Index As a surrogate measure of insulin sensitivity in obese adolescents. **Nucl Pept Regul Glucose Metab Endocr Soc**, 2015. <https://doi.org/10.1111/pedi.12303>.

NOVAK, Colleen M. et al. Caloric restriction and physical activity in zebrafish (*Danio rerio*). **Neuroscience letters**, v. 383, n. 1-2, p. 99-104, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.03.048>.

OKA, Takehiko et al. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. **BMC physiology**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2010. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-10-21>.

OLIVEIRA, Marina C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity**, v. 21, n. 9, p. E396-E406, 2013. <https://doi.org/10.1002/oby.20230>.

PAIVA, Isadora Marques et al. Inhibition of Lrrk2 reduces ethanol preference in a model of acute exposure in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 100, p. 109885, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109885>.

PANTOJA-TORRES, Betzi et al. High triglycerides to HDL-cholesterol ratio is associated with insulin resistance in normal-weight healthy adults. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 1, p. 382-388, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.10.006>.

PATEL, Utsav N. et al. Assessment of neurotoxicity following single and co-exposure of cadmium and mercury in adult zebrafish: behavior alterations, oxidative stress, gene expression, and histological impairment in brain. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 232, n. 8, p. 340, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05274-1>.

PENG, Jin; YIN, Lijun; WANG, Xiaohui. Central and peripheral leptin resistance in obesity and improvements of exercise. **Hormones and behavior**, v. 133, p. 105006, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2021.105006>.

PÉREZ-PÉREZ, Antonio et al. Role of leptin in inflammation and vice versa. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 16, p. 5887, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21165887>.

PÉREZ-TORRES, Israel et al. Oxidative stress, plant natural antioxidants, and obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1786, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22041786>.

PICOLO, Victor L. et al. Short-term high-fat diet induces cognitive decline, aggression, and anxiety-like behavior in adult zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 110, p. 110288, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110288>.

PITTMAN, Julian; PIATO, Angelo. Developing zebrafish depression-related models. **The rights and wrongs of zebrafish: Behavioral phenotyping of zebrafish**, p. 33-43, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33774-6_2.

REIS, Clarisse Giovana Maciel et al. Short-term cafeteria diet is associated with fat mass accumulation, systemic and amygdala inflammation, and anxiety-like behavior in adult male wistar rats. **Neuroscience**, v. 515, p. 37-52, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.02.001>.

RUSSO, Caterina et al. Inflammation and Obesity: The Pharmacological Role of Flavonoids in the Zebrafish Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2899, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24032899>.

SIEBEL, A. M.; BONAN, C. D.; SILVA, R. S. Zebrafish como modelo para estudos comportamentais. **Resende RR, organizador. Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações. São Paulo: Blucher**, p. 15-56, 2015.

SINGH, Romil et al. Association of obesity with COVID-19 severity and mortality: An updated systemic review, meta-analysis, and meta-regression. **Frontiers in endocrinology**, v. 13, p. 780872, 2022. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.780872>.

SPEAKMAN, John R. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. **International journal of obesity**, v. 43, n. 8, p. 1491-1492, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0363-7>.

TANG, Fang; WANG, Gangpu; LIAN, Ying. Association between anxiety and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis of epidemiological

studies. *Psychoneuroendocrinology*, 2017, vol. 77, p. 112-121. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.11.025>.

TEMPEL, Donna L.; LEIBOWITZ, Kimara J.; LEIBOWITZ, Sarah F. Effects of PVN galanin on macronutrient selection. **Peptides**, v. 9, n. 2, p. 309-314, 1988. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(88\)90265-3](https://doi.org/10.1016/0196-9781(88)90265-3).

TIAN, Sinuo et al. New insights into bisphenols induced obesity in zebrafish (*Danio rerio*): Activation of cannabinoid receptor CB1. **Journal of hazardous materials**, v. 418, p. 126100, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126100>.

TÜRKOĞLU, Medine et al. The potential effect mechanism of high-fat and high-carbohydrate diet-induced obesity on anxiety and offspring of zebrafish. **Eating and Weight Disorders-Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity**, p. 1-15, 2021. <https://doi.org/10.1007/s40519-021-01140-5>.

VANDESOMPELE, Jo et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. 1-12, 2002. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.

VASCONCELOS, Andrea Rodrigues et al. O papel dos hormônios esteróides na modulação da neuroinflamação por intervenções dietéticas. **Fronteiras em endocrinologia**. v. 7, p. 9, 2016. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00009>.

VIGITEL Brasil 2021: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde; 2021. <https://www.gov.br/saude/pt-br/vigitel-brasil-2021>.

VIROTE, Bárbara do Carmo Rodrigues et al. Obesity induction in adult zebrafish leads to negative reproduction and offspring effects. **Reproduction**, v. 160, n. 6, p. 833-842, 2020. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0119>.

WALI, Jibrán A. et al. Cardio-metabolic effects of high-fat diets and their underlying mechanisms—A narrative review. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1505, 2020. <https://doi.org/10.3390/nu12051505>.

WATTS, Stephen A.; POWELL, Mickie; D'ABRAMO, Louis R. Fundamental approaches to the study of zebrafish nutrition. **ILAR journal**, v. 53, n. 2, p. 144-160, 2012. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.144>.

WHO (2017) Overweight and obesity. Glob. Heal. Obs. data Repos. https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/.

WIGGENHAUSER, Lucas M.; KROLL, Jens. Vascular damage in obesity and diabetes: Highlighting links between endothelial dysfunction and metabolic disease in zebrafish and man. **Current vascular pharmacology**, v. 17, n. 5, p. 476-490, 2019. <https://doi.org/10.2174/1570161116666181031101413>.

WILLIAMS, Michael B.; WATTS, Stephen A. Current basis and future directions of zebrafish nutrigenomics. **Genes & Nutrition**, v. 14, p. 1-10, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12263-019-0658-2>.

WONG, Keith et al. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural brain research**, v. 208, n. 2, p. 450-457, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.023>.

XI, Longwei et al. Study on Carbohydrate Metabolism in Adult Zebrafish (*Danio rerio*). **Aquaculture Nutrition**, v. 2023, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/1397508>.

YOKOBORI, Eri et al. Stimulatory effect of intracerebroventricular administration of orexin A on food intake in the zebrafish, *Danio rerio*. **Peptides**, v. 32, n. 7, p. 1357-1362, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.05.010>.

ZANG, Liqing et al. RNA-seq based transcriptome analysis of the anti-obesity effect of green tea extract using zebrafish obesity models. **Molecules**, v. 24, n. 18, p. 3256, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24183256>.

ZHANG, Shuhui et al. Reversal of reserpine-induced depression and cognitive disorder in zebrafish by sertraline and Traditional Chinese Medicine (TCM). **Behavioral and Brain Functions**, v. 14, p. 1-14, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12993-018-0145-8>.

ZHAO, Liulan et al. High-carbohydrate diet altered conversion of metabolites, and deteriorated health in juvenile largemouth bass. *Aquaculture*, v. 549, p. 737816, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737816>.

ARTIGO 2

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INGESTÃO DA DIETA COM
ALTO TEOR DE CARBOIDRATOS EM FÊMEAS E MACHOS DE
ZEBRAFISH AO LONGO DE DUAS GERAÇÕES**

Journal of Nutritional Biochemistry

Impact Factor: 5.6

Versão em processo de submissão

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INGESTÃO DA DIETA COM ALTO TEOR DE CARBOIDRATOS EM FÊMEAS E MACHOS DE ZEBRAFISH AO LONGO DE DUAS GERAÇÕES

Bárbara do Carmo Rodrigues Virote¹, Kiara Cândido Duarte da Silva¹, Renato Elias Moreira Júnior², Maria Clara Silva Conceição³, Lorrânny Pereira de Assis Valadares³ Didier Quevedo Cagnini³, Stefânia Priscilla de Souza¹, Ana Lúcia Brunialti-Godard², André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna⁴, Mônica Rodrigues Ferreira Machado³, Luis David Solis Murgas^{1*}

1 Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brasil.

2, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

3 Departamento de Biociência Animal, Universidade Federal de Jataí, Jataí, Brasil.

4 Departamento de Biociências, Universidade Federal do Paraná, Palotina, Paraná, Brasil.

*Autor correspondente: Dr. Luis David Solis Murgas, Biotério Central – Ala de Peixes, Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil. (número +55 (35) 3829-1728, e-mail: lsmurgas@ufla.br).

RESUMO

Pesquisas recentes apontam a transgeracionalidade da obesidade como um fator contribuinte que intensifica o risco desta condição patológica. Neste contexto, o presente estudo, investigou os efeitos transgeracionais da obesidade, induzida por uma dieta hipercarboidrática, em zebrafish (*Danio rerio*) por duas gerações. Para tanto, foram utilizados animais de ambos os sexos, ao quais durante doze semanas foram divididos em dois grupos parentais (P): o grupo Controle (C), alimentado com uma dieta equilibrada para a espécie, e o outro grupo recebeu uma Dieta Rica em Carboidrato, denominado HCD. Na 12ª semana do protocolo alimentar, os animais dos grupos parentais, geração P, foram submetidos ao manejo de reprodução. Neste, com o intuito de investigar isoladamente influências maternas e paternas, foi realizado cruzamentos específicos de sexo entre os grupos parentais, gerando assim quatro grupo experimentais na geração F1: F1C; F1HCD; F1P (paterna) e F1M (materna) Ao atingiram a maturidade sexual, cada um dos grupos foi subdividido em dois subgrupos: um que recebeu a dieta Controle, enquanto o outro foi submetido ao consumo HCD, resultando em oito grupos na geração F1 adulta que foram submetidos ao mesmo protocolo alimentar que a geração P. Após 12 semanas do protocolo, os grupos também foram submetidos ao manejo reprodutivo, culminando na produção da geração F2 que não foi submetida aos cruzamentos intergrupais. Para avaliar o impacto da dieta nos animais adultos ao final de cada protocolo alimentar, das gerações P e F1, foram realizadas análises do peso corporal, morfometria dos adipócitos subcutâneo e visceral, análises bioquímicas e enzimáticas. Adicionalmente, foi avaliada a regulação transcricional de genes associados a neuroinflamação (*il4*, *il10*, *il6* e *tnf-α*) e ao controle epigenético (*dnmt1* e *dnmt3*). Nos animais das F1 e F2 foram realizadas análises da atividade de enzimas antioxidantes e perfil inflamatório através das análises da capacidade de regeneração de cauda e recrutamento de neutrófilos. Como resultado, observou-se que o consumo HCD na geração P alterou todos os parâmetros analisados induzindo uma condição semelhante a obesidade em ambos os sexos, porém nos machos não houve modificações na transcrição dos genes relacionados à epigenética. Machos e fêmeas da geração F1, descendentes de pais obesos e submetidas ao consumo HCD, também apresentam alteração na regulação genes relacionados a neuroinflamação e epigenética. O consumo da HCD não afetou a capacidade reprodutiva dos diferentes grupos analisados nas gerações P e F1. Entretanto, foram identificadas alterações nos perfis inflamatórios e na atividade das enzimas antioxidantes na prole dos machos e fêmeas que consumiram HCD ao longo das gerações. Esses achados fornecem dados inéditos para uma melhor compreensão dos efeitos transgeracionais da obesidade induzida por dietas ricas em carboidratos em zebrafish.

Keywords: Obesidade. *Danio rerio*. Aspectos Transgeracionais. Epigenética.

INTRODUÇÃO

A obesidade, considerada um desafio significativo para a saúde pública mundial, é reconhecida como uma condição multifatorial (Busebee et al., 2023). Em sua patogênese, diversas características, tais como inflamação crônica, estresse oxidativo, resistência à insulina, predisposição genética, influências ambientais e desequilíbrios nutricionais, desempenham papéis de relevância substancial (Gasmi et al., 2021).

Nesse contexto, pesquisas recentes revelaram que a exposição pré-concepcional dos progenitores a uma alimentação desbalanceada emerge como um fator contribuinte que amplifica o risco de obesidade, bem como de distúrbios metabólicos na prole (Stephenson et al., 2018; Billah et al., 2022). Esse fenômeno está alinhado com os princípios do campo de estudo das "Origens do Desenvolvimento da Saúde e da Doença" (DOHaD) que sugerem a ocorrência de modificações permanentes na fisiologia, metabolismo e epigenoma da descendência induzidas por exposições, tais como supernutrição e desnutrição, vivenciadas pelos progenitores antes da concepção, durante a gestação ou em estágios iniciais da vida da prole como fatores chave na evolução para manutenção de condições patológicas de forma transgeracional (Pietrobelli et al., 2016; Xavier et al., 2019).

Considerando os mecanismos moleculares subjacentes à etiologia da obesidade, os processos epigenéticos desempenham um papel crucial, em especial, a metilação diferencial do DNA (DNAm) que têm sido extensivamente investigados em genes associados ao desenvolvimento e manutenção da obesidade (De La Rocha et al., 2022; Keller et al., 2023). Uma das primeiras associações entre DNAm e obesidade foi identifica com o aumento dessa modificação nas gerações subsequentes de proles cujas mães foram expostas a uma dieta rica em gordura (Dunford and Sangster, 2017). Sendo relevante salientar que não se limita à exposição materna, pois há evidências que a exposição paterna a fatores obesogênicos também desencadeia a transmissão transgeracional de fenótipos específicos. Como por exemplo, aumento das taxas de glicose, complicações cardiovasculares e resistência à insulina na prole (Potabattula et al., 2019; Rotondo et al., 2021). Isso demonstra que o dimorfismo sexual pode influenciar na suscetibilidade a problemas de saúde metabólicos na idade adulta da prole (Santos-Marcos et al., 2023; Pontifex; Vauzour; Muller, 2023). No entanto, muitos estudos,

especialmente em modelos animais, frequentemente se concentram na análise em um único sexo até recentemente (Sandovici et al., 2022 Beery; Zucker, 2011).

Por outro lado, modulações epigenéticas têm sido descritas como dependentes e/ou reguladas por macronutrientes específicos (Bondia-Pons; Ryan; Martinez, 2012; Patel et al., 2022). Tem sido relatado que diversos componentes dietéticos podem influenciar a regulação da transcrição gênica de um indivíduo, enquanto seu genoma modula de maneira significativa sua resposta metabólica à ingestão de diferentes tipos de dieta (Mierziak et al., 2021; Wu et al., 2022). Como no caso dos carboidratos que representam um macronutriente essencial nas composições dietéticas, desempenhando um papel preponderante no aporte energético e, conseqüentemente, contribuindo para o acúmulo excessivo de calorias e ganho de peso quando ingeridos (Mahmud et al., 2022). Considerando a escassez de estudos que exploram a relação entre a ingestão de carboidratos e as alterações epigenéticas, particularmente aquelas que podem modular o risco de obesidade, torna-se imprescindível a realização de pesquisas utilizando modelos animais que permitam investigar os mecanismos moleculares subjacentes e as vias metabólicas afetadas de forma rápida e simplificada.

Dentro desse cenário, o zebrafish emerge como um modelo pré-clínico de notável relevância para o estudo da obesidade sob distintas modulações nutricionais, visto que apresenta órgãos fundamentais para a regulação da homeostase energética, análogos aos mamíferos (Zang et al., 2018; Virote et al., 2019; Li et al., 2023). Adicionalmente, o zebrafish caracteriza-se por seu rápido desenvolvimento, atingindo a maturidade sexual em aproximadamente 3 meses, com manutenção simples e custo-benefício favorável (Singleman; Holtzman, 2014). Essa característica facilita a análise de múltiplas gerações em um intervalo de tempo reduzido, atribuído à sua facilidade de criação e reprodução, fertilização externa e a capacidade de gerar um elevado número de embriões a partir de uma única fêmea (Tsang et al., 2017).

Com base nas informações apresentadas, este estudo objetivou investigar, por meio do modelo animal zebrafish, os efeitos do consumo de uma dieta rica em carboidratos ao longo de duas gerações, avaliando as influências maternas e paternas de maneira isolada. A pesquisa focou em modulações morfológicas, tais como ganho de peso e hipertrofia do tecido adiposo, bem como análises bioquímicas, avaliação da atividade de enzimas antioxidantes, e investigação da regulação transcricional de genes relacionados à neuroinflamação e processos epigenéticos.

METODOLOGIA

Animais

No presente estudo, foram utilizados zebrafish da linhagem AB, de ambos os sexos, provenientes do Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Peixes (LABFISH) da Universidade Federal de Jataí (UFJ – Brasil). Os peixes foram alojados em um rack equipado com um sistema de circulação de água controlado ($\pm 28^{\circ}\text{C}$; pH 7; fotoperíodo 14L:10E), sendo esses parâmetros avaliados diariamente. Cada aquário foi dotado de um sistema de filtragem individualizado, localizado em sua parte posterior, composto por mídias filtrantes associadas a uma manta acrílica, permitindo a filtragem por meio de um sistema fechado de água para cada grupo experimental. Todos os procedimentos experimentais conduzidos neste estudo foram submetidos à aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFJ, sob o número 001/2023, e estão em conformidade com as diretrizes de cuidados e uso de animais de laboratório estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Dietas

Neste estudo, foram utilizadas duas dietas semipurificadas. A dieta Controle, cuja formulação foi definida conforme o estudo de Kaushik et al. (2011) de forma a assemelhar-se à ração comercial destinada a peixes teleósteos, apresentando proporções comparáveis de lipídios, proteínas e carboidratos. A dieta rica em carboidratos (HCD), por sua vez, foi derivada da dieta Controle, mas com a introdução de níveis aumentados de carboidratos. O acréscimo de carboidratos foi alcançado pela inclusão de amido de milho, concomitante à redução nas quantidades de óleo de soja, óleo de peixe e óleo de canola (Tabela 1).

Tabela 1: Ingredientes (g kg⁻¹) e composição (peso úmido) das dietas Controle e HCD para o zebrafish

INGREDIENTES	Dieta (g kg ⁻¹)	
	Controle	HCD
Proteína de soja	50	50
Caseína	370	370
Farinha de peixe	20	20
Albumina	240	240
Dextrina	20	20
Enchimento	15,80	15,80
Agar	1	1
Sucrose	1	1
Óleo de Peixe	50	25
Óleo de Canola	20	10
Amido de milho	38	112
Celulose	10	10
Óleo de Soja	73	34
Fosfato dicálcio	50,40	50,40
Fosfato monossódico	25	25

Premix Dk3	15	15
BHT	0,75	0,75
Composição centesimal		
Energia bruta (Kcal/g)	5,321	4,778
Proteína bruta (%)	60,09	60,19
Extrato etérico (%)	9,51	4,44
Cinzas (%)	11,10	11,27

Protocolo de Indução a Obesidade e Desenho Experimental

Para induzir obesidade na geração parental (P) dois grupos com 60 zebrafish adultos foram formados, cada um composto por 30 machos e 30 fêmeas. Ao longo de 12 semanas, o primeiro grupo foi submetido a dieta controle, enquanto o segundo grupo foi alimentado com a dieta HCD para promover a obesidade. Durante esse período, os peixes foram alimentados até a saciedade aparente com as respectivas dietas, recebendo quatro refeições diárias nos horários de 8h, 10h, 14h e 16h. Além disso, todos os peixes foram suplementados diariamente com 1500 nauplios de *Artêmia*, administrados às 12h.

Durante o período experimental de fornecimento de protocolos alimentares, uma vez por semana eram selecionados aleatoriamente 15 animais de cada sexo, dos diferentes grupos experimentais, para serem pesados individualmente. Cada animal foi pesado em béquer com 80 ml de água, previamente tarado antes da inserção do animal. Na 12ª semana, os animais dos grupos parentais, ou seja, machos e fêmeas dos grupos Controle e HCD, foram submetidos ao manejo de reprodução conforme descrito por Virote et al., (2020), produzindo assim a geração F1 de cada grupo experimental. Para investigar os efeitos da dieta e discernir as influências maternas e paternas na transgeracionalidade, cruzamentos específicos de sexo entre os grupos parentais foram realizados, resultando na formação de quatro grupos na geração F1, conforme listado na Tabela 2.

Tabela 2: Grupos experimentais da geração F1 na fase embrionária e larval

Grupo Experimental	DESCRIÇÃO DOS CRUZAMENTOS	
	♀	♂
F1C	Controle	Controle
F1HCD	HCD	HCD
F1P	Controle	HCD
F1M	HCD	Controle

Após as reproduções, foi calculada a desova total de cada família e a sobrevivência dos embriões e larvas. Posteriormente uma seleção aleatória de embriões em cada grupo experimental da F1 com idade de 120 horas pós-fertilização foi realizada para as análises de estresse oxidativo, perfil inflamatório e capacidade regenerativa, cujas

metodologias estão descritas posteriormente. As demais larvas pertencentes aos grupos experimentais da F1 foram mantidas em densidade populacional uniforme, sem intervenção dietética, sendo alimentadas exclusivamente com organismos vivos, como *Artêmia* e rotíferos, em quatro alimentações diárias.

O protocolo alimentar na geração F1 foi iniciado quando os animais atingiram 3 meses pós-fertilização. Neste estágio, 30 animais de cada grupo experimental foram selecionados aleatoriamente para a primeira mensuração do peso corporal. Neste ponto do estudo, com o intuito de investigar a influência da dieta em cada grupo experimental da geração F1, cada um dos quatro grupos foi subdividido em dois subgrupos. Um subgrupo recebeu a dieta Controle, enquanto o outro recebeu a dieta HCD. Cada subgrupo era composto por 30 machos e 30 fêmeas. Esse delineamento resultou na criação de oito grupos na geração F1 adulta para a implementação do protocolo alimentar conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Grupos experimentais da geração F1 na fase adulta

Grupo Experimental	DESCRIÇÃO	
	<i>Grupo Experimental</i>	<i>Protocolo Alimentar</i>
F1C/C	F1C	Controle
F1C/HCD	F1C	HCD
F1 HCD/C	F1HCD	Controle
F1 HCD/ HCD	F1HCD	HCD
F1P/C	F1P	Controle
F1P/ HCD	F1P	HCD
F1M/C	F1M	Controle
F1M/ HCD	F1M	HCD

O protocolo alimentar descrito empregado na geração P foi replicado na geração F1 adulta. Ao final do protocolo alimentar, machos e fêmeas dos oito grupos delineados foram submetidos ao manejo reprodutivo, culminando na produção da geração F2 para cada grupo experimental. Nessa fase, machos e fêmeas foram selecionados exclusivamente dentro do mesmo grupo experimental, sem cruzamentos intergrupais. Logo após as reproduções, os embriões de cada grupo da F2, foram submetidos as mesmas análises da geração F1. Assim, foram constituídos os oito grupos experimentais distintos da geração F2, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Grupos experimentais da geração F2 na fase embrionária e larval

Grupo Experimental	DESCRIÇÃO DOS CRUZAMENTOS	
	♀	♂
F2C/C	F1C/C	F1C/C
F2C/HCD	F1C/ HCD	F1C/HCD
F2HCD/C	F1 HCD /C	F1 HCD/C
F2HCD/HCD	F1 HCD / HCD	F1 HCD/HCD
F2P/C	F1P/C	F1P/C
F2P/HCD	F1P/ HCD	F1P/HCD
F2M/C	F1M/C	F1M/C
F2M/HCD	F1M/ HCD	F1M/HCD

Análises realizadas na fase adulta das gerações Parental e F1

No final do protocolo alimentar, de todos os grupos experimentais das gerações P e F1, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com triclaína (imersão de 250mg / L-1 por solução aquosa). Na eutanásia, foram coletados sangue para a análise de glicose, o corpo inteiro dos animais foi fixado para histologia, para avaliação da atividade de enzimas antioxidante (SOD, CAT e Tbars) e análises bioquímicas (triglicerídeos e colesterol total). Foi coletado também sangue para análise de glicose e o cérebro para avaliação da regulação transcricional de genes alvo sobre a neuroinflamação e epigenética. Cujas metodologias serão descritas mais adiante.

Histologia do tecido adiposo subcutâneo e visceral

Imediatamente após a eutanásia, os animais foram armazenados em solução de formaldeído 4%, com tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, por 24h. Posteriormente, mantidos por 12 dias em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (0,35M, Ph 7,8) para descalcificação, sendo a solução trocada a cada 4 dias. O volume da solução de EDTA foi 10 vezes o volume da amostra (PATEL et al., 2021). Os peixes descalcificados foram clivados, desidratados, clareados e por fim, incluídos em blocos de parafina. Dez seções seriadas de 4µm de espessura de cortes longitudinais foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina, para posterior análise morfométrica.

As imagens digitais foram obtidas por meio de um sistema de captura e análise de imagens, constituído por microscópio trilocular Olympus CX31 (Olympus Optical do Brasil Ltda) e câmera (SC30Color CMOS Câmera para Microscopia de Luz, Olympus OpticalLtd. Brasil). Todas as análises morfométricas foram realizadas com o software ImageJ® (National Institutes Of Health, EUA). Para avaliar a morfometria do tecido adiposo dos compartimentos visceral e subcutâneos, foi obtido o diâmetro médio dos adipócitos através da média aritmética entre o maior e o menor diâmetro de cada

adipócito (Image-Pro Plus® versão 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) (VIROTE et al., 2020).

Análises bioquímicas (Glicose e Triglicerídeos)

Para a avaliação da concentração de glicose, realizou-se uma seleção aleatória de animais dos grupos experimentais, todos submetidos a um período de jejum de 12 horas. A mensuração da glicemia corporal (expressa em miligramas por decilitro - mg/dL) foi executada a partir de amostras sanguíneas coletadas por meio de punção da veia caudal. O instrumento utilizado para tal análise foi o glicosímetro Accu-Check Active® (Roche, Switzerland), conforme protocolo previamente delineado por CASTRO et al. (2018).

Quanto à quantificação das concentrações de triglicerídeos, o procedimento iniciou com a maceração inicial do corpo dos animais, seguida da suspensão em álcool isopropílico. O sobrenadante obtido foi isolado para posterior análise, na qual, foi empregado kit enzimático (BioTécnica, Brasil) em conformidade com as diretrizes estabelecidas pelos fabricantes. As determinações bioquímicas foram conduzidas utilizando um analisador automatizado Rx Daytona (Randox®, Antrim, Reino Unido), conforme descrito por MARTINS et al. (2023).

Análises das enzimas antioxidantes

Para a preparação das amostras, os corpos inteiros dos animais foram macerados com homogeneizador elétrico tipo Turrax® em tampão fosfato salino (PBS), na proporção 1:5 (m/v). Após a maceração e homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 4°C em 5500 rpm por 30 minutos. O sobrenadante resultante foi coletado e armazenado a -80°C. Para determinar as concentrações de proteínas, foi utilizado o método de Bradford, realizando análises espectrofotométricas a 595 nm e utilizando albumina de soro bovino como padrão (BRADFORD, 1976).

A avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada com base na auto-oxidação do pirogalol pelos métodos de Madesh e Balasubramanian (1997). As amostras foram diluídas em solução tampão fosfato 50 mM (pH 7,2) e 6 µL de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) -2,5-Difeniltetrazólio Brometo; Sigma- Aldrich, St. Louis, EUA) e 15 µL de pirogalol 1,25 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). A absorbância foi lida em triplicata usando um leitor de microplacas a 570 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific, EUA). A atividade SOD total foi expressa em unidades por miligrama de

proteína, onde uma unidade de atividade SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 50% de dismutação do radical superóxido por minuto.

A atividade da catalase (CAT) foi medida de acordo com Aebi (1984). A atividade da enzima foi determinada pelo consumo de H_2O_2 , visto como a diminuição da absorbância em 240 nm durante 60s. As amostras foram analisadas em triplicata em um leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, EUA). A atividade específica da CAT foi relatada como unidades por miligrama de proteína (uma unidade é definida como 1 pmol de H_2O_2 consumido por minuto).

Para a peroxidação lipídica (Tbars), a concentração de malondialdeído foi analisada pelo QuantiChrom™ TBARS Assay Kit (DTBA-100) (BioAssay Systems, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. A absorbância foi medida a 535 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific, EUA). Cada amostra foi processada em triplicata.

Análises moleculares

Isolamento do RNA total e transcrição reversa

Os cérebros dos animais foram dissecados em gelo e armazenado em $-80^{\circ}C$. O RNA total foi extraído usando ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System (Promega, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. Depois de ser extraído e diluído em 20 μ L de água ultrapura, o RNA total foi quantificado com o equipamento DeNovix DS-11 (DeNovix, EUA). As amostras foram armazenadas a $-80^{\circ}C$ até a síntese do DNA complementar (cDNA). Para cada amostra, 500 ng de RNA total foram usados para fazer cDNA com oligo (dT20) primers (Prodimol Biotechnology, Brasil), dNTP mix (10 mM), Reaction Buffer 5X (Thermo Fisher Scientific, Brasil), Ribolock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil) e Revertaid transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante.

Primers e PCR em tempo real (qPCR)

A escolha dos primers e a condução da qPCR foram conduzidos conforme estabelecido por Martins de Carvalho et al. (2019). As sequências (5'→3') dos genes alvo usados e tamanho dos amplicons estão disponíveis na Tabela 2. Os níveis de transcrição dos genes alvo foram medidos usando o termociclador do sistema CFX 96™ Real-Time (BioRad, EUA). As reações de qPCR para cada gene foram realizadas usando 10 μ L QuantiNova SYBR Green qPCR Kit (QIAGEN, Germany), 1 μ L de cDNA (10ng/ μ L), 0,4 μ L de solução de primer (10pM) e 8,2 μ L de água ultrapura (Thermo Fisher Scientific,

Brasil). Em todas as reações, um controle negativo sem molde de cDNA (NTC) foi usado, e o volume final da reação foi mantido em 20µL. A amplificação por PCR foi realizada sem a etapa de extensão (95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 20 seg). Os níveis de fluorescência foram medidos durante a última etapa de cada ciclo (60°C). Os dados de qPCR foram analisados pelo método Ct delta-delta usando o gene de referência *eef1a1a* e *rpl13a*, para normalização. A quantidade relativa de mRNA dos genes de interesse foi calculada como descrito por Vandesompele et al. (2002).

Tabela 5: Oligonucleotídeos usados para validar o protocolo de fenótipos do zebrafish adulto induzido a obesidade.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Amplicon pb	Reference
<i>eef1a111</i>	CTACTCTTCTTGATGCCCTTGAT	TGTCTCCAGCCACATTACCAC	309	(PAIVA et al, 2020)
<i>rpl13a</i>	TCTGGAGGACTGTAAGAGGT	AGACGCACAATCTTGAGAGCAG	148	(PAIVA et al, 2020)
<i>Il-4</i>	TCTCTGCCAAGCAGGAATG	CAGTTTCCAGTCCCGGTATATG	102	(KIRSTEN et al., 2021)
<i>Il-10</i>	CTCTGCTCACGCTTCTTCTT	GCTCCCTCAGTCTTAAAGGAAA	105	(KIRSTEN et al., 2021)
<i>Il-6</i>	GCGTCCTGACGTGGTATAAAG	GTCGTTTGGTGCTGTGTTTG	96	(KIRSTEN et al., 2021)
<i>tnf-α</i>	GACCACAGCACTTCTACCG	ACATTTTCCTCACTTCGTTTCAC	89	(KIRSTEN et al., 2021)
<i>Dnmt1</i>	GCTGGTAATGTCTGGAGAGAA	CAGGAAGAACTTGGGTCTGTA	205	This study
<i>Dnmt3b</i>	TCGTTGTTGATGCCGTGAAA	GGGAGTTTGGCCGTGTAGTG	186	This study

Análises realizadas na fase embrionária e larval das gerações F1 e F2

Teste de recrutamento de neutrófilos

Para este ensaio, 40 embriões de 8 horas pós fertilização (hpf) de cada grupo experimental das gerações F1 e F2 foram expostos a 0,003% de 1-fenil-2-tioureia (PTU; Sigma -Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) para bloquear sua melanização. Ao atingirem 72 hpf, as larvas foram anestesiadas com 0,016% triclaína, colocadas sobre uma placa de petri e os primórdios das barbatanas foram amputadas com uma lâmina de bisturi cirúrgica, logo após a notocorda, sob um estereomicroscópio (HASEGAWA et al., 2017). As larvas foram retornadas ao meio E3 e incubadas a 28±1°C por 6h (POLEDNIK et al., 2018). Após, seis horas do ferimento, as larvas foram fixadas overnight com uma solução de paraformaldeído a 4% e depois coradas com Sudan Black por 20 minutos para a detecção de neutrófilos (POLEDNIK et al., 2018). Em seguida, as larvas foram lavadas em etanol 70% para remover o excesso de coloração, facilitando a visualização de neutrófilos individuais (WALTERS et al., 2009). A contagem dos neutrófilos foi realizada utilizando um estereomicroscópio (LEICA, modelo DM750).

Teste de regeneração de cauda

Para a realização da atividade anti-inflamatória, através da avaliação do processo de regeneração da cauda, foram utilizadas 20 larvas das gerações F1 e F2, seguindo um protocolo adaptado de SUN et al. (2019). Resumidamente, os embriões obtidos foram mantidos no meio E3 por 72 hpf. As larvas foram anestesiadas com 0,016% triclaína, colocadas sobre uma placa de petri e os primórdios das barbatanas caudal foram amputados com uma lâmina de bisturi cirúrgica nas regiões logo após a notocorda, sob um estereomicroscópio (HASEGAWA et al., 2017), e foram fotografadas imediatamente após a amputação (0 horas pós-amputação (hpa)) utilizando microscópio. Em seguida, as larvas foram colocadas em seus respectivos poços nas placas de 96 poços (1 por poço) com 200 µl de meio E3 e fotografadas novamente as 72 hpa. A área regenerada da nadadeira de cada larva foi quantificada.

Análises enzimáticas

Para determinar a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e Peroxidação Lipídica, um pool de 40 larvas com 120 hpf por grupo experimental das gerações F1 e F2 foi colocado em microtubos com 400 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) fria e macerado com bastão de vidro (DUARTE DA SILVA et al., 2023). As análises foram realizadas em triplicata, totalizando o uso de 120 larvas por grupo experimental. Os homogenatos gerados após as macerações foram centrifugados por 4000 xg a 4° C por 15 minutos para obtenção dos sobrenadantes (XIONG et al., 2019). As análises realizadas para o método de Bradford, avaliação da atividade da SOD, CAT e a peroxidação lipídica determinada pela formação de TBARS foram as mesmas descritas para os animais adultos.

Análise Estatística

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) e foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Quando os dados atenderam aos pressupostos do teste, foram então analisados usando o teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey HSD. O p foi considerado significativo quando $< 0,05$ e representado por um asterisco (*). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software Minitab v.18 (State College, USA), enquanto os gráficos foram gerados com o software GraphPad Prism 8.0.1 (Graph Pad Software Inc., United States).

RESULTADOS

Fêmeas e machos da geração P desenvolveram uma condição semelhante a obesidade com regulação transcricional diferencial de genes associados a epigenética

Ao término do protocolo alimentar, as fêmeas do grupo HCD apresentaram um aumento significativo no peso corporal de 36,43% ($p < 0,05$) em comparação aos seus controles (Figura 1A). Este acréscimo foi acompanhado de uma hipertrofia dos adipócitos nos tecidos subcutâneo e visceral (Figuras 1B e C), e elevação ($p < 0,05$) nos níveis séricos de glicose e triglicerídeos (Figura 1D). Adicionalmente, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD (Figuras 1E e F). Tbars não apresentou diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 1G). Quanto à análise dos níveis transcricionais dos genes associados a inflamação, houve uma hiporegulação dos anti-inflamatórios (*il-4* e *il-10*) e uma hiper-regulação dos pró-inflamatórios (*il-6* e *tnf- α*) (Figura 1H). Em relação aos genes associados à epigenética, as fêmeas do grupo HCD também exibiram uma regulação positiva dos genes *dnmt1* e *dnmt3* (Figura 1I). Os dados apresentados são consistentes com alterações observadas em quadros de obesidade.

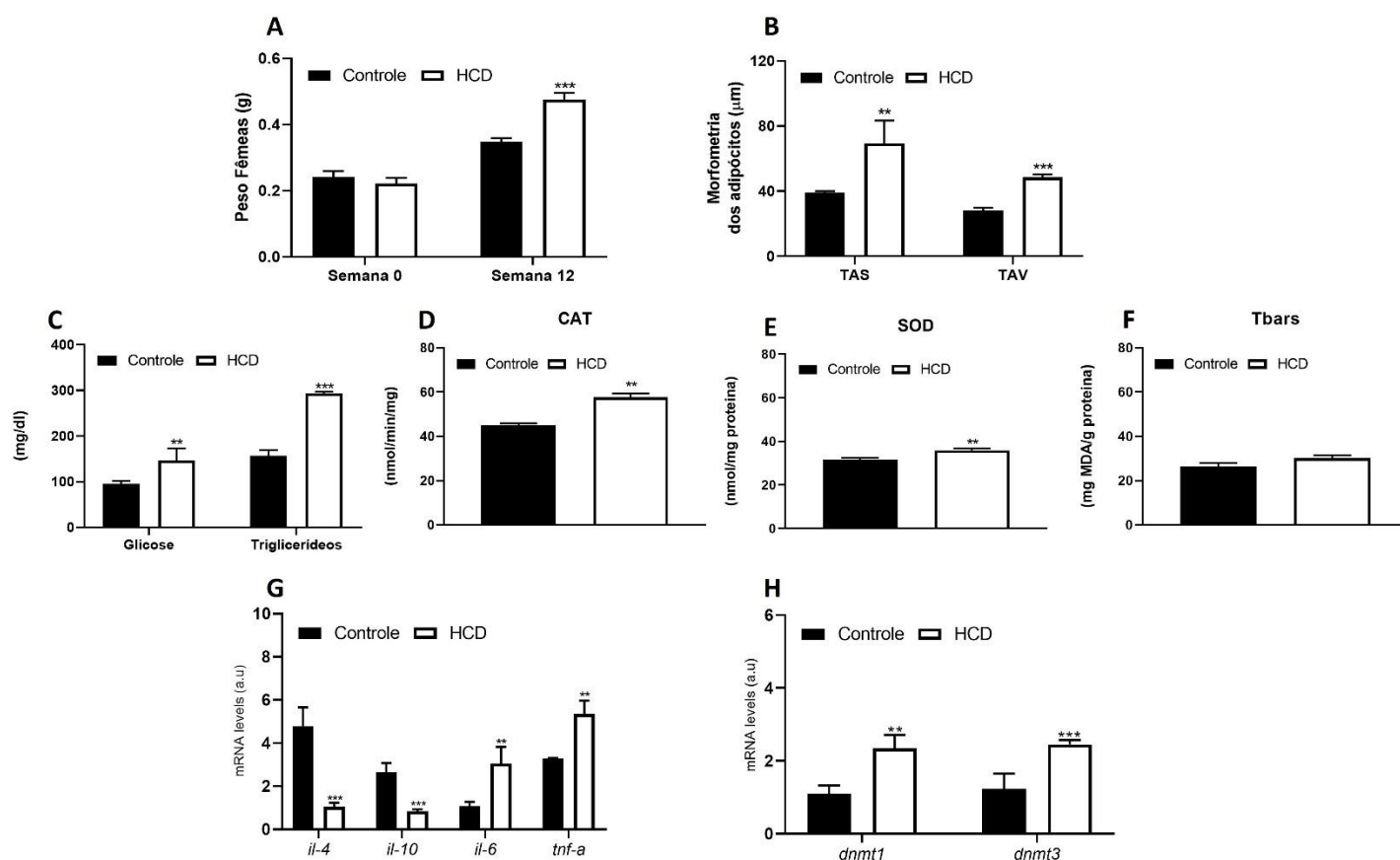


Figura 1: Principais alterações das fêmeas da geração Parental (P) dos grupos Controle e HCD. (A) Peso corporal ao final das doze semanas do protocolo alimentar. (B) Diâmetro médio dos adipócitos subcutâneos e viscerais. (C) Avaliação da glicose e triglicerídeos. Atividade das enzimas antioxidantes (D) CAT, (E) SOD e (F) Tbars. (G) Quantificação relativa do mRNA do cérebro de genes envolvidos na neuroinflamação. (H) Quantificação relativa do mRNA do cérebro de genes envolvidos na epigenética. Dados são representados por média±SEM. Análise realizada por ANOVA seguida de pós-teste Tukey. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p<0,05$).

Resultados semelhantes foram observados nos machos do grupo HCD. Assim, após o protocolo alimentar, houve um aumento ($p<0,05$) do peso corporal de 37,91% em relação aos machos do grupo Controle (Figura 2A). Este aumento no peso corporal foi acompanhado de hipertrofia de adipócitos subcutâneos e viscerais (Figuras 2B e C), elevação nos níveis séricos de glicose e triglicerídeos (Figuras 2D e E) e aumento na atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD, bem como da enzima Tbars ($p<0,05$) (Figuras 2E-G). Quanto à regulação transcricional de genes associados à neuroinflamação, observou-se hiporregulação apenas do gene *il-4*, e hiperregulação dos genes *il-6* e *tnf-α* (Figura 2H). No que tange aos genes relacionados à epigenética, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) entre os machos HCD e seus controles na geração P (Figura 2I).

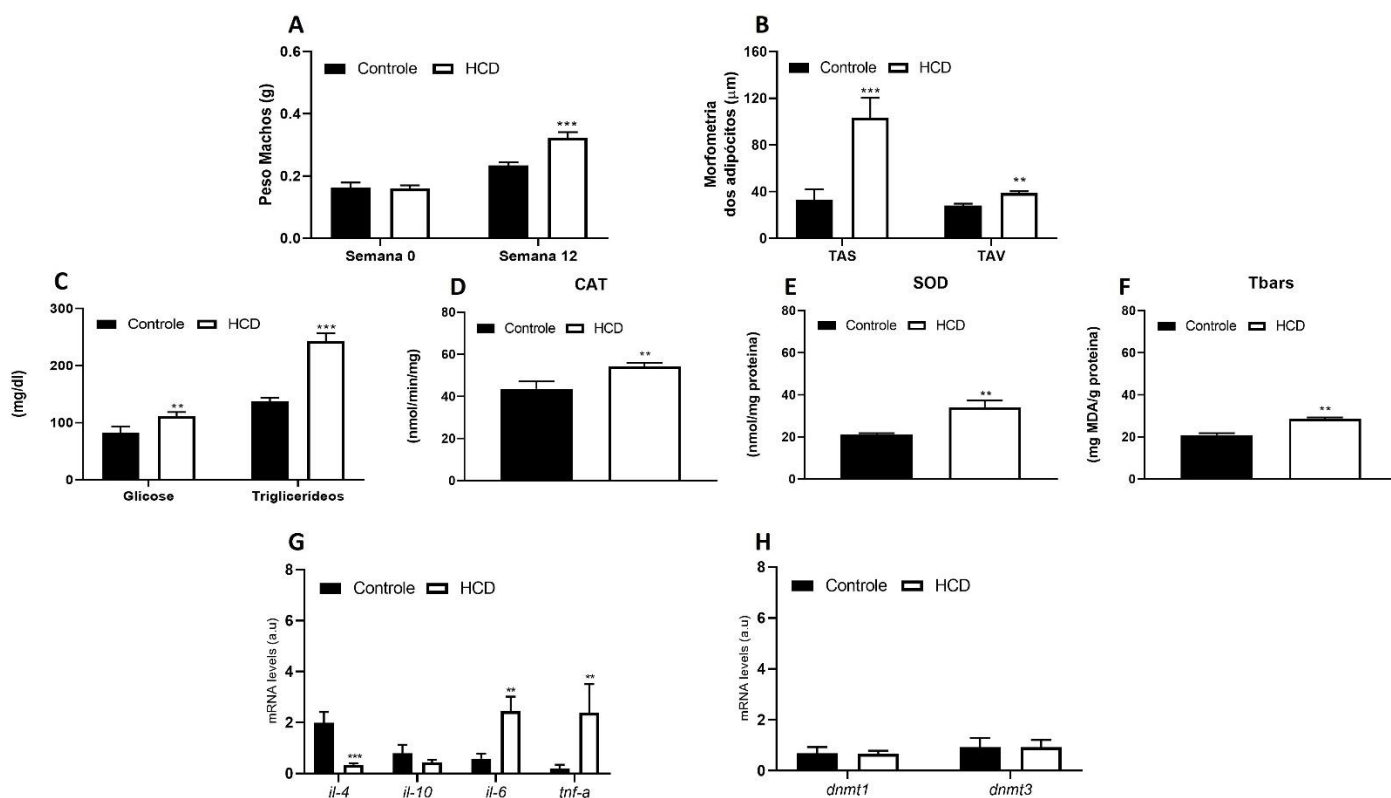


Figura 2: Principais alterações dos machos da geração Parental (P) dos grupos Controle e HCD. (A) Peso corporal ao final das doze semanas do protocolo alimentar. (B) Diâmetro médio dos adipócitos subcutâneos e viscerais. (C) Avaliação da glicose e triglicerídeos. Atividade das enzimas antioxidantes (D) CAT, (E) SOD e (F) Tbars. (G) Quantificação relativa do mRNA do cérebro de genes envolvidos na inflamação. (H) Quantificação relativa do mRNA do cérebro de genes envolvidos na epigenética. Dados são representados por média±SEM. Análise realizada por ANOVA seguida de pós-teste Tukey. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p<0,05$).

Pais que consumiram HCD geram fêmeas adultas, também submetidas ao consumo da HCD, condição semelhante a obesidade com alteração nos genes relacionados a neuroinflamação e epigenética

Todos os animais dos quatro grupos experimentais, fêmeas e machos, apresentaram taxa de sobrevivência aproximada de 75% até atingirem a idade adulta de 3 meses pós fertilização, quando iniciou o protocolo alimentar da geração F1 ($p>0,05$). Em relação as fêmeas, ao final do protocolo alimentar em relação ao grupo Controle (F1C/C) da geração F1, o grupo F1C/HCD não apresentou diferença estatística ($p>0,05$) em nenhum dos parâmetros morfológicos, bioquímico e enzimático analisados.

No grupo F1HCD/C, observou-se aumento do peso corporal antes e após o protocolo alimentar, sem diferenças significativas na morfometria do tecido adiposo

($p>0,05$). Houve elevação dos níveis de glicose sanguínea, com diminuição na atividade da catalase (CAT) ($p<0,05$).

No grupo F1HCD/HCD, observou-se aumento do peso corporal antes e após o protocolo alimentar, associado à hipertrofia do tecido adiposo subcutâneo e visceral, elevação dos níveis de glicose sanguínea e triglicerídeos plasmáticos, bem como diminuição da atividade da CAT e superóxido dismutase (SOD), acompanhada de aumento dos Tbars ($p<0,05$).

Nas fêmeas advindas apenas do pai obeso, porém que consumiram dieta Controle (F1P/C), foi observado apenas aumento do peso corporal antes e após o protocolo alimentar ($p<0,05$), sem alteração nos demais parâmetros ($p>0,05$). Quando submetidas ao consumo HCD (F1P/HCD), além do aumento do peso corporal também apresentaram hipertrofia do tecido adiposo visceral, aumento da glicose sanguínea e da atividade da SOD ($p<0,05$).

As fêmeas descendentes de mães obesas que consumiram dieta Controle ou HCD, grupos F1M/C e F1M/HCD, demonstraram diferença no peso corporal apenas após o protocolo alimentar, sem alterações na hipertrofia dos adipócitos e parâmetros bioquímicos. Porém, apenas as fêmeas do grupo F1M/HCD apresentaram aumento da glicose sanguínea e da atividade da enzima catalase ($p<0,05$). (Figura 3).

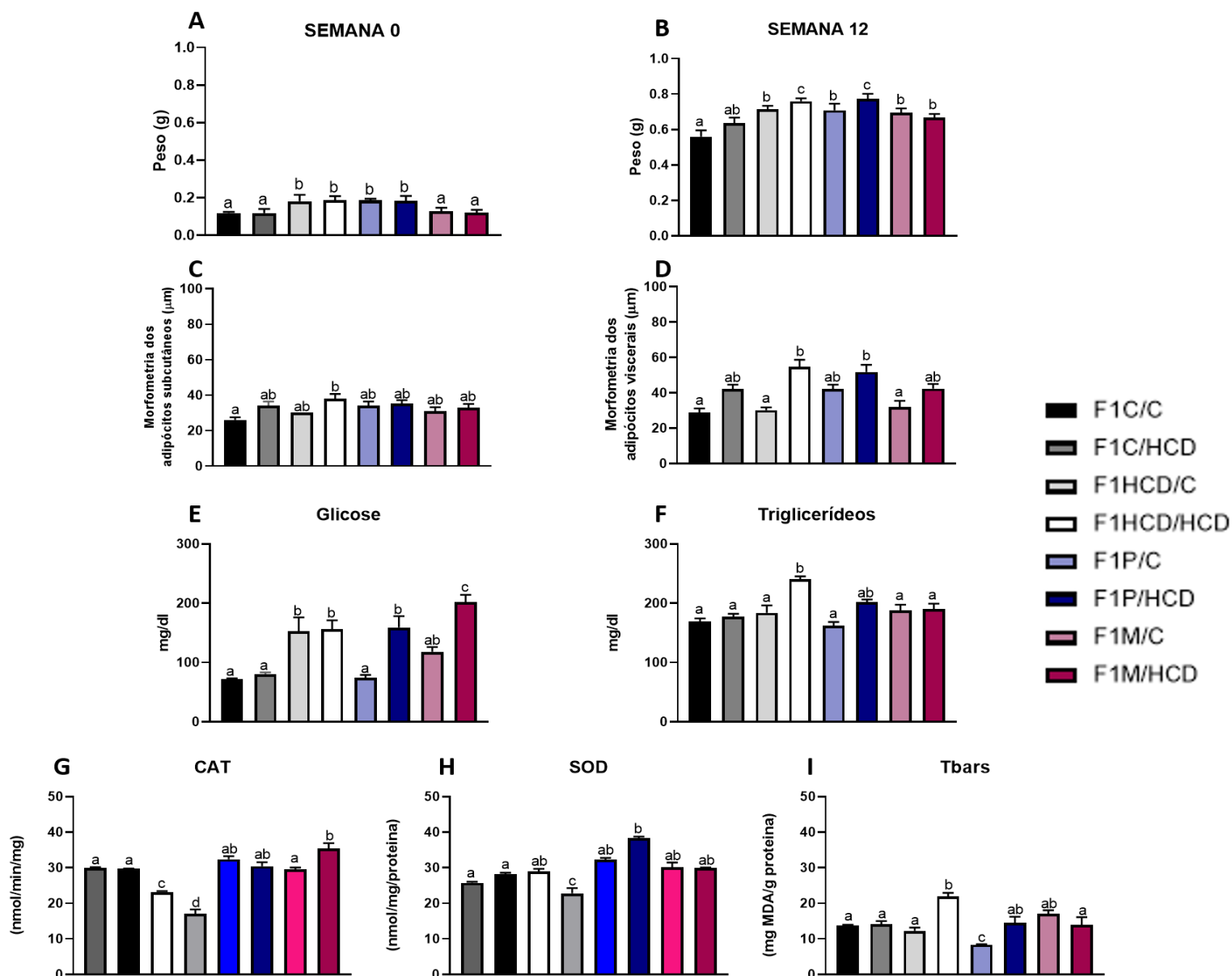


Figura 3: Principais alterações das fêmeas adultas da geração F1 dos grupos Controle e HCD. (A) Peso corporal antes do protocolo alimentar. (B) Peso corporal ao final das doze semanas do protocolo alimentar (C) Diâmetro médio dos adipócitos subcutâneos. (D) Diâmetro médio dos adipócitos viscerais. (E) Avaliação da glicose sanguínea e (F) Avaliação dos triglicerídeos plasmático. Atividade das enzimas antioxidantes (G) CAT, (H) SOD e (I) Tbars. Dados são representados por média±SEM. Análise realizada por ANOVA seguida de pós-teste Tukey. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

No contexto da investigação genômica dos genes vinculados à neuroinflamação em fêmeas da geração F1, evidenciou-se uma redução significativa na transcrição dos genes *il-4* e *il-10* em decorrência da exposição às condições experimentais dos grupos F1C/HCD, F1HCD/HCD, F1P/HCD, F1M/C e F1M/HCD, quando comparadas ao grupo controle F1C/C ($p<0,05$). No que concerne aos demais genes relacionados à neuroinflamação, somente as fêmeas dos grupos F1C/HCD e F1HCD/HCD manifestaram um aumento significativo na expressão dos genes *il-6* e *tnf- α* ($p<0,05$). Sendo que apenas o grupo F1HCD/HCD foi observado um aumento significativo na transcrição dos genes relacionados a epigenética *dnmt1* e *dnmt3* ($p<0,05$).

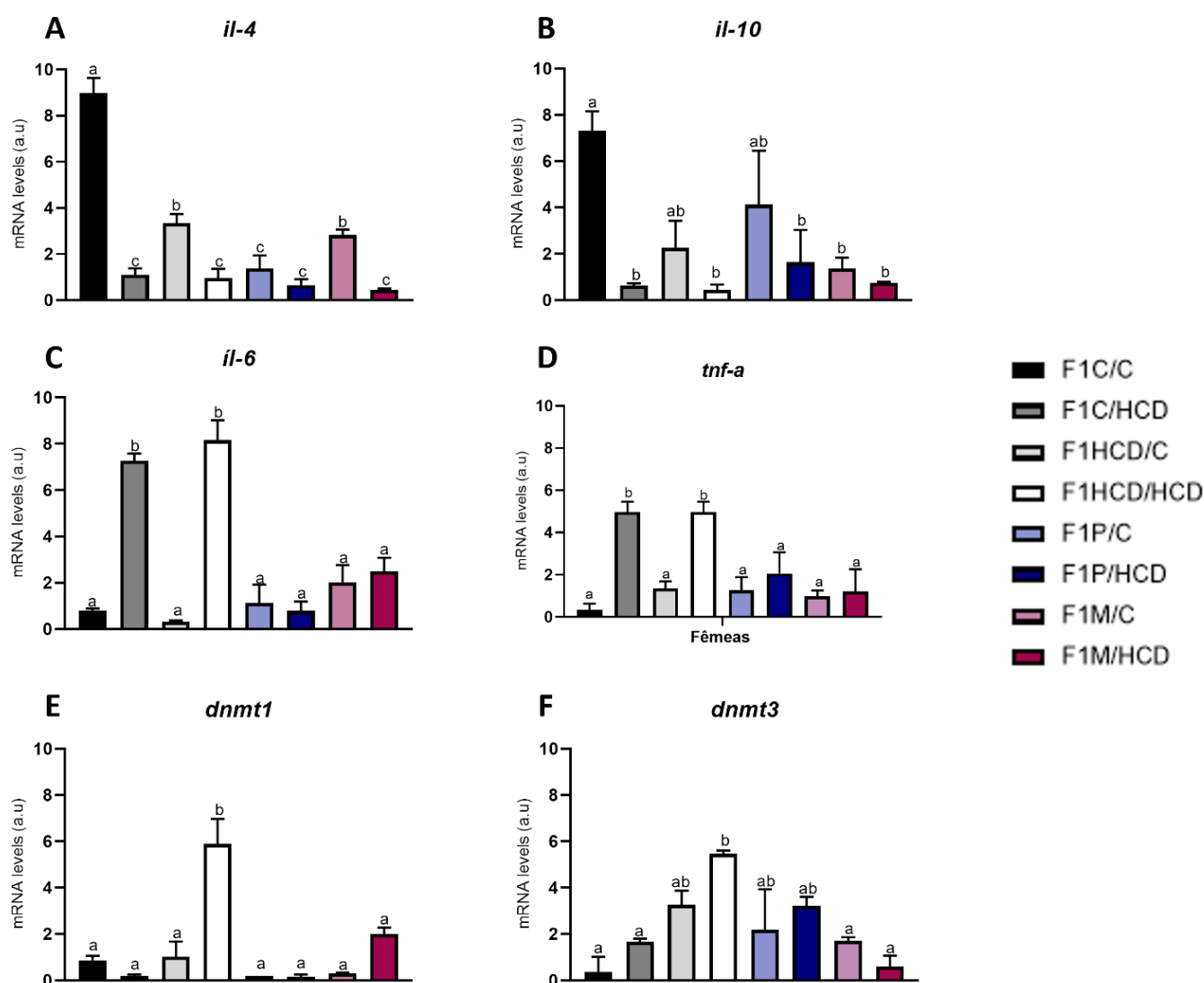


Figura 4: Quantificação relativa do mRNA do cérebro de genes envolvidos na neuroinflamação e epigenética das fêmeas da geração F1. Níveis relativos de mRNA (a.u) por: (A) *il-4*, (B) *il-10*, (C) *il-6* (D) *tnf- α* , (E) *dnmt1*, (F) *dnmt3* no cérebro dos oito grupos experimentais da geração F1. Dados são representados por média $\pm$ SEM. Análise realizada por ANOVA seguida de pós-teste Tukey. Letras diferentes representam diferenças significativas ($P<0,05$).

Pais que consumiram HCD geram machos adultos alterações dos parâmetros morfológicos, bioquímicos, enzimáticos e modulação nos genes relacionados a epigenética

Referente aos machos do grupo F1C/HCD, foi observada uma diferença significativa no peso corporal somente após a implementação do protocolo alimentar, sem alteração nos demais parâmetros ($p>0,05$).

Nos machos descendentes de mãe e pai obesos e consumiram a ração Controle (F1HCD/C), foi registrada um aumento do peso corporal dos machos prévio ao protocolo alimentar, porém ao final das doze semanas de alimentação não foram observadas alterações em nenhum dos parâmetros analisados ($p>0,05$). Entretanto no grupo F1HCD/HCD, constatou-se um aumento no peso corporal associado à hipertrofia do tecido adiposo visceral, elevação dos níveis plasmáticos de triglicerídeos, diminuição da atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), com aumento dos níveis de Tbars ($p<0,05$).

No grupo F1P/C, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos parâmetros analisados em comparação com o grupo controle. Porém, os animais do grupo F1P/HCD exibiram um aumento da glicose sanguínea e diminuição da atividade da CAT e SOD, com aumento dos níveis de Tbars ($p<0,05$) (FIGURA?).

Em relação aos machos do grupo F1M/C, foi observado um aumento no peso corporal prévio ao protocolo alimentar, com elevação nos níveis de glicose sanguínea e triglicerídeos plasmáticos ($p<0,05$). Finalmente, no grupo F1M/DIO, evidenciou-se uma diferença no peso corporal nos machos antes e após o protocolo alimentar e aumento da glicose sanguínea ($p<0,05$).

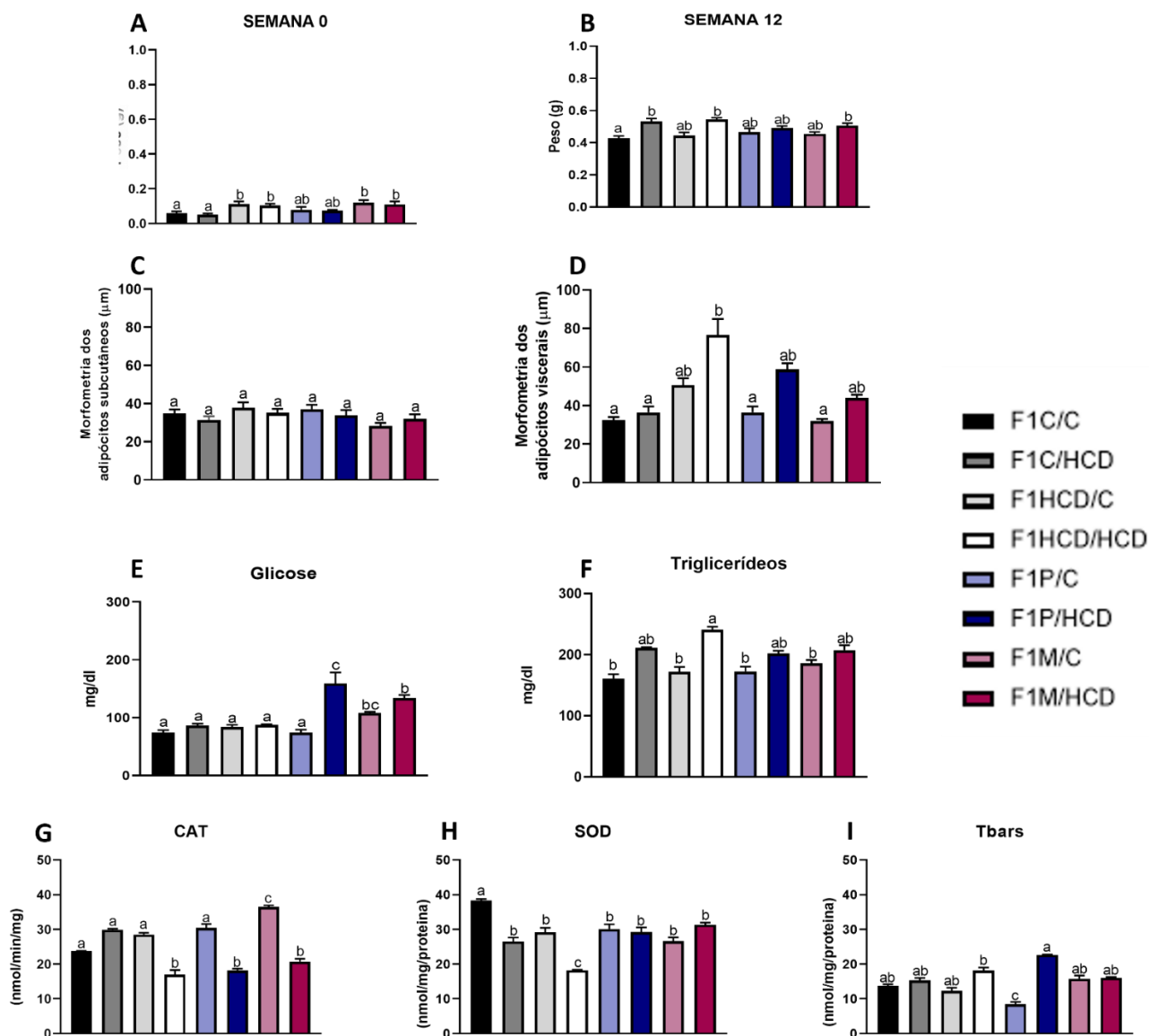


Figura 5: Principais alterações dos machos adultos da geração F1 dos grupos Controle e HCD. (A) Peso corporal antes do protocolo alimentar. (B) Peso corporal ao final das doze semanas do protocolo alimentar (C) Diâmetro médio dos adipócitos subcutâneos. (D) Diâmetro médio dos adipócitos viscerais. (E) Avaliação da glicose sanguínea. (F) Avaliação dos triglicerídeos plasmático. Atividade das enzimas antioxidantes (G) CAT, (H) SOD e (I) Tbars. Dados são representados por média±SEM. Análise realizada por ANOVA seguida de pós-teste Tukey. Letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Os resultados da análise da expressão gênica em machos de zebrafish da geração F1, submetidos a diferentes condições alimentares, revelaram padrões distintos de transcrição genética. O grupo F1C/HCD exibiu um aumento significativo na transcrição dos genes *tnf-a* e *dnmt3* em comparação com os machos do grupo Controle da geração F1 (F1C/C) ($p < 0,05$). Em contraste, os machos do grupo F1HCD/C não apresentaram diferenças significativas na transcrição de nenhum dos genes analisados ($p > 0,05$). Por outro lado, os machos do grupo F1HCD/HCD demonstraram um aumento notável na expressão de *il-6* e *tnf-a*, além de um significativo aumento na transcrição de *dnmt1* e

dnmt3 ($p < 0,05$). Adicionalmente, nos grupos F1P/C, F1M/C e F1P/HCD não foram identificadas diferenças significativas na expressão de nenhum dos genes analisados ($p > 0,05$). No entanto, o grupo F1M/HCD apresentou um aumento significativo na expressão do gene *tnf- α* .

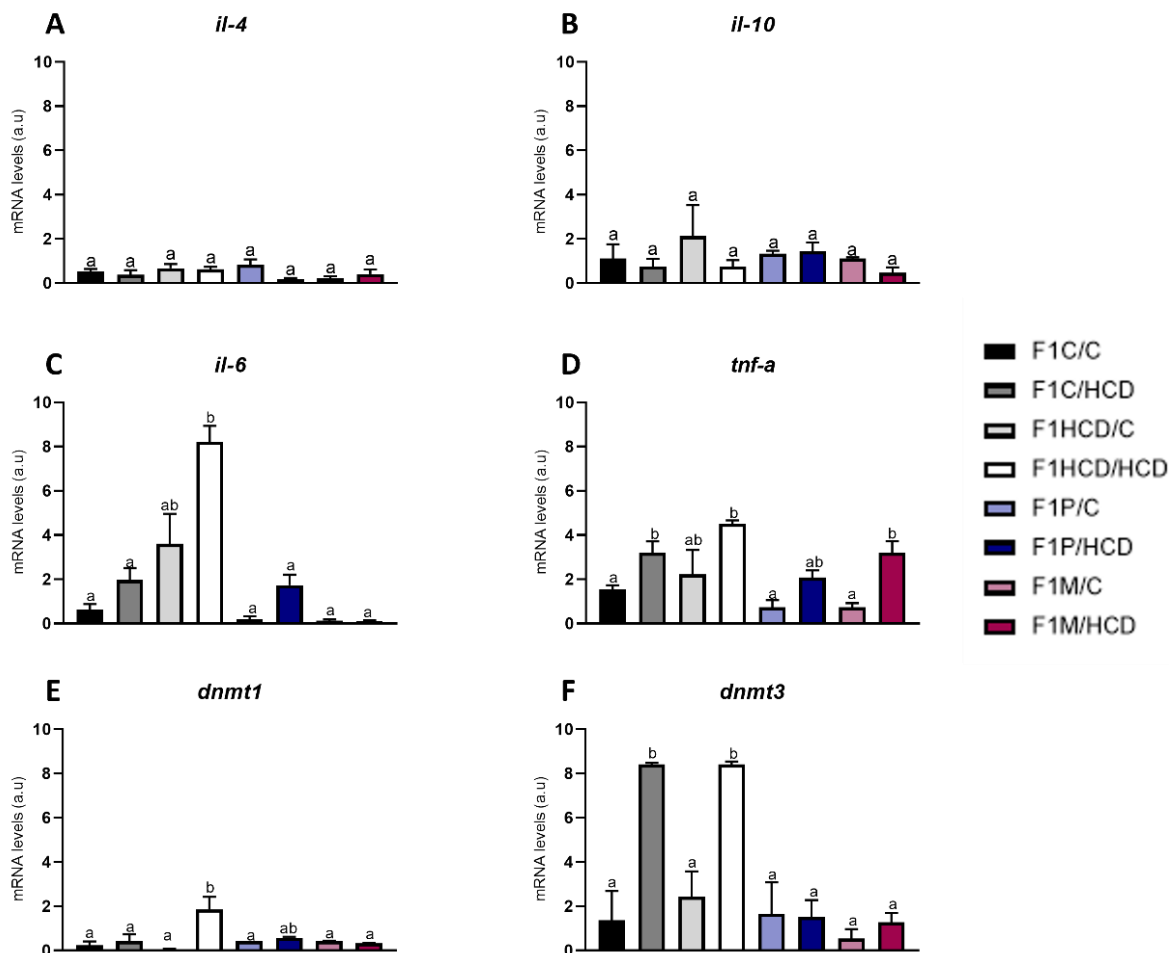


Figura 6: Quantificação relativa do mRNA do cérebro de genes envolvidos na neuroinflamação e epigenética dos machos da geração F1. Níveis relativos de mRNA (a.u) por: (A) *il-4*, (B) *il-10*, (C) *il-6* (D) *tnf- α* , (E) *dnmt1*, (F) *dnmt3* no cérebro dos oito grupos experimentais da geração F1. Dados são representados por média $\pm$ SEM. Análise realizada por ANOVA seguida de pós-teste Tukey. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Consumo da dieta HCD não afetou a capacidade reprodutiva na geração P, mas levou a alterações no perfil inflamatório e atividade antioxidante nos embriões da geração F1

Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nos parâmetros reprodutivos, como a média da desova total das fêmeas. Adicionalmente, todos os embriões, dos grupos analisados, não manifestaram divergências na taxa de sobrevivência até 120 horas pós-fertilização.

O grupo F1HCD apresentou a menor capacidade de regeneração da nadadeira caudal e um aumento ($p<0,05$) significativo no recrutamento de neutrófilos em comparação com todos os demais grupos analisados. Assim, como indicado por uma seta, figura 3C. Em contrapartida, os grupos F1P e F1M exibiram uma redução significativa ($p<0,05$) na capacidade de regeneração da nadadeira caudal quando comparados com o grupo F1C, não alcançando significância em relação ao recrutamento de neutrófilos ($p>0,05$).

Em relação à avaliação da atividade das enzimas antioxidantes, o grupo F1HCD apresentou uma menor atividade das enzimas CAT e SOD, enquanto exibiu uma atividade superior da enzima Tbars em relação aos demais grupos ($p<0,05$). Nos grupos F1P e F1M quando comparados ao grupo Controle, foram encontrados apenas uma diminuição da SOD e produção de Tbars ($p<0,05$).

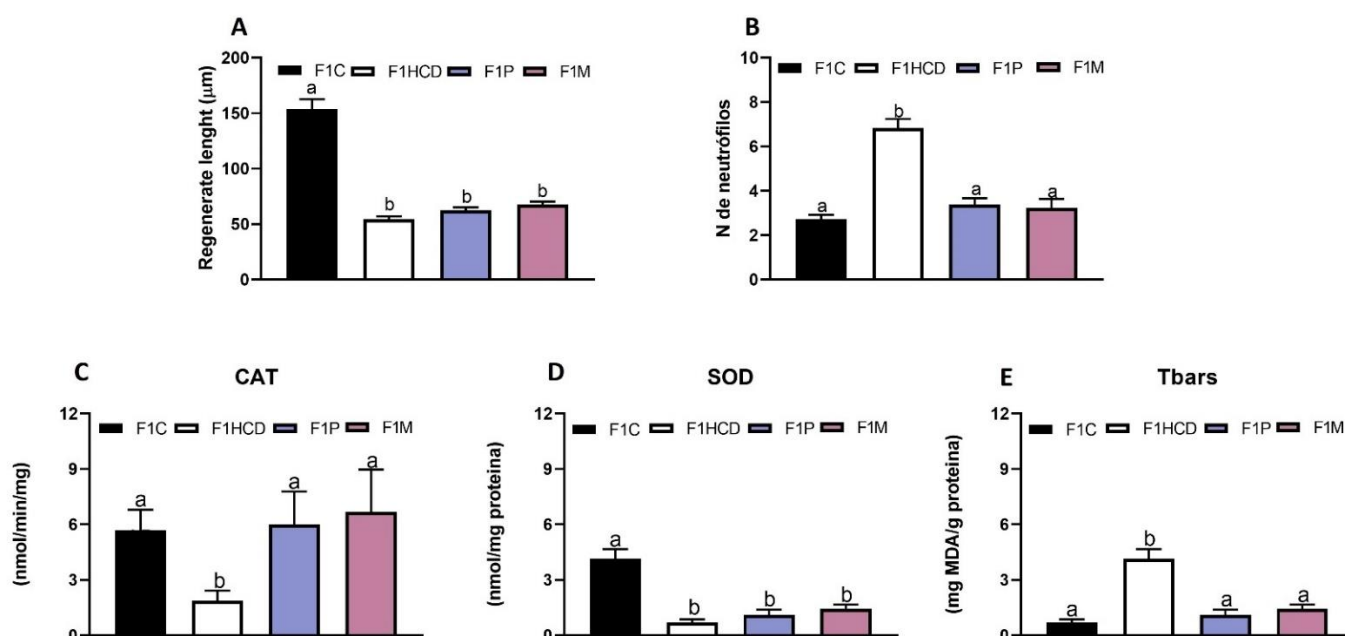


Figura 7: Alterações dos grupos da geração F1 nas fases embrionária e larval. (A) Análise comparativa da capacidade de regeneração da nadadeira caudal. (B) Análise comparativa dos efeitos do recrutamento de neutrófilos pós-lesão na nadadeira caudal. Níveis de atividade de enzimas antioxidantes – (C) CAT, (D) SOD e (E) Tbars em embriões/larvas de peixe-zebra às 120 horas pós-fertilização (hpf). Dados são representados por média±SEM. Análise realizada por ANOVA seguida de pós-teste Tukey ($p<0,05$). Letras diferentes representam diferenças significativas.

Consumo da dieta HCD por fêmeas ao longo de duas gerações alterou o perfil inflamatório e da atividade das enzimas antioxidantes nos embriões de sua prole na geração F2

Observou-se que a exposição à dieta dos pais, gerou nos grupos F2C/HCD e F2HCD/C aumento significativo na atividade da superóxido dismutase (SOD) com

aumento dos níveis de Tbars ($p<0,05$). Já em relação os embriões do grupo F2HCD/HCD não apenas promoveu uma significativa elevação na atividade da SOD e nos níveis de Tbars, mas também exacerbou a mortalidade e reduziu a capacidade de regeneração ($p<0,05$).

Em contraste, os animais do grupo F2P/C não exibiram alterações notáveis em relação aos parâmetros estudados ($p>0,05$). Entretanto, os embriões do grupo F2P/HCD apresentaram em aumento da mortalidade e no recrutamento de neutrófilos ($p<0,05$). Por fim, o grupo F2M/C apresentou uma redução na atividade da catalase, enquanto o grupo F2M/HCD não apenas diminuiu a atividade da catalase, mas também comprometeu a capacidade de regeneração dos embriões ($p<0,05$).

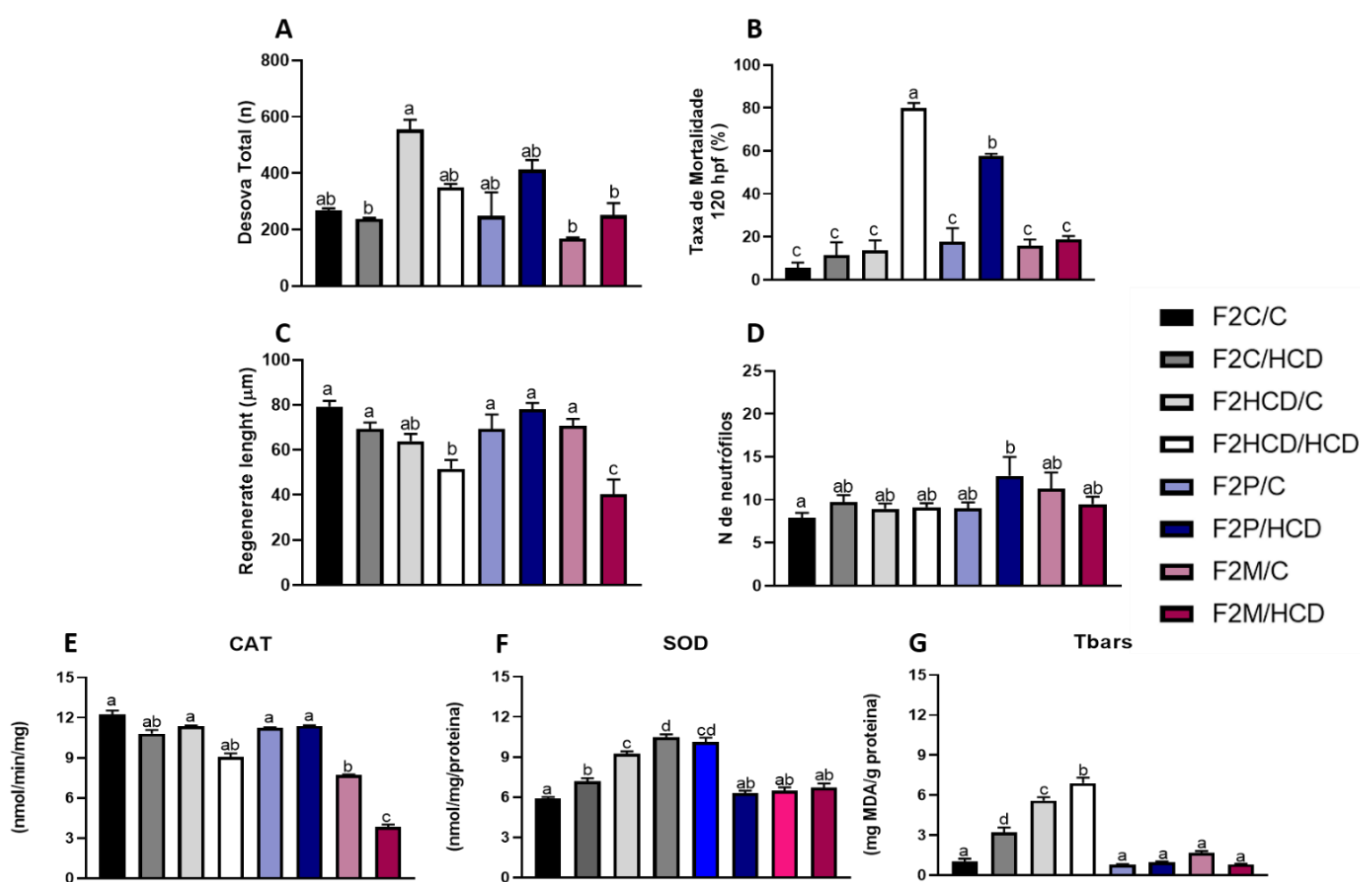


Figura 8: Alterações dos grupos da geração F2 nas fases embrionária e larval. (A) Capacidade da desova total de embriões por fêmeas da geração F1 (B) Taxa de mortalidade das larvas dos diferentes grupos experimentais da geração F2 as 120 horas pós fertilização (hpf)(C) Análise comparativa da capacidade de regeneração da nadadeira caudal. (D) Análise comparativa dos efeitos do recrutamento de neutrófilos pós-lesão na nadadeira caudal. Níveis de atividade de enzimas antioxidantes – (E) Catalase (CAT), (F) Superóxido dismutase (SOD) e (G) Peroxidação Lipídica (Tbars) em embriões/larvas de peixe-zebra às 120 horas pós-fertilização (hpf). Dados são representados por média±SEM. Análise realizada por ANOVA seguida de pós-teste Tukey. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p<0,05$).

DISCUSSÃO

Neste estudo, analisamos os impactos de uma dieta rica em carboidratos ao longo de duas gerações no zebrafish, com foco na compreensão da influência do tratamento nutricional dos progenitores sobre em parâmetros fenotípicos observados na prole. O consumo da HCD induziu uma condição semelhante a obesidade em ambos os sexos da geração P, caracterizada por aumento de peso, hipertrofia de adipócitos, elevação dos níveis glicose e triglicerídeos, perfil neuroinflamatório e início de um quadro de estresse oxidativo. Entretanto, algumas diferenças foram observadas, como genes associados a epigenética (dnmt1 e dnmt3) que foram diferencialmente regulados exclusivamente nas fêmeas.

Na avaliação da prole (geração F1), descendentes de progenitores obesos exibiram diferenças fisiológicas conforme sexo dependente. As fêmeas adultas apresentaram alterações em todos os parâmetros, desenvolvendo condição similar à da geração P. Entretanto, os machos, apesar de apresentarem a maioria das alterações semelhantes às das fêmeas, não exibiram hiporregulação de genes anti-inflamatórios. Salienta-se que, apesar das condições patológicas desenvolvidas, o consumo da dieta HCD não impactou a capacidade reprodutiva entre as gerações P e F1.

Esses achados indicam uma transmissão transgeracional associada à dieta rica em carboidratos, demonstrando que a variação de macronutrientes afeta diretamente tanto o metabolismo quanto a regulação epigenética no zebrafish (Rocha et al., 2014; Fowler et al., 2020). As diferenças observadas entre machos e fêmeas na geração P são interessantes visto que estudos prévios demonstraram que animais de sexos diferentes possuem necessidades nutricionais distintas para manutenção da sua homeostase energética, tendo como justificativa o controle hormonal reprodutivo (Camilleri et al., 2022).

As respostas encontradas com as fêmeas de zebrafish na geração P, corroboram com a literatura existente, enfatizando a interconexão entre inflamação, resposta epigenética e fenótipos típicos do quadro de obesidade como aumento do peso corporal, hipertrofia de adipócitos subcutâneos e viscerais, e aumento de parâmetros bioquímicos como glicose e triglicerídeos (Jung; Kang, 2021). Especificamente a metilação do DNA, encontrada exclusivamente nas fêmeas, é uma das modificações epigenéticas mais bem caracterizadas na literatura (Robertson, 2005; Huang et al., 2021). A dnmt1 é caracterizada como responsável pela manutenção da metilação global do DNA, sendo sua

hiper-regulação relacionada ao estado de inflamação crônica ocasionada pela obesidade (O'Neill; Nulsen, 2021; Ali et al., 2022). Já o aumento da transcrição de *dnmt3b*, responsável por metilações de novo no DNA, emerge como um determinante epigenético crucial para a resistência à insulina associada à obesidade (You et al., 2017; Maugeri et al., 2018; Sukur et al., 2023).

Nos machos que consumiram HCD, diferente das fêmeas, observou-se a elevação na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e a formação de Tbars, biomarcador de dano oxidativo, sugerindo uma resposta ao aumento do estresse oxidativo, indicando um possível mecanismo de defesa antioxidante (Bevilaqua et al., 2019). Por sua vez, diminuição dos níveis de *il-4*, um marcador anti-inflamatório, e o aumento na transcrição dos genes pro-inflamatórios *il-6* e *tnf-α* são consistentes com a ativação de processos inflamatórios, característicos de condições associadas à obesidade (Chen et al., 2019).

Atualmente, está estabelecido que a dieta tanto das mães quanto dos pais exerce influência sobre a prole (Emborski; Mikheyev, 2019). Essa ocorrência se fundamenta na constatação de que a informação epigenética não se restringe exclusivamente às transmissões entre células somáticas por meio da mitose, mas também se manifesta durante a meiose, facilitando a transferência de características da geração parental para a descendência (Guo et al., 2020). No entanto, os mecanismos subjacentes, os motivos pelos quais isso ocorre e a extensão dessa influência podem variar, sendo modulados por diversos fatores, conforme documentado em estudos prévios envolvendo *Drosophila*, humanos e ratos (Camilleri-Carter et al., 2019; Zizzari et al., 2016; Harasymowicz et al., 2020).

Essa comparação ainda não foi empreendida no modelo zebrafish, já consolidado na literatura para investigações acerca da obesidade (Oka et al., 2010). Esse aspecto adquire particular importância considerando-se que o sexo pode contribuir significativamente, sendo responsável por até 45% da variabilidade observada nas respostas fenotípicas frente ao ambiente dos progenitores (Samuelsson et al., 2008; Emborski; Mikheyev, 2019). Por isso, ao avaliar a influência dos efeitos transgeracionais, este estudo ponderou a resposta relativa de cada progenitor de origem nas respostas manifestadas pelos descendentes do sexo masculino e feminino, fornecendo, assim, *insights* cruciais para uma compreensão mais aprofundada da influência ancestral sobre os fenótipos descendentes.

Neste contexto, as fêmeas provenientes de progenitores obesos e submetidos à dieta rica em carboidratos, grupo F1HCD/HCD exibiram características mais

proeminentes compatíveis com o quadro de obesidade. Sendo importante ressaltar que foram identificadas modulações nos genes anti-inflamatórios, evidenciando uma diminuição na expressão em todos os grupos de fêmeas expostas ao consumo de dieta rica em carboidratos (HCD), o que não foi observado nos machos.

No que tange aos resultados obtidos nos machos da geração F1, o grupo F1HCD/HCD obteve aumento no peso corporal associado à hipertrofia específica do tecido adiposo visceral com hipertrigliceridemia e aumento na transcrição de genes pro-inflamatórios (*il-6* e *tnf-α*). Esse quadro característico da obesidade é relatado em humanos e outros mamíferos do sexo masculino (Kautzky-Willer et al., 2016; Link et al., 2017). A distribuição da gordura corporal é significativamente diferente entre indivíduos do sexo masculino e feminino sendo um forte preditor de risco de doenças (Fried et al., 2015). A maior adiposidade visceral observada em machos está associada a níveis elevados de insulina pós-prandial, ácidos graxos livres e triglicerídeos além de maior secreção de marcadores inflamatórios (Chang et al., 2018).

Este é o primeiro estudo que demonstra que a ingestão de uma dieta rica em carboidratos (HCD) por machos de zebrafish pertencentes à geração F1, que herdaram características genéticas de pais obesos, demonstrou ser suficiente para induzir um aumento na transcrição de genes associados à epigenética. Este resultado contrasta com as fêmeas, as quais apresentaram essa característica de transcrição alterada durante a exposição parental ao consumo de HCD.

Estudos recentes reportaram diferenças na metilação do DNA entre os gêneros (Yusipov et al., 2020). Essas disparidades, particularmente na expressão das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), manifestam-se desde as fases iniciais do desenvolvimento, abrangendo blastocistos masculinos e femininos, até estágios subsequentes sendo já relatados tanto em humanos quanto em camundongos (Dearden et al., 2018). Alguns estudos demonstraram que as diferenças de metilação de gênero não se restringem aos cromossomos sexuais, e o padrão de metilação mais pronunciado nas fêmeas também é observado em regiões cromossômicas autossômicas, além de serem sensíveis aos hormônios esteroides (Solomon et al., 2022). Vale ressaltar também que estudos anteriores indicam uma menor expressão, especificamente das enzimas *dnmt1* e *dnmt3*, em machos de camundongos obesos, sugerindo uma possível relação com a sua maior capacidade de desmetilação (McCarthy; Nugent, 2015).

O grupo F1P/HCD, composto por machos descendentes apenas do progenitor obeso que consumiram uma dieta rica em carboidratos (HCD), manifestou um aumento no peso

corporal associado à hipertrofia específica do tecido adiposo visceral. Além disso, esses indivíduos apresentaram hiperglicemia e uma notável modificação na atividade das enzimas antioxidantes, indicativa de um estado de estresse oxidativo (Álvarez et al., 2023). Neste contexto, evidenciamos uma suscetibilidade exclusiva dos machos de zebrafish à influência da dieta paterna, após a exposição ao HCD, uma vez que não foram observadas alterações nos machos pertencentes aos grupos F1P/C ou provenientes de progenitoras obesas. Estudos realizados em ratos também indicaram que o estilo de vida paterno influencia a saúde da prole independentemente da contribuição materna, sendo já demonstrado que os filhos de pais obesos apresentavam obesidade mais extrema em comparação com os filhos de mães obesas (Huypens et al., 2016; Klastrup et al., 2019).

Entretanto, o consumo HCD não exerceu efeitos significativos sobre a capacidade reprodutiva dos machos e fêmeas de zebrafish da geração P e F1. Este achado é consistente com alguns estudos que também não observaram alterações na reprodução em resposta a dietas ricas em carboidratos tanto no zebrafish (Robison et al., 2008; Türkoğlu et al., 2021) como em outros modelos animais como o camundongo (Aburto-Hernández et al., 2023). No entanto, quando analisado as respostas da prole das gerações F1 e F2, a identificação de aumentos de Tbars e a diminuição na atividade de enzimas antioxidantes, como a CAT e SOD, nos embriões do grupo proveniente de pais que consumiram HCD ao longo das gerações sugere que a exposição dietética dos progenitores pode ter impactos sobre a prole (Virote et al., 2020). Estes resultados coincidem com pesquisas que destacam a influência do ambiente materno/paterno na saúde da prole, incluindo fatores dietéticos (Anwer et al., 2022).

Em relação ao efeito pro-inflamatório dos grupos analisados nas gerações F1 e F2 dos pais que consumiram HCD, foi observado um aumento na migração de neutrófilos das nadadeiras caudais lesionadas de larvas de zebrafish e menor capacidade de regeneração da nadadeira caudal. Esse efeito pode ser atribuído a exposição nutricional dos pais, que geraram um aumento na expressão de genes pro-inflamatórios como *il-6* e *tnf-α* e a partir disso podem causar o desenvolvimento de distúrbios metabólicos na prole, demonstrando que assim como acontece em outros animais no zebrafish também há existência da programação genética de pais expostos a HCD na prole (Maguire et al., 2020; Sertorio et al., 2022; César et al., 2022).

Assim, o presente estudo apresenta pela primeira vez na literatura os efeitos transgeracionais em diferentes parâmetros da obesidade induzida por uma dieta rica em

carboidratos em zebrafish. Em especial, destaca-se a modulação de genes associados à neuroinflamação e regulação epigenética provocada pela dieta. A comparação entre as influências paternas e maternas na prole revelou respostas distintas entre machos e fêmeas ao longo das gerações submetidas à dieta HCD. Os resultados apresentados possuem implicações importantes para melhor compreensão dos efeitos do excesso de carboidratos no metabolismo do zebrafish, assim como para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, que visem ele como modelo animal, destacando a relevância dos impactos transgeracionais da obesidade parental.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Rede Mineira de Bioterismo – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), sob o Edital RED 00009-14 and APQ-04517-22; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) sob o nº 308359/2019-4, e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob o nº 88881.117641/2016-01.

CONFLITO DE INTERESSES

Não temos nenhum interesse financeiro ou outro conflito potencial a declarar.

REFERÊNCIAS

- ABURTO-HERNÁNDEZ, Cynthia et al. Impaired Carbohydrate Metabolism and Excess of Lipid Accumulation in Offspring of Hyperandrogenic Mice. **Metabolites**, v. 12, n. 12, p. 1182, 2022. <https://doi.org/10.3390/metabo12121182>.
- AEBI, Hugo. Catalase in vitro. In: **Methods in enzymology**. Academic press. 121-126, 1984. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- ALI, Mohamed M. et al. DNA methylation profile of genes involved in inflammation and autoimmunity correlates with vascular function in morbidly obese adults. **Epigenetics**, v. 17, n. 1, p. 93-109, 2022. <https://doi.org/10.1080/15592294.2021.1876285>.
- ÁLVAREZ, Corazón; HERNÁNDEZ-CRUZ, Estefani; PEDRAZA-CHAVERRI, José. Oxidative stress in animal models of obesity caused by hypercaloric diets: A systematic review. **Life Sciences**, v. 331, p. 122019, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122019>.

ANWER, Hamza et al. Intergenerational effects of overfeeding on aversive learning in zebrafish (*Danio rerio*). **Ecology and Evolution**, v. 12, n. 10, p. e9423, 2022. <https://doi.org/10.1002/ece3.9423>.

BEERY, Annaliese; ZUCKER, Irving. Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 565-572, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.002>.

BEVILAQUA, Fernanda et al. A mixture of fipronil and fungicides induces alterations on behavioral and oxidative stress parameters in zebrafish. **Ecotoxicology**, v. 29, p. 140-147, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02146-7>.

BILLAH, Mustahsan et al. Effects of paternal overnutrition and interventions on future generations. **International Journal of Obesity**, v. 46, n. 5, p. 901-917, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-01042-7>.

BONDIA-PONS, Isabel; RYAN, Lisa; MARTINEZ, Alfredo. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 68, p. 701-711, 2012. <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0154-2>.

BUSEBEE, Bradley et al. Obesity: A review of pathophysiology and classification. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2023.05.026>.

BRADFORD, Marion. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

CAMILLERI-CARTER, Tara-Lyn et al. Transgenerational obesity and healthy aging in drosophila. **The Journals of Gerontology: Series A**, v. 74, n. 10, p. 1582-1589, 2019. <https://doi.org/10.1093/gerona/glz154>.

CAMILLERI, Tara-Lyn et al. Sex-specific transgenerational effects of diet on offspring life history and physiology. **BioRxiv**, p. 2022.05. 23.492998, 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.05.23.492998>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.06.011>.

CÉSAR, Helena et al. The influence of parental high-fat high-sugar diet on the gut-brain axis in male offspring. **Food Research International**, v. 160, p. 111706, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111706>.

CHANG, Eric; VARGHESE, Mita; SINGER, Kanakadurga. Gender and sex differences in adipose tissue. **Current diabetes reports**, v. 18, p. 1-10, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11892-018-1031-3>.

CHEN, Yan; YU, Chun-Yan; DENG, Wei-Min. The role of pro-inflammatory cytokines in lipid metabolism of metabolic diseases. **International reviews of immunology**, v. 38, n. 6, p. 249-266, 2019. <https://doi.org/10.1080/08830185.2019.1645138>.

DEARDEN, Laura; BOURET, Sebastien G.; OZANNE, Susan E. Sex and gender differences in developmental programming of metabolism. **Molecular metabolism**, v. 15, p. 8-19, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.04.007>.

DE LA ROCHA, Carmen et al. Cumulative metabolic and epigenetic effects of paternal and/or maternal supplementation with arachidonic acid across three consecutive generations in mice. **Cells**, v. 11, n. 6, p. 1057, 2022. <https://doi.org/10.3390/cells11061057>.

DUARTE DA SILVA, Kiara et al. Embriotoxic and Antioxidant Effects of *Cymbopogon citratus* Leaf Volatile Oil on Zebrafish. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 1-12, 2023. <https://doi.org/10.1007/s43450-023-00410-w>.

DUNFORD, Ashley; SANGSTER, Janice. Maternal and paternal periconceptional nutrition as an indicator of offspring metabolic syndrome risk in later life through epigenetic imprinting: a systematic review. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 11, p. S655-S662, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2017.04.021>.

EMBORSKI, Carmen; MIKHEYEV, Alexander S. Ancestral diet transgenerationally influences offspring in a parent-of-origin and sex-specific manner. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 374, n. 1768, p. 20180181, 2019. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0181>.

FOWLER, Adele et al. Zebrafish nutrition—moving forward. In: **The zebrafish in biomedical research**. Academic Press, p. 379-401, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00033-6>.

FRIED, Susan; LEE, Mi-Jeong; KARASTERGIOU, Kalypso. Shaping fat distribution: new insights into the molecular determinants of depot-and sex-dependent adipose biology. **Obesity**, v. 23, n. 7, p. 1345-1352, 2015. <https://doi.org/10.1002/oby.21133>.

GASMI, Amin et al. Obesity and insulin resistance: associations with chronic inflammation, genetic and epigenetic factors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 800-826, 2021. <https://doi.org/10.2174/0929867327666200824112056>.

GUO, Tianyi; LUO, Feijun; LIN, Qinlu. You are affected by what your parents eat: Diet, epigenetics, transgeneration and intergeneration. **Trends in Food Science & Technology**, v. 100, p. 248-261, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.021>.

HARASYMOWICZ, Natalia et al. Intergenerational transmission of diet-induced obesity, metabolic imbalance, and osteoarthritis in mice. **Arthritis & Rheumatology**, v. 72, n. 4, p. 632-644, 2020. <https://doi.org/10.1002/art.41147>.

HASEGAWA, Tomoya et al. Transient inflammatory response mediated by interleukin1 β is required for proper regeneration in zebrafish fin fold. **Elife**, v. 6, p. e22716, 2017. <https://doi.org/10.7554/eLife.22716>.

HUANG, Zhiqiang et al. The corepressors GPS2 and SMRT control enhancer and silencer remodeling via eRNA transcription during inflammatory activation of macrophages. **Molecular cell**, v. 81, n. 5, p. 953-968. e9, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.040>.

HUYPENS, Peter et al. Epigenetic germline inheritance of diet-induced obesity and insulin resistance. **Nature genetics**, v. 48, n. 5, p. 497-499, 2016. <https://doi.org/10.1038/ng.3527>.

JUNG, Byung; KANG, Sona. Epigenetic regulation of inflammatory factors in adipose tissue. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1866, n. 11, p. 159019, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.159019>.

KAUSHIK, Sadasivam; GEORGA, Ioanna; KOUMOUNDOUROS, Giorgos. Growth and body composition of zebrafish (*Danio rerio*) larvae fed a compound feed from first feeding onward: toward implications on nutrient requirements. **Zebrafish**, v. 8, n. 2, p. 87-95, 2011. <https://doi.org/10.1089/zeb.2011.0696>.

KAUTZKY-WILLER, Alexandra; HARREITER, Jürgen; PACINI, Giovanni. Sex and gender differences in risk, pathophysiology and complications of type 2 diabetes mellitus. **Endocrine reviews**, v. 37, n. 3, p. 278-316, 2016. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1137>.

KELLER, Maria et al. Genetics and Epigenetics in Obesity: What Do We Know so Far?. **Current Obesity Reports**, p. 1-20, 2023. <https://doi.org/10.1007/s13679-023-00526-z>.

KIM, Young et al. Obesity-induced DNA hypermethylation of the adiponectin gene mediates insulin resistance. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 7585, 2015. <https://doi.org/10.1038/ncomms8585>.

KIRSTEN, Karina et al. Acute and chronic stress differently alter the expression of cytokine and neuronal markers genes in zebrafish brain. **Stress**, v. 24, n. 1, p. 107-112, 2021. <https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1724947>.

KLAstrup, Line; BAK, Stine; NIELSEN, Anders. The influence of paternal diet on sncRNA-mediated epigenetic inheritance. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 294, p. 1-11, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00438-018-1492-8>.

LI, Xixi et al. Effects of Nutritionally Induced Obesity on Metabolic Pathways of Zebrafish. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 1850, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24031850>.

LINK, Jenny et al. Diet, gonadal sex, and sex chromosome complement influence white adipose tissue miRNA expression. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3484-1>.

MADESH, M.; BALASUBRAMANIAN, K. A. A microtiter plate assay for superoxide using MTT reduction method. **Indian journal of biochemistry and biophysics**, v. 34, p. 535-539, 1997.

MAGUIRE, Rachel et al. Associations between maternal obesity, gestational cytokine levels and child obesity in the NEST cohort. **Pediatric obesity**, v. 16, n. 7, p. e12763, 2021. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12763>

MAHMOUD, Abeer M. An overview of epigenetics in obesity: The role of lifestyle and therapeutic interventions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1341, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23031341>.

MARTINS DE CARVALHO, Luana et al. High-fat diet withdrawal modifies alcohol preference and transcription of dopaminergic and GABAergic receptors. **Journal of Neurogenetics**, v. 33, n. 1, p. 10-20, 2019. <https://doi.org/10.1080/01677063.2018.1526934>.

MARTINS, Moises et al. The Zebrafish (*Danio rerio*) as a Model for Studying Voluntary Physical Exercise and its Effects on Behavior and Metabolism. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 66, 2023. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2023220279>.

MAUGERI, Andrea et al. Curcumin modulates DNA methyltransferase functions in a cellular model of diabetic retinopathy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5407482>.

MCCARTHY, Margaret; NUGENT, Bridget M. At the frontier of epigenetics of brain sex differences. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 9, p. 221, 2015. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00221>.

MIERZIAK, Justyna et al. Influência dos componentes bioativos da dieta na regulação da expressão gênica. **Nutrientes**, v. 13, n. 11, pág. 3673, 2021. <https://doi.org/10.3390/nu13113673>.

OKA, Takehiko et al. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. **BMC physiology**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2010. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-10-21>.

O'NEILL, Margaret; NULSEN, John. Do obese women who present for infertility care get advice on weight loss management prior to referral?. **Fertility and Sterility**, v. 116, n. 3, p. e54, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.07.153>.

PAIVA, Isadora et al. Inhibition of Lrrk2 reduces ethanol preference in a model of acute exposure in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 100, p. 109885, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109885>.

PATEL, Priyadarshni et al. Role of macronutrient intake in the epigenetics of obesity. **Biochemical Society Transactions**, v. 50, n. 1, p. 487-497, 2022. <https://doi.org/10.1042/BST20211069>.

PATEL, Utsav N. et al. Assessment of neurotoxicity following single and co-exposure of cadmium and mercury in adult zebrafish: behavior alterations, oxidative stress, gene expression, and histological impairment in brain. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 232, n. 8, p. 340, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05274-1>.

PIETROBELLI, Angelo et al. Putting the Barker theory into the future: time to act on preventing pediatric obesity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 11, p. 1151, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111151>.

POLEDNIK, Katherine; KOCH, Abby; FELZIEN, Lisa. Effects of essential oil from *Thymus vulgaris* on viability and inflammation in zebrafish embryos. **Zebrafish**, v. 15, n. 4, p. 361-371, 2018. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1519>.

PONTIFEX, Matthew; VAUZOUR, David; MULLER, Michael. Sexual dimorphism in the context of nutrition and health. **Proceedings of the Nutrition Society**, p. 1-11, 2023. <https://doi.org/10.1017/S0029665123003610>.

POTABATTULA, Ramya et al. Male obesity effects on sperm and next-generation cord blood DNA methylation. **PloS one**, v. 14, n. 6, p. e0218615, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218615>.

ROBERTSON, Keith. DNA methylation and human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 8, p. 597-610, 2005. <https://doi.org/10.1038/nrg1655>.

ROBISON, Barrie et al. Sexual dimorphism in hepatic gene expression and the response to dietary carbohydrate manipulation in the zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 3, n. 2, p. 141-154, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2008.01.001>.

ROCHA, Filipa et al. Glucose overload in yolk has little effect on the long-term modulation of carbohydrate metabolic genes in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 7, p. 1139-1149, 2014. <https://doi.org/10.1242/jeb.095463>.

ROTONDO, John et al. Epigenetics of male infertility: the role of DNA methylation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 689624, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.689624>.

SAMUELSSON, Anne-Maj et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. **Hypertension** v. 51, n. 2 p. 383-392, 2018. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.101477>.

SANDOVICI, Ionel et al. Sex differences in the intergenerational inheritance of metabolic traits. **Nature Metabolism**, v. 4, n. 5, p. 507-523, 2022. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00570-4>.

SANTOS-MARCOS, Jose Antonio et al. Interaction between gut microbiota and sex hormones and their relation to sexual dimorphism in metabolic diseases. **Biology of sex Differences**, v. 14, n. 1, p. 4, 2023. <https://doi.org/10.1186/s13293-023-00490-2>.

SERTORIO, Marcela Nascimento et al. Parental high-fat high-sugar diet intake programming inflammatory and oxidative parameters of reproductive health in male offspring. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 867127, 2022. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.867127>.

SINGLEMAN, Corinna; HOLTZMAN, Nathalia G. Growth and maturation in the zebrafish, *Danio rerio*: a staging tool for teaching and research. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 396-406, 2014. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.0976>.

SOLOMON, Olivia et al. Meta-analysis of epigenome-wide association studies in newborns and children show widespread sex differences in blood DNA methylation. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 789, p. 108415, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2022.108415>.

STEPHENSON, Judith et al. Before the beginning: nutrition and lifestyle in the preconception period and its importance for future health. **The Lancet**, v. 391, n. 10132, p. 1830-1841, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30311-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30311-8).

SUN, L. et al. Effects of 17 α -ethinylestradiol on caudal fin regeneration in zebrafish larvae. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 10-22, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.275>.

SUKUR, Gozde; UYSAL, Fatma; CINAR, Ozgur. High-fat diet induced obesity alters Dnmt1 and Dnmt3a levels and global DNA methylation in mouse ovary and testis. **Histochemistry and Cell Biology**, p. 1-14, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00418-022-02173-2>.

TSANG, Benjamin et al. Breeding zebrafish: a review of different methods and a discussion on standardization. **Zebrafish**, v. 14, n. 6, p. 561-573, 2017. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1477>.

TÜRKÖĞLU, Medine et al. The potential effect mechanism of high-fat and high-carbohydrate diet-induced obesity on anxiety and offspring of zebrafish. **Eating and Weight Disorders-Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity**, p. 1-15, 2021. <https://doi.org/10.1007/s40519-021-01140-5>.

VANDESOMPELE, Jo et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. 1-12, 2002. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.

VIROTE, Bárbara do Carmo et al. Obesity induction in adult zebrafish leads to negative reproduction and offspring effects. **Reproduction**, v. 160, n. 6, p. 833-842, 2020. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0119>.

VIROTE, Bárbara do Carmo; VIANNA, André; MURGAS, Luis. Zebrafish as an Experimental Model for the Study of Obesity. **Zebrafish in Biomedical Research**, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88576>.

XAVIER, Miguel João et al. Transgenerational inheritance: how impacts to the epigenetic and genetic information of parents affect offspring health. **Human reproduction update**, v. 25, n. 5, p. 519-541, 2019. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz017>.

XIONG, Guanghua et al. Clethodim exposure induces developmental immunotoxicity and neurobehavioral dysfunction in zebrafish embryos. **Fish & shellfish immunology**, v. 86, p. 549-558, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.002>.

WALTERS, Kevin et al. Muscle degeneration and leukocyte infiltration caused by mutation of zebrafish Fad24. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 238, n. 1, p. 86-99, 2009. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21821>.

WU, Qi et al. Regulação dietética na saúde e na doença. **Transdução de Sinal e Terapia Direcionada**, v. 7, n. 1, pág. 252, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01104-w>.

YOU, Dongjoo et al. Dnmt3a is an epigenetic mediator of adipose insulin resistance. **Elife**, v. 6, p. e30766, 2017. <https://doi.org/10.7554/eLife.30766>.

YUSIPOV, Igor et al. Age-related DNA methylation changes are sex-specific: a comprehensive assessment. **Aging (Albany NY)**, v. 12, n. 23, p. 24057, 2020. <https://doi.org/10.18632/aging.202251>.

ZIZZARI, Z.; VAN STRAALLEN, N.; ELLERS, J. Transgenerational effects of nutrition are different for sons and daughters. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 29, n. 7, p. 1317-1327, 2016. <https://doi.org/10.1111/jeb.12872>.