



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

LETÍCIA ALVES TAVARES

**EFEITO DE UMA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE DESFECHOS  
METABÓLICOS E DO NEURODESENVOLVIMENTO EM DIFERENTES  
FASES DE DESENVOLVIMENTO DO PEIXE-ZEBRA**

Brasília - DF

2025

LETÍCIA ALVES TAVARES

**EFEITO DE UMA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE DESFECHOS  
METABÓLICOS E DO NEURODESENVOLVIMENTO EM DIFERENTES  
FASES DE DESENVOLVIMENTO DO PEIXE-ZEBRA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Patologia Molecular, na área de concentração de Bioquímica.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreza Fabro de Bem

Brasília – DF

2025

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus e à minha mãe santíssima, Nossa Senhora, por cada oportunidade concedida ao longo da minha trajetória. Pelo cuidado incondicional e por iluminar meus caminhos, mesmo nos momentos mais desafiadores. À minha família, meu bem mais precioso, sou imensamente grata pelos valores transmitidos, pelo apoio e incentivo em cada etapa da vida, sempre respeitando as minhas escolhas. Um exemplo de dedicação e perseverança, essencial na minha trajetória, acreditando e me impulsionando a ser melhor e seguir em frente.

Expresso minha gratidão à minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andreza Fabro de Bem, uma verdadeira inspiração como mulher e cientista. Sua generosidade em compartilhar seus conhecimentos, seu tempo e sua paciência foram fundamentais para meu crescimento acadêmico. Também sou imensamente grata ao Prof. Dr. Jair Trapé Goulart e à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Paula Maria Quaglio Bellozi. A confiança que depositaram em mim, os conselhos valiosos e os constantes incentivos ao longo da minha jornada acadêmica foram essenciais para meu progresso. Agradeço por estarem presentes em cada fase do meu trabalho, contribuindo de forma significativa.

Aos colegas do Lab de Bem, minha gratidão pelo apoio constante, pela disponibilidade em colaborar durante os experimentos e pela troca de conhecimentos que sempre enriquecem nosso trabalho. Agradeço ainda pelo ambiente de parceria, cumplicidade e leveza que tornaram cada desafio mais tranquilo e cada conquista mais significativa. Um agradecimento especial à minha querida amiga Whitney Ribeiro Santos, cuja amizade tem sido um pilar essencial desde a graduação. Não posso nem descrever o quanto sou grata por tudo o que compartilhamos: desafios que sempre enfrentamos juntas, incentivo e palavras de conforto, momentos de fé e inúmeras conquistas. Obrigada por estar ao meu lado, por me apoiar e por celebrar comigo cada conquista. Que possamos seguir juntas, compartilhando essa amizade maravilhosa e celebrando mais vitórias pela frente.

Por fim, agradeço ao CNPq e FAPDF pelo apoio financeiro e à Universidade de Brasília, fundamentais para realização deste trabalho e desenvolvimento da minha pesquisa, oportunidades de crescimento e aprendizado ao longo dessa jornada.

## RESUMO

Dietas ricas em lipídios e desbalanceadas alteram o metabolismo e a função cerebral, comprometendo o neurodesenvolvimento, a saúde e o comportamento ao longo da vida. Essas dietas podem levar ao acúmulo de lipídios, resistência à insulina e inflamação, comprometendo a plasticidade neuronal e o equilíbrio neuroquímico. Para investigar o impacto da dieta hiperlipídica (DH) sobre o neurodesenvolvimento e o metabolismo, larvas de peixe-zebra foram alimentadas com dieta controle (DC) ou DH em dois protocolos distintos: (i) de 21 até 36 dias pós-fertilização (dpf), correspondendo à fase larval; e (ii) de 21 dpf até 5-6 meses pós-fertilização (mpf), caracterizando a fase adulta juvenil. Ao final do protocolo dietético, foram avaliados parâmetros morfometabólicos, comportamentais e bioenergéticos. Na fase larval, a DH aumentou significativamente a taxa de sobrevivência ( $p < 0,0001$ ) e a incorporação lipídica, avaliada por coloração com Oil Red O ( $p < 0,0001$ ), em comparação ao grupo DC. No teste de tanque novo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, enquanto no teste de campo aberto, os animais do grupo DH apresentaram uma tendência de menor exploração do centro da arena ( $p = 0,0772$ ). Na fase adulta juvenil, a DH promoveu aumento significativo do peso, comprimento corporal e índice de massa corporal (IMC) ao final de 5-6 mpf. Os níveis de glicose sanguínea mostraram uma tendência de elevação no grupo DH ( $p = 0,0578$ ). A taxa de sobrevivência não diferiu entre os grupos. No teste de tanque novo, a DH induziu aumento significativo da locomoção, evidenciado pela maior distância total percorrida ( $p < 0,01$ ), aumento do ângulo de giro absoluto ( $p < 0,0001$ ) e do movimento errático ( $p < 0,0001$ ). Além disso, os animais DH apresentaram menor exploração da área superior do tanque, resultando em uma redução significativa do índice de exploração ( $p < 0,001$ ), sugerindo comportamento tipo-ansioso. A avaliação do consumo de oxigênio encefálico, realizada por respirometria de alta resolução, não revelou diferenças entre os grupos. Entretanto, a DH reduziu significativamente a atividade da acetilcolinesterase (AChE) ( $p < 0,01$ ), sem impacto na atividade das enzimas lactato desidrogenase (LDH) e glutatona S-transferase (GST). Concluímos que a DH impactou o desenvolvimento morfometabólico e o comportamento de larvas e adultos juvenis de peixe-zebra. Esses achados sugerem efeitos prejudiciais a longo prazo no metabolismo e no comportamento, reforçando a relevância do modelo do

peixe-zebra para estudos sobre o impacto de dietas desbalanceadas no neurodesenvolvimento.

**Palavras-chave:** Peixe-zebra, dieta hiperlipídica, metabolismo, neurodesenvolvimento, comportamento.

## ABSTRACT

High-fat and unbalanced diets alter metabolism and brain function, compromising neurodevelopment, health, and behavior throughout life. These diets can lead to lipid accumulation, insulin resistance, and inflammation, affecting neuronal plasticity and neurochemical balance. To investigate the impact of a high-fat diet (HFD) on neurodevelopment and metabolism, zebrafish larvae were fed either a control diet (CD) or an HFD in two distinct protocols: (i) from 21 to 36 days post-fertilization (dpf), corresponding to the larval phase; and (ii) from 21 dpf to 5–6 months post-fertilization (mpf), characterizing the juvenile-adult phase. At the end of the dietary protocol, morphometabolic, behavioral, and bioenergetic parameters were assessed. In the larval phase, HFD significantly increased survival rate ( $p < 0.0001$ ) and lipid incorporation, evaluated by Oil Red O staining ( $p < 0.0001$ ), compared to the CD group. In the novel tank test, no significant differences were observed between groups, while in the open field test, the HFD group exhibited a trend toward reduced center exploration ( $p = 0.0772$ ). In the juvenile-adult phase, HFD significantly increased body weight, body length, and body mass index (BMI) at the end of 5–6 mpf. Blood glucose levels showed a trend toward elevation in the HFD group ( $p = 0.0578$ ). Survival rate did not differ between groups. In the novel tank test, HFD significantly increased locomotion, as evidenced by greater total distance traveled ( $p < 0.01$ ), increased absolute turning angle ( $p < 0.0001$ ), and enhanced erratic movement ( $p < 0.0001$ ). Additionally, HFD animals exhibited lower exploration of the upper tank area, resulting in a significant reduction in the exploration index ( $p < 0.001$ ), suggesting anxiety-like behavior. Brain oxygen consumption, assessed by high-resolution respirometry, revealed no differences between groups. However, HFD significantly reduced acetylcholinesterase (AChE) activity ( $p < 0.01$ ), without affecting the activity of lactate dehydrogenase (LDH) and glutathione S-transferase (GST). In conclusion, HFD impacted the morphometabolic development and behavior of zebrafish larvae and juvenile-adults. These findings suggest long-term detrimental effects on metabolism and behavior, reinforcing the relevance of the zebrafish model for studying the impact of unbalanced diets on neurodevelopment.

**Keywords:** Zebrafish, hyperlipidic diet, metabolism, neurodevelopment, behavior.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Obesidade infantil.....	14
<b>Figura 2:</b> Produção de energia e metabolismo mitocondrial.....	20
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo do protocolo experimental.....	26
<b>Figura 4:</b> Análises morfometabólicas e sobrevivência larval.....	34
<b>Figura 5:</b> Análise comportamental em larvas.....	35
<b>Figura 6:</b> Análises morfometabólicas e sobrevivência de adultos juvenis.....	36
<b>Figura 7:</b> Análise comportamental em adultos juvenis .....	37
<b>Figura 8:</b> Análise bioenergética mitocondrial do encéfalo em adultos juvenis.....	38
<b>Figura 9:</b> Avaliação da atividade enzimática da AChE, LDH e GST no encéfalo de adultos juvenis .....	39

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Composição de nutrientes das dietas controle (DC) e hiperlipídica (DH) .... 26

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Antimicina A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira hematoencefálica
<i>BSA fat-free</i>	Albumina sérica bovina livre de ácidos graxos – <i>Bovine Serum Albumin fat-free</i>
CCCP	Carbonila 3-clorofenil-hidrazona
CDNB	Cloro 2-4 dinitrobenzeno
DC	Dieta controle
DH	Dieta hiperlipídica
dpf	dias pós fertilização
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETS	Sistema de transporte de elétrons – <i>Electron transport system</i>
GSH	Glutationa
GST	Glutationa S-transferase
IMC	Índice de massa corporal
LDH	Lactato desidrogenase
mpf	meses pós fertilização
MR	Meio de reação
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidase

NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo redutase
OMY	Oligomicina
ORO	Óleo vermelho O – <i>Oil red O</i>
PFA	Paraformaldeído
PM	Piruvato e malato
RAR	Respirometria de alta resolução
ROT	Rotenona
SNC	Sistema nervoso central
S	Succinato
EPM	Erro padrão da média

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 <i>Impacto de dietas desbalanceadas ao longo da vida.....</i>	13
1.2 <i>Impacto da alta ingestão de gordura no neurodesenvolvimento.....</i>	16
1.3 <i>Peixe-zebra como modelo experimental para os estudos de neurodesenvolvimento .....</i>	18
1.4 <i>Bioenergética cerebral .....</i>	19
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>22</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
3.1 <i>Objetivo Geral .....</i>	23
3.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	23
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
4.1 <i>Animais e protocolo experimental .....</i>	24
4.2 <i>Análises morfometabólicas .....</i>	26
4.2.1 <i>Larvas.....</i>	26
4.2.1.1 <i>Comprimento corporal.....</i>	26
4.2.1.2 <i>Marcação de lipídios com Oil Red O .....</i>	27
4.2.2 <i>Adultos juvenis .....</i>	27
4.2.2.1 <i>Medidas morfométricas .....</i>	27
4.2.2.2 <i>Determinação dos níveis de glicose sanguínea .....</i>	27
4.3 <i>Análises comportamentais .....</i>	28
4.3.1 <i>Larvas.....</i>	28
4.3.1.1 <i>Teste de tanque novo e campo aberto .....</i>	28
4.3.2 <i>Adultos juvenis .....</i>	28
4.3.2.1 <i>Teste de tanque novo .....</i>	28
4.4 <i>Análise Bioenergética.....</i>	29
4.5 <i>Análise Bioquímica.....</i>	30
4.5.1 <i>Preparo das amostras para determinação de proteínas e atividade enzimática .....</i>	30
4.5.2 <i>Determinação da atividade da AChE.....</i>	30
4.5.3 <i>Determinação da atividade da LDH.....</i>	31
4.5.4 <i>Determinação da atividade da GST.....</i>	31
4.6 <i>Análise estatística .....</i>	31

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
5.1 <i>Impacto da DH no comprimento corporal das larvas de peixe-zebra .....</i>	33
5.2 <i>O efeito da DH na sobrevivência larval e acúmulo de lipídios.....</i>	33
5.3 <i>A DH não causou alterações no comportamento larval.....</i>	34
5.4 <i>Efeitos da DH sobre parâmetros morfometabólicos e sobrevivência na fase adulto-juvenil.....</i>	35
5.5 <i>Efeito da DH ao longo do desenvolvimento sobre o comportamento exploratório e tipo-ansioso.....</i>	36
5.6 <i>Efeito da DH durante o desenvolvimento sobre o consumo de oxigênio no encéfalo.....</i>	37
5.7 <i>Efeito da DH durante o desenvolvimento sobre a atividade enzimática de AChE, LDH e GST no encéfalo.....</i>	38
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>

## 1. INTRODUÇÃO

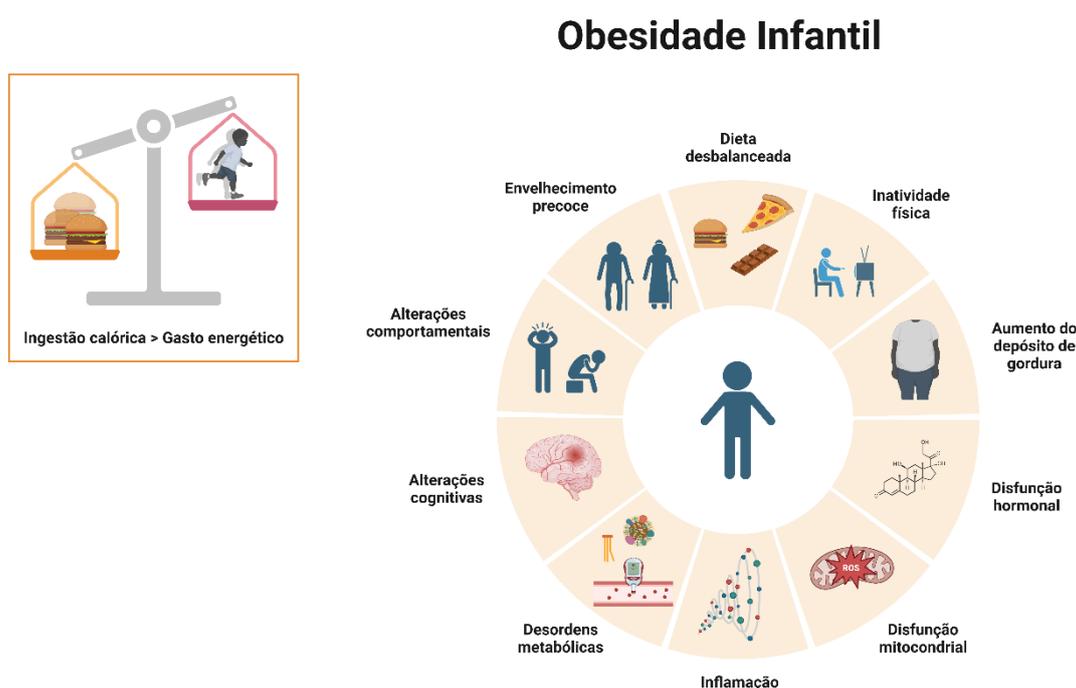
### *1.1 Impacto de dietas desbalanceadas ao longo da vida*

Dietas desbalanceadas, especialmente as ricas em lipídios, têm sido associadas a alterações significativas no sistema metabólico e na função cerebral, afetando os indivíduos desde o seu desenvolvimento inicial (YANG et al., 2019). Esse período inicial da vida é particularmente vulnerável à reprogramação metabólica, fortemente influenciada por fatores ambientais. A nutrição tem impacto importante nesse processo, atuando na programação de mecanismos centrais e periféricos responsáveis pela ingestão alimentar e metabolismo, o que pode aumentar a predisposição ao sobrepeso e à obesidade ao longo da vida (CAI et al., 2015; LEIGH; MORRIS, 2020; PEREIRA; OLIVEIRA, 2021).

Tanto o sobrepeso quanto a obesidade são caracterizados pelo depósito excessivo de gordura corporal, decorrente do desequilíbrio entre a ingestão calórica da dieta e o gasto energético. A obesidade é considerada uma doença crônica, complexa e multifatorial, capaz de englobar diferentes dimensões: biológica, social, cultural, comportamental, política, além de ser considerada um problema de saúde pública (MS, 2021a; WHO, 2024). Em relação a obesidade infantil, o cenário é de extrema preocupação. De acordo com o Atlas Mundial da Obesidade 2024, publicado pela Federação Mundial de Obesidade, estima-se que, se as tendências atuais continuarem, aproximadamente 770 milhões de crianças e adolescentes em todo o mundo terão sobrepeso ou obesidade até 2035. Um aumento expressivo de 22% em 2020 para mais de 39% até 2035. No Brasil, cerca de 50% das crianças e adolescentes entre 5 e 19 anos poderão ser afetados, representando um aumento de 1,8% no mesmo período (WORLD OBESITY, 2024).

Em países de baixa e média renda as crianças costumam enfrentar maior vulnerabilidade à nutrição durante os primeiros anos de vida, sendo expostos a alimentos mais baratos, de baixa qualidade nutricional, ricos principalmente em gordura, açúcar e sal. A introdução precoce de alimentos ultraprocessados, ricos em lipídios e calorias são capazes de alterar os mecanismos do organismo responsáveis pelo controle da saciedade e do gasto energético, influenciando assim o consumo descontrolado de alimentos. Tais padrões alimentares aliados à redução da prática de atividade física contribuem para o aumento da obesidade infantil (MS, 2021b; WHO, 2024). Crianças com sobrepeso e

obesidade têm maior probabilidade de permanecerem obesas na vida adulta, enfrentando maior risco de desenvolver doenças crônicas e prejuízos cognitivos em idade precoce. O aumento do índice de massa corporal (IMC) começa por volta dos 4 a 5 anos de idade, e estudos mostram que crianças com sobrepeso nessa faixa etária têm uma probabilidade 4 vezes maior de se tornarem obesas ao longo da vida. Essas associações estão diretamente relacionadas a idade inicial e à duração da exposição a dietas obesogênicas (CUNNINGHAM; KRAMER; NARAYAN, 2014; WHO, 2020).



**Figura 1: Obesidade infantil.** Visão abrangente dos principais fatores de risco e consequências da obesidade em crianças. Diversas condições estão associadas, como o desbalanço energético em etapas críticas do desenvolvimento, acúmulo excessivo de gordura, disfunções metabólicas, cognitivas e comportamentais que podem impactar a saúde ao longo da vida, contribuindo para o envelhecimento precoce. Figura criada no BioRender. De bem, L. (2025) <https://BioRender.com/r69o257>.

A obesidade infantil é relacionada a diversas complicações, que incluem distúrbios no metabolismo de lipídios, hipertensão arterial, resistência à insulina, intolerância à glicose, diabetes mellitus tipo 2, doença cardiovascular aterosclerótica de início precoce (SEPÚLVEDA et al., 2020; WEIHRAUCH-BLÜHER; WIEGAND, 2018) e esteatose hepática (YURTDAŞ et al., 2022). Além de desfechos periféricos, a ingestão de dietas desbalanceadas durante a infância e a consequente obesidade exercem um impacto significativo em diversas funções cerebrais, principalmente sobre os próprios mecanismos geradores da obesidade, impactando populações específicas de neurônios

localizados no hipotálamo que regulam o balanço energético. O hipotálamo é uma região cerebral extremamente importante na manutenção da homeostase, associado ao controle do apetite, gasto energético e regulação hormonal. Neurônios que estimulam ou inibem o apetite, possuem papéis complementares na modulação desses processos. As dietas ricas em gorduras e açúcares são capazes de alterar a plasticidade sináptica, os níveis de inflamação e a sensibilidade dos neurônios hipotalâmicos a sinais periféricos (hormônios e metabólitos) (VAN DE SANDE-LEE; VELLOSO, 2012; WILLIAMS, 2012). A leptina é um hormônio secretado pelos adipócitos brancos e sua descoberta trouxe a compreensão da comunicação do tecido adiposo com outros sistemas do corpo, especialmente com o sistema nervoso central (SNC). Esse hormônio é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e se liga a neurônios hipotalâmicos, controlando o apetite e o gasto energético. Durante períodos de jejum, dieta de baixa caloria ou diabetes tipo 1 descontrolada, os níveis de leptina diminuem, estimulando o apetite e reduzindo o gasto energético. Essas adaptações têm como objetivo restaurar as reservas de gordura, permitindo que os níveis de leptina retornem ao nível basal. Por outro lado, o aumento da adiposidade eleva os níveis de leptina circulante. Em condições normais, esse aumento ativa receptores, promovendo a redução da ingestão calórica e o aumento do gasto energético. No entanto, em indivíduos com sobrepeso ou obesidade, os altos níveis de leptina resultam em diminuição da sensibilidade dos receptores, caracterizando um quadro de resistência a leptina (DORINA YLLI, 2022; VAN DE SANDE-LEE; VELLOSO, 2012). Essa resistência, junto a alterações na BHE, comprometem a capacidade da leptina em regular o balanço energético, favorecimento do ganho de peso e desenvolvimento da obesidade. Estas alterações desencadeiam um ciclo vicioso: a disfunção hipotalâmica resulta em um desequilíbrio no controle do apetite e gasto energético, favorecendo o ganho de peso que agrava alterações neurais (VAN DE SANDE-LEE; VELLOSO, 2012).

Além de prejuízos na sinalização de leptina, a obesidade pode então levar a outras alterações anatômicas e fisiológicas no hipotálamo, como a sinalização inflamatória, gliose e estresse do retículo endoplasmático (PAN; MYERS, 2018). Estudos demonstraram que em roedores a inflamação hipotalâmica causada por dieta rica em gordura ocorre rapidamente, dentro de 24h, com a ativação de vias inflamatórias e aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias. Esse processo envolve a expansão e proliferação de células gliais, como micróglia e astrócitos, que assumem conformações

reativas e caracterizam a gliose (ENGEL; VELLOSO, 2022; SEWAYBRICKER et al., 2023).

Nos últimos anos, tem-se observado uma redução na duração e qualidade de sono em crianças e adolescentes em decorrência de alterações neuroendócrinas associadas ao distúrbio de apetite, incluindo os sistemas melanocortina, grelina, orexina, leptina e insulina. O sono insuficiente é capaz de prejudicar o pensamento abstrato, a memória e os níveis de energia, além de comprometer o crescimento e desenvolvimento infantil (LIU et al., 2022). Um estudo de coorte mostrou que a duração insuficiente do sono na infância, menos de 10 horas em crianças de 2 a 6 anos, está associada a um risco 2,9 vezes maior de obesidade, além de estar relacionado a um maior IMC na vida adulta (LANDHUIS et al., 2008; TOUCHETTE et al., 2008). A prevalência de problemas de saúde mental em crianças com obesidade também é descrita. A depressão pode ser associada ao sedentarismo, menor adesão ao autocuidado, maior ingestão alimentar e privação de sono, desregulados também pelos hormônios do apetite. A ansiedade por sua vez leva a comportamentos impulsivos e alimentação descontrolada, com a necessidade de recompensas alimentares imediatas, mesmo sem fome (STAVROU et al., 2016). Na pré-escola as crianças já associam estereótipos negativos a colegas que apresentam corpos maiores. No ensino fundamental, alunos que apresentam sobrepeso ou obesidade sofrem com bullying e costumam receber menos apoio por parte dos colegas. O bullying relacionado ao peso é um fator preocupante, que também influencia o comportamento e as emoções (PONT et al., 2017).

### ***1.2 Impacto da alta ingestão de gordura no neurodesenvolvimento***

Do ponto de vista da disfunção metabólica-neurocognitiva, a obesidade e os distúrbios metabólicos induzidos por ela podem impactar a função cerebral e a performance cognitiva (WANG et al., 2018). Esse efeito é relevante para o neurodesenvolvimento, uma fase crítica que estabelece a estrutura e a funcionalidade do sistema nervoso, influenciando a saúde e o comportamento ao longo da vida. Durante o desenvolvimento inicial, o cérebro de bebês apresenta alta plasticidade, além disso, processos de poda e sinaptogênese são essenciais para moldar os circuitos neurais e promover maturação cerebral, concluída apenas na adolescência (NELSON; GABARD-DURNAM, 2020). As células gliais são fundamentais nesse processo, pois modulam a formação e a poda sináptica, o revestimento neurovascular e a fagocitose. Essas células também atuam como sensores metabólicos que integram sinais para adaptar o cérebro ao

ambiente (ABBINK et al., 2019; GARCÍA-CÁCERES et al., 2019). O aumento da plasticidade nesse período é influenciado por experiências de vida, vulneráveis a estímulos negativos e que podem moldar as redes neurais (NELSON; GABARD-DURNAM, 2020). Alterações no equilíbrio metabólico podem levar ao acúmulo de lipídios, resistência à insulina e respostas inflamatórias que impactam o desenvolvimento cerebral, comprometendo funções essenciais como a plasticidade neuronal e o equilíbrio neuroquímico, essenciais para o comportamento e o aprendizado (COLLELUORI et al., 2022).

O metabolismo lipídico nos neurônios é crucial para diversas funções celulares, incluindo a formação de membranas, por componentes estruturais essenciais como fosfolipídios, esfingolipídios e colesterol. Além disso, os lipídios atuam em vias de sinalização intracelular, regulando processos como o crescimento dos axônios e plasticidade sináptica. Embora os neurônios não sejam capazes de armazenar grandes quantidade de lipídios, como os adipócitos, eles possuem capacidade limitada de armazenar gotículas lipídicas. Os astrócitos captam ácidos graxos e lipídios circulantes do ambiente extracelular, armazenando-os em gotículas lipídicas. Essa reserva lipídica é essencial para sustentar a função neuronal em condições de alta demanda energética ou estresse metabólico. Disfunções no metabolismo lipídico podem comprometer a fluidez e a integridade das membranas celulares, prejudicando a condução de impulsos nervosos e a comunicação sináptica. O acúmulo de lipídios pode desencadear estresse oxidativo, inflamação e apoptose celular, contribuindo para déficits cognitivos, e a longo prazo, doenças neurodegenerativas (ESTES et al., 2021; TRACEY et al., 2018).

A revisão de Farruggia e Small (FARRUGGIA; SMALL, 2019) revelou que o acúmulo de lipídios, independente da disfunção metabólica, traz prejuízos à cognição ao longo da vida, impactando habilidades como atenção, inteligência, memória, flexibilidade cognitiva, velocidade de processamento e funções executivas. Estudos clínicos têm evidenciado o impacto do sobrepeso e da obesidade na função cognitiva infantil. Um deles acompanhou por 31 anos a correlação entre fatores de risco cardiovascular, obesidade infantil e comprometimento cognitivo ao longo da vida. Parâmetros como pressão arterial sistólica, colesterol total e peso corporal foram associados a piora cognitiva durante a meia-idade, considerando avaliações da memória episódica, aprendizagem associativa e atenção sustentada (HAKALA et al., 2021).

O hipocampo tem sido bem descrito como uma estrutura sensível à ingestão calórica elevada, desempenhando um papel crítico no processamento cognitivo e das emoções. A neurogênese e a plasticidade sináptica são fundamentais para a regulação dessas funções (ZHUANG et al., 2022). Um estudo de nosso grupo de pesquisa demonstrou que a exposição a uma dieta rica em gordura no início da vida prejudica a bioenergética mitocondrial em tecidos metabolicamente ativos e no hipocampo impactando o processo de aprendizado e memória de camundongos juvenis. (VILELA et al., 2023). Além disso, Yang e colaboradores (YANG et al., 2023) observaram que camundongos alimentados com dieta rica em gordura de forma crônica, apresentaram maior sensibilidade à insulina, comportamento semelhante à ansiedade e depressão, além da neuroplasticidade hipocampal anormal.

### ***1.3 Peixe-zebra como modelo experimental para os estudos de neurodesenvolvimento***

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um modelo animal amplamente utilizado em pesquisas científicas devido à sua alta homologia genética (cerca de 70%), anatômica e fisiológica com humanos, além de apresentar manejo simples e de baixo custo. Esse peixe tropical de água doce atinge cerca de 5 cm na fase adulta e alcança a maturidade sexual entre 3 e 6 meses. Com fecundação externa, as fêmeas liberam centenas de ovos por ciclo, e seus embriões, transparentes e de rápido desenvolvimento, permitem observação em tempo real de processos de neurogênese e formação de circuitos neurais (GHADDAR et al., 2020).

A neurogênese é um processo complexo e regulado que resulta na produção de novos neurônios, que por sua vez passam por etapas de diferenciação, migração e interação funcional em redes neurais (DORSEMANS et al., 2017; LUZIO et al., 2021). Essas etapas são coordenadas para produzir diversos tipos de células neuronais e gliais que vão formar o SNC maduro (SCHMIDT; STRÄHLE; SCHOLPP, 2013). A neurogênese é iniciada aproximadamente 10 horas após a fertilização e leva de 48 a 72 horas para chegar no estágio larval, permitindo estudos em todas as fases da vida (KIMMEL et al., 1995). Na fase adulta, o peixe-zebra apresenta alta neurogênese, além da capacidade de regeneração neuronal, exibindo nichos neurogênicos importantes por todo o cérebro. Essa capacidade neurogênica da espécie relaciona-se a manutenção realizada principalmente por células-tronco neurais (células gliais radiais) e progenitoras (neuroblastos) (GHADDAR et al., 2020; LUZIO et al., 2021). O desenvolvimento externo das larvas torna o SNC do peixe-zebra mais acessível à manipulação experimental e ideal

para estudar a neurogênese. Dessa forma, é possível combinar genética, embriologia e técnicas ópticas avançadas, como a microscopia de alta velocidade e optogenética, permitindo a análise detalhada e em tempo real dos processos neurobiológicos (SCHMIDT; STRÄHLE; SCHOLPP, 2013).

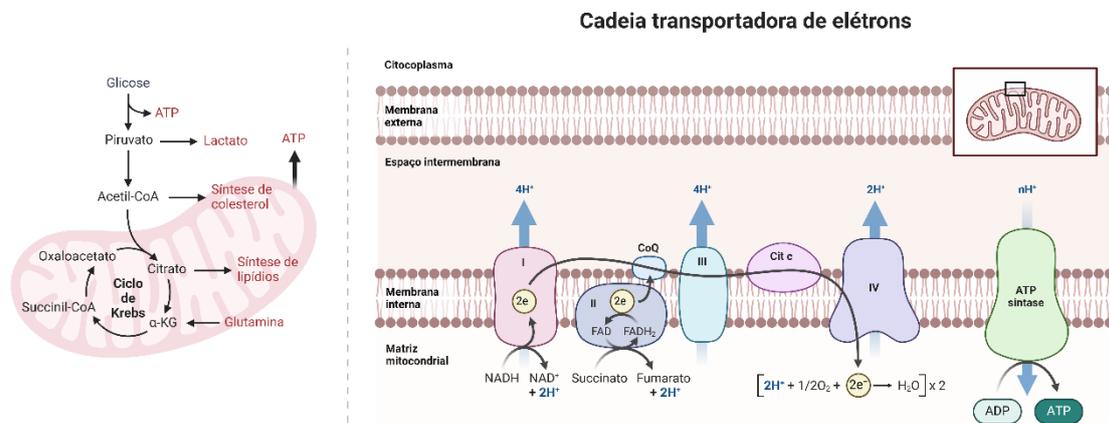
Dietas desbalanceadas e distúrbios metabólicos, como a obesidade, podem afetar a neurogênese no hipotálamo e a plasticidade sináptica do hipocampo em desenvolvimento (fase embrionária) e na fase adulta, resultando em alterações cognitivas. Ghaddar e colaboradores desenvolveram um modelo de superalimentação em peixes-zebra adultos (3 a 4 meses), que resultou em peso e IMC elevados, hiperglicemia e esteatose hepática. Esses animais também apresentaram aumento no vazamento da BHE, neuroinflamação, estresse oxidativo e uma redução significativa na neurogênese em vários nichos cerebrais, incluindo áreas como o telencéfalo ventral, área-óptica, hipotálamo e região periventricular do núcleo pré-tectal. A função cognitiva dos peixes foi prejudicada, diante de testes comportamentais e alterações na expressão de genes relacionados à atividade neuronal, estresse antioxidante e integridade da BHE. Tais achados demonstram o impacto metabólico na plasticidade cerebral e na cognição (GHADDAR et al., 2020).

#### ***1.4 Bioenergética cerebral***

A reprogramação metabólica é o processo em que as células alteram seus caminhos metabólicos para atender novas demandas energéticas no processo de crescimento, diferenciação e adaptação a mudanças no ambiente. Esse processo é essencial para a diferenciação neuronal, garantindo uma produção mais eficiente de energia (SON et al., 2024). O cérebro consome cerca de 20% da energia do corpo, mesmo representando apenas 2% do peso corporal. Os neurônios têm como fonte de energia principal a glicose, oxidada na glicólise e, em seguida, passa pelo ciclo de Krebs, associado à fosforilação oxidativa para produção de ATP (AGOSTINI et al., 2016). Além da utilização da glicose como principal fonte de energia, os neurônios também podem recorrer aos lipídios como alternativa metabólica. Os ácidos graxos, ao serem transportados para as mitocôndrias, são metabolizados por meio da  $\beta$ -oxidação, gerando acetil-CoA, esse composto por sua vez ingressa no ciclo de Krebs para produção de ATP (TRACEY et al., 2018).

Durante a reprogramação metabólica, as células progenitoras neurais, dependentes da glicose anaeróbica, possuem mitocôndrias imaturas com estruturas

globulares. À medida que essas células se diferenciam, as mitocôndrias se alongam, tornando-se maduras, com estruturas tubulares e ricas em cristas. Essa mudança bioenergética resulta em uma adaptação que permite aos neurônios utilizar a fosforilação oxidativa como principal fonte de energia (SON et al., 2024; ZHENG et al., 2016).



**Figura 2: Produção de energia e metabolismo mitocondrial.** O piruvato vindo da glicólise e ácidos graxos são convertidos em acetil-CoA, que entra no ciclo de Krebs (ocorre na matriz mitocondrial) e gera coenzimas reduzidas, NADH e FADH<sub>2</sub>, além de succinato. Esses produtos alimentam a cadeia transportadora de elétrons (ocorre nas cristas mitocondriais) e transferem seus elétrons para os complexos I e II, enquanto o succinato também contribui para essa transferência. Os elétrons são transportados através dos complexos I, II, III e IV, e as reações de oxirredução ao longo desse processo resultam na redução do oxigênio (O<sub>2</sub>) à água, mantendo o potencial de membrana mitocondrial. Nesse processo também ocorre o bombeamento de prótons para o espaço intermembrana e formação do gradiente de prótons, que retornam à matriz mitocondrial através da ATP sintase e então o ADP é fosforilado para formar ATP. Figura criada no BioRender. De bem, L. (2025) <https://BioRender.com/r69o257>.

A utilização das mitocôndrias para a produção de energia varia de acordo com o tipo celular. Em células com alta demanda energética, as mitocôndrias geram ATP com maior eficiência pela fosforilação oxidativa, capaz de criar um gradiente de prótons que gera o potencial de membrana mitocondrial utilizando oxigênio para a síntese de ATP (SON; HAN, 2018).

A ingestão precoce de dietas desbalanceadas, especialmente durante etapas críticas do neurodesenvolvimento, emerge como um fator-chave na reprogramação metabólica de células neurais. Esse desbalanço afeta diretamente a bioenergética celular, interferindo nos processos de neurogênese e na funcionalidade neuronal. Como consequência, observamos alterações comportamentais significativas, particularmente na cognição, aprendizado e memória, reforçando a ideia de que a qualidade nutricional durante os primeiros estágios de vida é determinante para a saúde cerebral a longo prazo. Além de intervenções precoces, é fundamental aprofundar o entendimento dos mecanismos moleculares que desencadeiam essas disfunções, possibilitando o

desenvolvimento de estratégias mais direcionadas para prevenir e tratar os impactos de padrões alimentares inadequados no desenvolvimento neurológico e no desempenho cognitivo.

## 2. JUSTIFICATIVA

O aumento alarmante no número de crianças com sobrepeso e obesidade em todo o mundo é um dos maiores desafios de saúde pública da atualidade (WORLD OBESITY, 2024). Dados recentes indicam que a exposição precoce a dietas desbalanceadas, ricas em açúcares e gorduras, está contribuindo para mudanças metabólicas persistentes que não apenas afetam a infância, mas também perpetuam problemas de saúde ao longo da vida adulta (YANG et al., 2019). Essas alterações impactam negativamente o desempenho cognitivo em fases críticas do desenvolvimento, particularmente os processos de aprendizado e memória, comprometendo o potencial das crianças e aumentando o risco de desfechos adversos como dificuldades escolares, redução de qualidade de vida e maior vulnerabilidade a doenças metabólicas e neurodegenerativas no futuro (HAKALA et al., 2021).

As implicações sociais e econômicas desse cenário são profundas. Crianças com obesidade enfrentam não apenas desafios de saúde imediatos, mas também estigmatização social e maior risco de complicações metabólicas e cognitivas a longo prazo. Essas condições impactam significativamente a sociedade, aumentando os custos de saúde e comprometendo a força de trabalho futura. Diante disso, é fundamental investigar os mecanismos moleculares que sustentam essas disfunções, especialmente aqueles relacionados à reprogramação metabólica e às alterações na bioenergética cerebral. A desregulação no metabolismo lipídico e a disfunção mitocondrial podem prejudicar a produção de ATP, essencial para o funcionamento neuronal, comprometendo a atividade enzimática cerebral, e consequentemente o comportamento. Entender como esses processos ocorrem permitirá identificar janelas de oportunidade para intervenções preventivas e terapêuticas. Os avanços nesse campo têm o potencial de informar políticas públicas e estratégias de saúde coletiva, enfatizando a importância da nutrição adequada como um componente essencial do desenvolvimento saudável e da prevenção de doenças ao longo da vida.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 *Objetivo Geral*

Avaliar o efeito de uma dieta hiperlipídica em diferentes fases de desenvolvimento do peixe-zebra sobre desfechos metabólicos e do neurodesenvolvimento.

#### 3.2 *Objetivos específicos*

Avaliar o impacto da DH em peixes-zebra em diferentes fases da vida, com foco em parâmetros:

- **Morfometabólicos:** peso, comprimento corporal, IMC, adiposidade e níveis de glicose sanguínea;
- **Comportamentais:** avaliar indicadores de comportamento tipo-ansioso, locomoção e exploração animal;
- **Bioenergéticos:** com ênfase na função mitocondrial e produção de ATP, a partir do consumo de oxigênio por respirometria de alta resolução;
- **Bioquímicos:** avaliação da atividade enzimática cerebral.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais e protocolo experimental

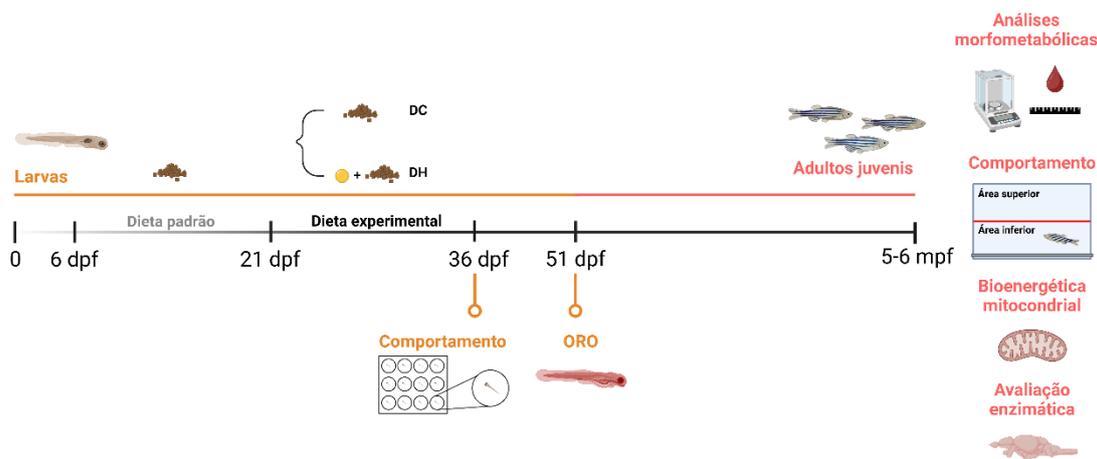
As larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*) tipo selvagem utilizadas neste estudo foram obtidas a partir da reprodução de animais adultos com 6 a 7 meses. Foram utilizados 120 progenitores, sendo 40 fêmeas e 80 machos, mantidos no biotério aquático do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da UnB. O cruzamento ocorreu no período noturno, seguindo a proporção de 2:1, com dois machos e uma fêmea alojados em caixas de cruzamento do sistema ZebTEC (Tecniplast, Itália). As caixas continham enriquecimento ambiental para estimular a desova pelas fêmeas. Na manhã seguinte, a reprodução foi induzida por estimulação luminosa e os ovos foram coletados com auxílio de uma peneira. Os ovos foram triados de acordo com sua viabilidade, eliminando os coagulados e preservando os viáveis, sem considerar os estágios de desenvolvimento. Em seguida, os ovos foram transferidos para aquários menores (16 cm de comprimento x 8 cm de altura x 9 cm de largura), com aproximadamente 200 ovos por aquário e 2 litros de água do sistema ZebTEC, previamente filtrada com papel filtro. Foram adicionadas 1 a 2 gotas de azul de metileno (antifúngico). Os aquários foram colocados na incubadora a  $27 \pm 1$  °C, com controle de luz e temperatura, para garantir condições ideais de desenvolvimento dos embriões. Os aquários dos embriões foram limpos diariamente, completando o volume de água. Os ovos coagulados e eclodidos foram retirados e, caso houvesse a presença de fungos, a água foi trocada.

O protocolo experimental foi conduzido a fim de avaliar o efeito de uma dieta hiperlipídica em diferentes fases de desenvolvimento do peixe-zebra. Nos 5 primeiros dias pós fertilização (dpf), os animais não necessitam da adição de ração, pois são nutridos a partir da reserva endógena do próprio vitelo (KÜTTER et al., 2023). Então, as larvas foram alimentadas a partir do 6º dpf com a dieta padrão do biotério, composta pelas rações comerciais Tetra Colorbits granulada e TetraMin floculada (Tetra, Alemanha), na proporção de 1:1 e trituradas até virar um pó bem fino. A dieta foi fornecida até a saciedade dos animais, em pequenas quantidades, 1 vez ao dia, para evitar sobras e minimizar a sujeira nos aquários, considerando o tamanho reduzido das larvas. As larvas foram alimentadas com a dieta padrão por 15 dias, período crítico em que as larvas apresentam alta taxa de mortalidade.

Após 15 dias de alimentação com a dieta padrão, as larvas foram contabilizadas e distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais: dieta controle (DC) e dieta hiperlipídica (DH). Em seguida, iniciou-se a dieta experimental, que foi administrada do 21 dpf ao 36 dfp. Seguem as dietas dos grupos DC e DH:

- **Dieta do grupo DC:** Ração seca composta pelas rações comerciais Tetra Colorbits granulada e TetraMin floculada, na proporção de 1:1, trituradas até formar um pó bem fino e oferecidas até a saciedade (composição da dieta na Tabela 1).
- **Dieta do grupo DH:** Ração seca (mesma condição da DC) acrescida de gema de ovo cozido. Os ovos foram adquiridos de fornecedor local, cozidos e a gema foi diluída em água. O protocolo de Den Broeder e colaboradores (2017) foi seguido e adaptado. O ovo foi cozido por 10 minutos e a gema coletada. Pesou-se 1g de gema, que foi transferida para um cadinho e misturada com 15 mL de água do sistema ZebTEC. Foi ofertado aproximadamente 33 mg de gema por aquário. Na fase larval, a gema de ovo foi preparada com uma granulação mais fina, adequada ao estágio inicial de desenvolvimento dos animais. Essa solução foi então alíquotada em eppendorfs com 0,5 mL por tubo. Como a gema de ovo não se dissolve completamente em água, ela tende a sedimentar quando em repouso, sendo necessário mantê-la sob agitação constante durante a pipetagem para garantir uma distribuição uniforme. À medida que os peixes se desenvolviam, a granulação da gema foi progressivamente aumentada para acompanhar o crescimento dos animais (composição da dieta na Tabela 1) (DEN BROEDER et al., 2017).

Durante o tratamento com as dietas os aquários foram limpos diariamente, e foi realizada meia troca de água para evitar diferenças de osmolaridade e a morte das larvas. Os animais foram monitorados antes de cada troca de água para avaliar o impacto da exposição à dieta experimental na taxa de sobrevivência. Uma comparação percentual da sobrevivência entre os grupos DC e DH foi realizada por meio da curva de Mantel-Cox. Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNB) local (SEI nº 23106.075530/2024-12).



**Figura 3: Esquema representativo do protocolo experimental.** Foi conduzido um protocolo experimental em que as larvas de peixe-zebra foram alimentadas com dieta controle (DC) ou dieta hiperlipídica (DH) em dois protocolos distintos: (i) de 21 até 36 dias pós-fertilização (dpf), correspondendo à fase larval; e (ii) de 21 dpf até 5-6 meses pós-fertilização (mpf), caracterizando a fase adulta juvenil. Ao final do protocolo dietético, foram avaliados parâmetros morfofometabólicos, comportamentais e bioenergéticos. Na fase larval: sobrevivência e comprimento corporal ao longo do tempo, para avaliação do desenvolvimento; marcação de lipídios com Oil red O (ORO); e análises comportamentais por meio dos testes de tanque novo e campo aberto. Na fase adulta juvenil: sobrevivência ao longo do tempo; parâmetros morfofometabólicos, incluindo peso, comprimento corporal, índice de massa corporal (IMC) e glicemia; análise comportamental por teste de tanque novo; respirometria de alta resolução como análise bioenergética; e avaliação bioquímica da atividade enzimática cerebral. Figura criada em BioRender. De bem, L. (2025) <https://BioRender.com/s87y521>.

**Tabela 1: Composição de nutrientes das dietas controle (DC) e hiperlipídica (DH).** Quantidade calórica correspondente a 100g.

	<b>Tetra Colorbits</b>	<b>TetraMin</b>	<b>Gema de ovo*</b>
<b>Proteínas</b>	47,5%	47%	16,2%
<b>Gorduras</b>	6,5%	10%	28,8%
<b>Carboidratos</b>	18%	<i>n.i.</i>	1,02%
<b>Calorias</b>	4,957 cal/mg	<i>n.i.</i>	3,28 cal/mg

\*Fonte: USDA, 2019; *n.i.* - não informado.

## 4.2 Análises morfofometabólicas

### 4.2.1 Larvas

#### 4.2.1.1 Comprimento corporal

A medida do comprimento (mm) das larvas ( $n = 20$  animais por grupo), utilizando um estereomicroscópio com ampliação de 2.0x (Stemi 2000, Zeiss, Alemanha), foi realizada 1, 3, 7, 9, 14, 16 e 30 dias após a introdução da dieta experimental. Cada animal foi colocado individualmente em uma placa de petri, com uma quantidade reduzida de

água e fotografado. A partir dessas imagens, o comprimento corporal foi medido no software ImageJ, considerando o comprimento desde a ponta da cabeça até o pedúnculo caudal (DEN BROEDER et al., 2017; OKA et al., 2010).

#### **4.2.1.2 Marcação de lipídios com Oil Red O**

Um grupo de larvas (n = 10 animais por grupo) foi submetido a marcação de lipídios com Oil Red O 0,5 % (ORO 0,5%), um corante utilizado em peixe-zebra para marcar lipídios neutros, como triglicerídeos e gotículas de gordura em adipócitos. O protocolo foi seguido e adaptado de Schlegel & Stainier (2006) e Zhou et al. (2015). As larvas submetidas a 20 dias de dieta experimental (51 dpf) foram eutanasiadas e fixadas em paraformaldeído 4% (PFA 4%) por 1 hora e, em seguida lavadas com PBS 200 nM. Para a marcação dos lipídios, as larvas foram expostas a ORO 0,5% por 1 hora, lavadas novamente com PBS 200 nM e fotografadas em estereomicroscópio com ampliação de 2.0x. A quantificação do pigmento vermelho foi feita utilizando o software ImageJ.

#### **4.2.2 Adultos juvenis**

##### **4.2.2.1 Medidas morfométricas**

Nos peixes juvenis adultos, a medição do comprimento corporal foi realizada ao final da dieta experimental e após a realização do teste comportamental. Os peixes foram anestesiados com triclaína 0,2% e fotografados lateralmente, e, a partir dessas imagens, o comprimento corporal foi medido utilizando software ImageJ, considerando o comprimento da ponta da cabeça até o pedúnculo caudal. Após serem fotografados os animais foram pesados em balança de precisão e o IMC pôde ser calculado:  $IMC = \text{peso (mg)} / \text{comprimento (cm}^2\text{)}$  (n = 32 animais por grupo) (LANDGRAF et al., 2017; LEIBOLD; HAMMERSCHMIDT, 2015; OKA et al., 2010).

##### **4.2.2.2 Determinação dos níveis de glicose sanguínea**

A determinação dos níveis de glicose sanguínea foi realizada após a pesagem (n = 8 animais por grupo). A cauda dos peixes foi cortada transversalmente, próximo a nadadeira anal, e a medida de glicose foi feita diretamente na artéria dorsal, utilizando uma tira de teste de glicosímetro (G-Tech) (CAPIOTTI et al., 2014).

$$IMC = \frac{\text{Peso (mg)}}{\text{Comprimento (cm}^2\text{)}}$$

### **4.3 Análises comportamentais**

#### **4.3.1 Larvas**

##### **4.3.1.1 Teste de tanque novo e campo aberto**

Os testes de tanque novo e campo aberto foram realizados após 15 dias de dieta experimental (n = 9 animais por grupo) para avaliar comportamentos associados à ansiedade, como resposta a um novo ambiente, e a capacidade locomotora das larvas após o período de habituação. Os animais foram individualmente colocados em placas de 24 poços, contendo 2 mL de água do sistema ZebTEC, e filmados por 12 minutos. Nos primeiros 6 minutos, avaliou-se o comportamento frente ao novo ambiente, e nos últimos 6 minutos, a locomoção. Durante a análise, o aparato foi virtualmente dividido em zonas central e periférica. O tempo que os animais permaneceram em cada zona (s) e o índice de exploração (%) foram quantificados como indicadores de ansiedade induzida pelo novo ambiente. O índice de exploração foi calculado considerando o tempo no centro / (tempo na periferia + tempo no centro) x 100. Para avaliar a capacidade locomotora, foram utilizados parâmetros como a distância total percorrida (m) e velocidade máxima (m/s). Esses parâmetros também permitiram observar a tigmotaxia, comportamento em que os animais tendem a permanecer próximos às bordas de um ambiente novo, indicando comportamento tipo-ansioso ou estresse. A redução da tigmotaxia ao longo do tempo sugere habituação e menor ansiedade, complementada por análises de locomoção, como distância percorrida e velocidade (NUNES et al., 2019). Todos os dados foram obtidos por análise automatizada usando o software ANY-maze™.

#### **4.3.2 Adultos juvenis**

##### **4.3.2.1 Teste de tanque novo**

O teste de tanque novo foi realizado ao fim da dieta experimental (5-6 meses), para avaliar tanto o comportamento tipo ansioso quanto a locomoção dos peixes (DC n = 28; DH n = 29). Esse teste é utilizado para avaliar o instinto animal de busca por proteção em um ambiente desconhecido. Quando introduzido em um novo ambiente, o animal tende inicialmente a se mover para o fundo do aquário, e à medida que se adapta, começa a explorar outras áreas, incluindo a superfície. O experimento foi conduzido em um aquário retangular (15 cm de comprimento × 20 cm de altura × 18 cm de largura), contendo 4 L de água do sistema ZebTEC (27 ± 1 °C). Foram utilizados 3 aquários por rodada de teste, sendo posicionados dentro de um biombo de isopor para evitar interferências visuais externas. Foi adicionado o papel celofane azul nas luminárias e a

quantidade de luz foi quantificada com luxímetro. Os animais estavam em jejum noturno e foram submetidos a 1h de aclimação na sala de teste. Após o período de aclimação os peixes foram individualmente colocados em cada aquário com auxílio de uma rede e filmados por 6 minutos. Durante a análise, o aquário foi virtualmente dividido em áreas superior e inferior. Os parâmetros avaliados incluíram: distância total percorrida (m), velocidade máxima (m/s) e ângulo do giro absoluto ( $\times 1000^\circ$ ) como medidas de locomoção; além de movimentos erráticos (s), latência para entrada na área superior (s), tempo gasto em cada área (s) e índice de exploração (%) como indicadores de comportamento ansioso induzido por um ambiente novo. O índice de exploração foi calculado considerando: o tempo na área superior/ (tempo na área inferior + tempo na área superior) x 100 (MOREIRA; LUCHIARI, 2022; PICOLO et al., 2021). Todos os dados foram obtidos por análise automatizada usando o software ANY-maze™.

#### **4.4 Análise Bioenergética**

A análise do metabolismo mitocondrial em peixes adultos juvenis foi realizada através da medição do consumo de oxigênio por respirometria de alta resolução (RAR), utilizando o Oxygraph-2k (Oroboros, Innsbruck, Austria) a 28°C. Essa técnica permite monitorar em tempo real as variações no consumo de oxigênio em resposta a diferentes estímulos, em amostras de mitocôndrias isoladas, tecidos e células (HUTTER et al., 2006). Os peixes foram eutanasiados por choque térmico em água resfriada com gelo (0 a 4°), sendo a ausência de movimentos corporais e operculares sinais da morte. Em seguida, os encéfalos foram removidos e coletados. Para a homogeneização, foram feitos pools de 2 encéfalos (DC: n = 7; DH: n = 11), aos quais foram adicionados 120  $\mu$ L de meio de reação (MR) para o grupo DC e 350  $\mu$ L para o grupo DH. O MR continha sacarose (125 mM), KCl (65 mM), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 mM), HEPES (10 mM), EGTA (0,2 mM), e a homogeneização foi realizada utilizando um homogeneizador Dounce de vidro-teflon (5 mL).

Das amostras homogeneizadas, 80  $\mu$ L foram transferidos para o respirômetro, contendo 2 mL de MR e 0,1 % de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (*Bovine Serum Albumin fat-free*, *BSA fat-free*). A seguir, foram adicionados diferentes substratos e inibidores para avaliar os estados mitocondriais. O piruvato e malato (PM: 15 e 7,5 mM) foram utilizados para avaliar o complexo 1, enquanto o succinato (S: 12 mM) foi usado para avaliar o complexo 1 e 2, ambos para medir a atividade do sistema de transporte de

elétrons (ETS). O estado fosforilante (OXPHOX) foi avaliado após adição de ADP (500  $\mu\text{M}$ ), enquanto o vazamento de prótons foi determinado após a adição de oligomicina (OMY: 0,2  $\mu\text{g/mL}$ ), um inibidor da ATP-sintase. A capacidade respiratória máxima foi determinada por titulação com cianeto de carbonila 3-clorofenil-hidrazona (CCCP: 0,6  $\mu\text{M}$ ), um desacoplador da cadeia transportadora de elétrons. Por fim, a respiração residual não mitocondrial foi analisada com o uso de rotenona (ROT: 0,5  $\mu\text{M}$ ) e encerramos a corrida com o uso da antimicina A (AA: 1  $\mu\text{M}$ ). O consumo de oxigênio ligado à produção de ATP (*ATP-linked*) foi calculado pela equação: [fluxo de oxigênio (OXPHOX – vazamento de prótons)] (Gnaiger, 2020).

## ***4.5 Análise Bioquímica***

### ***4.5.1 Preparo das amostras para determinação de proteínas e atividade enzimática***

Os peixes adultos juvenis foram eutanasiados por choque térmico em água resfriada com gelo (0 a 4°), sendo a ausência de movimentos corporais e operculares sinais da morte. Em seguida, os encéfalos foram removidos e coletados. Para a homogeneização, foram feitos pools de 2 encéfalos (foram utilizados 16 animais por grupo; n = 8 por grupo), aos quais foram adicionados 700  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,2). As amostras foram homogeneizadas a frio por 30 segundos usando um sonicador (Ultrasonic Cleaner 2840D Odontobras) e, posteriormente, centrifugadas a 4.000 rpm (2.000 G) por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi separado para uso na quantificação de proteínas por espectrofotometria a 595 nm, seguindo o método descrito por Bradford (1976) utilizando a  $\gamma$ -globulina como padrão, utilizando a  $\gamma$ -globulina como padrão. Este sobrenadante foi utilizado para avaliação enzimática da acetilcolinesterase (AChE), lactato desidrogenase (LDH) e glutatona S-transferase (GST). As reações foram realizadas em microplacas de 96 poços, com a determinação de proteínas e as análises enzimáticas realizadas em triplicata.

### ***4.5.2 Determinação da atividade da AChE***

A atividade da AChE foi determinada utilizando acetilcolina (ACh) e propioniltiocolina (PSCh) como substratos, conforme descrito por Ellman e colaboradores (1961), sendo realizadas algumas adaptações. Neste método, a AChE degrada a ACh em acetato e tiocolina, o ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) reage com a tiocolina liberada na quebra do substrato, produzindo um composto de cor

amarela que pode ser quantificado por espectrofotometria a 405 nm, em intervalos de 20 segundos, durante 5 minutos. O ensaio utilizou 50  $\mu$ L do sobrenadante e 250  $\mu$ L do meio de reação composto por ACh e PCh (75mM) e DNTB (10 mM) em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2). Os dados foram expressos em nanomoles de substrato hidrolisado por minutos e por miligrama de proteína (U) (ELLMAN et al., 1961).

#### **4.5.3 Determinação da atividade da LDH**

A atividade da LDH foi mensurada utilizando piruvato como substrato, seguindo o método descrito por Wroblewski & Ladue (1955). A LDH catalisa a conversão de piruvato a lactato, acompanhada pela oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) a NAD<sup>+</sup>. Essa oxidação de NADH é monitorada e quantificada por espectrofotometria a 340 nm, em intervalos de 40 segundos, durante 5 minutos. Foram utilizados 40  $\mu$ L do sobrenadante, 250  $\mu$ L do meio de reação composto por NADH (0,24 mM) e 40  $\mu$ L do meio de reação com piruvato (10 mM), ambos dissolvidos em tampão Tris – NaCl (0,1 M, pH 7,2) (WROBLEWSKI; LADUE, 1955).

#### **4.5.4 Determinação da atividade da GST**

A atividade da GST foi avaliada conforme o método descrito por Habig e colaboradores (1974), adaptado para microplacas. Nesse método, a GST catalisa a conjugação do 1 cloro 2-4 dinitrobenzeno (CDNB: substrato) com a glutathiona reduzida (GSH), formando um tioéter. A reação foi monitorada e quantificada por espectrofotometria a 340 nM, em intervalos de 40 segundos, durante 5 minutos. No ensaio foi utilizado 100  $\mu$ L do sobrenadante e 200  $\mu$ L do meio de reação composto por glutathiona (10 mM) e CDNB (10mM), dissolvidos em tampão fosfato (0,1, pH 6,5) (HABIG; PABST; JAKOBY, 1974).

#### **4.6 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Software Prism (Versão 9.2.0). Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) quando paramétricos e como mediana com intervalo interquartil, para não paramétricos. Os *outliers* foram identificados pelo método de ROUT (Q = 1%) e, em seguida, excluídos. A normalidade dos dados foi avaliada com os testes de Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk e D'Agostino & Pearson, sendo a distribuição considerada normal

quando pelo menos dois desses testes indicaram conformidade com os critérios de normalidade. Para analisar o comprimento corporal das larvas ao longo do tempo, foi realizada a ANOVA de duas vias, considerando tempo e dieta como fatores, seguida de pós-teste de Tukey para comparação múltipla. As curvas de sobrevivência foram comparadas por teste de Mantel-Cox (Long-rank). As comparações entre dois grupos foram feitas utilizando o teste  $t$  de Student não pareado para distribuição normal e teste de Mann-Whitney para dados com distribuição não normal. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

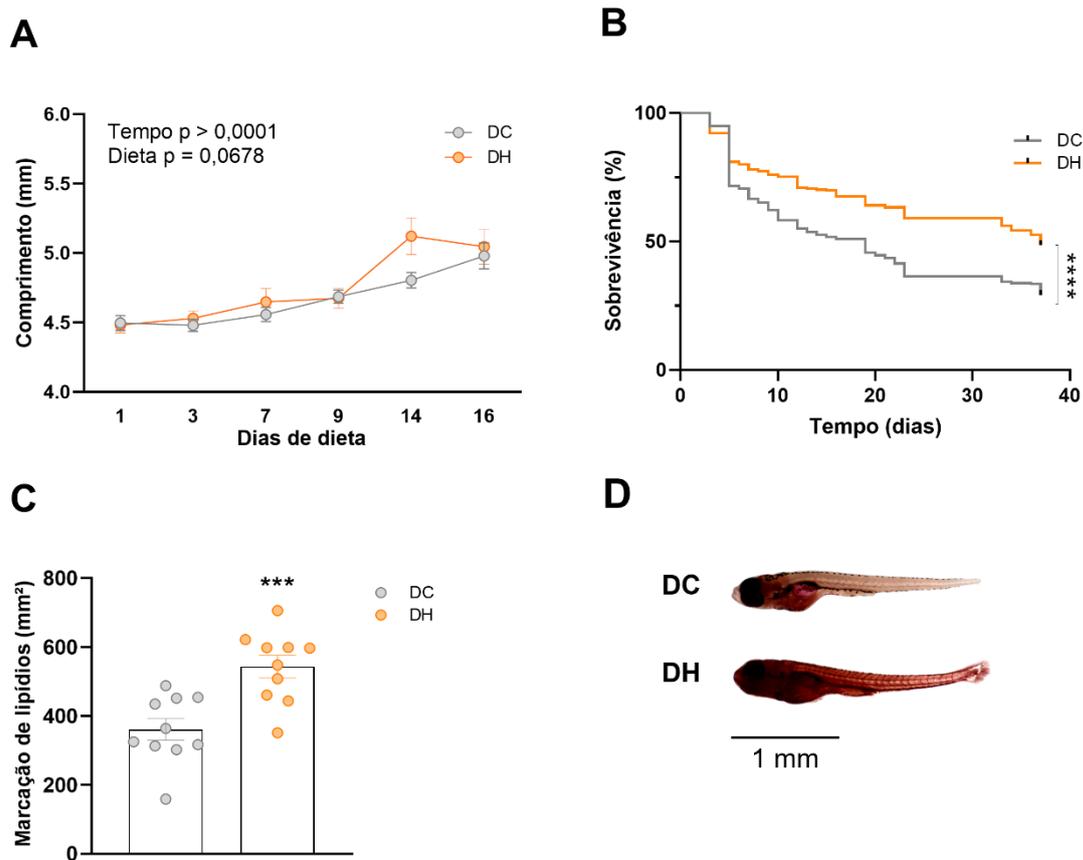
### *5.1 Impacto da DH no comprimento corporal das larvas de peixe-zebra*

Foi avaliada a evolução do comprimento corporal das larvas ao longo do período de dieta experimental, conforme apresentado na Figura 4A. O teste ANOVA de duas vias revelou que a DH por 16 dias aumentou significativamente o comprimento corporal das larvas (efeito do tempo:  $F(5, 219) = 16,63$ ,  $p < 0,0001$ ). Observamos também uma tendência de diferença entre os grupos DC e DH (efeito da dieta:  $F(1, 219) = 3,369$ ,  $p = 0,0678$ ).

### *5.2 O efeito da DH na sobrevivência larval e acúmulo de lipídios*

Conforme indicado pelo teste de Log-rank, a análise da taxa de sobrevivência ao longo do período experimental (dias 1 a 37 de dieta) revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $\chi^2 = 23,64$ ,  $p < 0,0001$ ), o grupo DH apresentou uma taxa de sobrevivência de 48,6%, enquanto no grupo DC essa taxa foi reduzida para 29,1% (Figura 4B).

O acúmulo de lipídios foi avaliado por coloração com Oil Red O (ORO) a 0,5%, realizada após 20 dias de dieta experimental (51 dpf). As imagens representativas (Figura 4D) evidenciam um aumento na deposição lipídica nos animais do grupo DH em comparação ao grupo DC. A análise quantitativa das imagens confirmou essa diferença, mostrando uma área de marcação lipídica significativamente maior no grupo DH ( $p < 0,001$ ; Figura 4C).

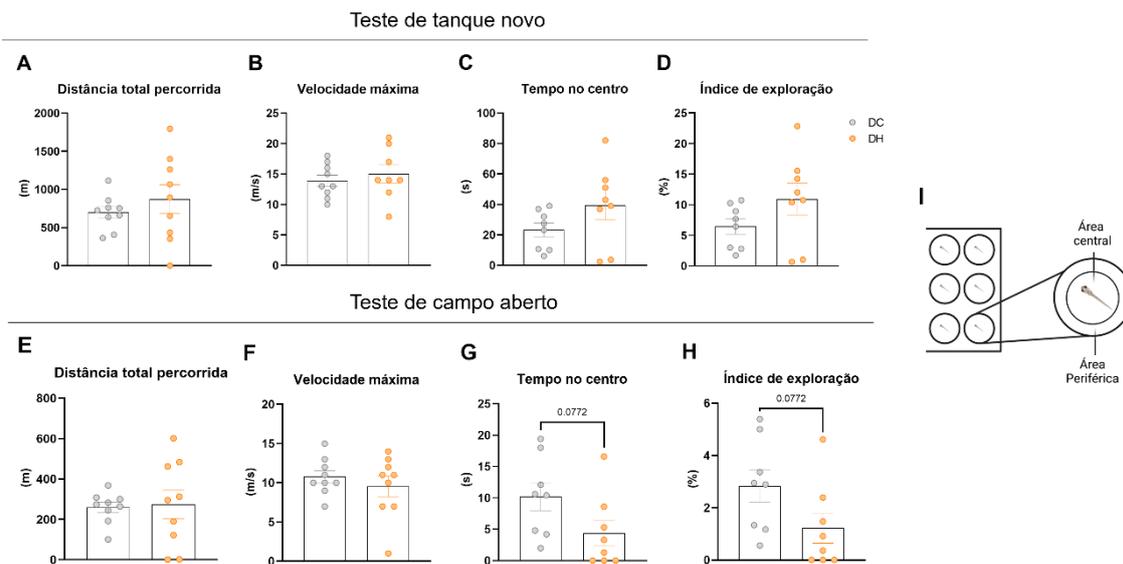


**Figura 4: Análises morfometabólicas e sobrevivência larval.** As larvas de peixe-zebra foram alimentadas por 16 dias com DC ou DH e avaliado o (A) comprimento corporal ao longo do tempo do protocolo experimental ( $n = 20$  por grupo), (B) a curva de sobrevivência larval foi avaliada a partir do dia 1 de dieta experimental ao dia 37 ( $n$  inicial = 278 por grupo) e (C) a marcação de lipídios com ORO 0,5% após 20 dias de dieta experimental ( $n = 10$  por grupo). (D) Imagem representativa dos animais marcados com ORO 0,5%, pertencentes a cada grupo. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM. O comprimento corporal foi analisado por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. As curvas de sobrevivência foram comparadas por teste de Mantel-Cox (Log-rank) e a comparação entre 2 grupos foi realizada por teste  $t$  de Student. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas em comparação com o grupo DC. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 5.3 A DH não causou alterações no comportamento larval

Os testes de tanque novo e campo aberto, realizados após 15 dias de dieta experimental avaliaram a locomoção e o comportamento tipo-ansioso em larvas (Figura 5). A DH não promoveu alterações significativas sobre a distância total percorrida (Figuras 5A e E,  $p = 0,4004$  e  $p = 0,8455$ ), velocidade máxima (Figuras 5B e F,  $p = 0,5269$  e  $p = 0,4404$ ), tempo no centro (Figuras 5C e G,  $p = 0,1451$  e  $p = 0,0772$ ) e índice de exploração (Figuras 5D e H,  $p = 0,1423$  e  $p = 0,0772$ ), em ambos os testes. No entanto, no grupo DH, observou-se maior dispersão dos dados e uma tendência de menor

exploração do centro no teste de campo aberto, considerando o tempo no centro e o índice de exploração após habituação.



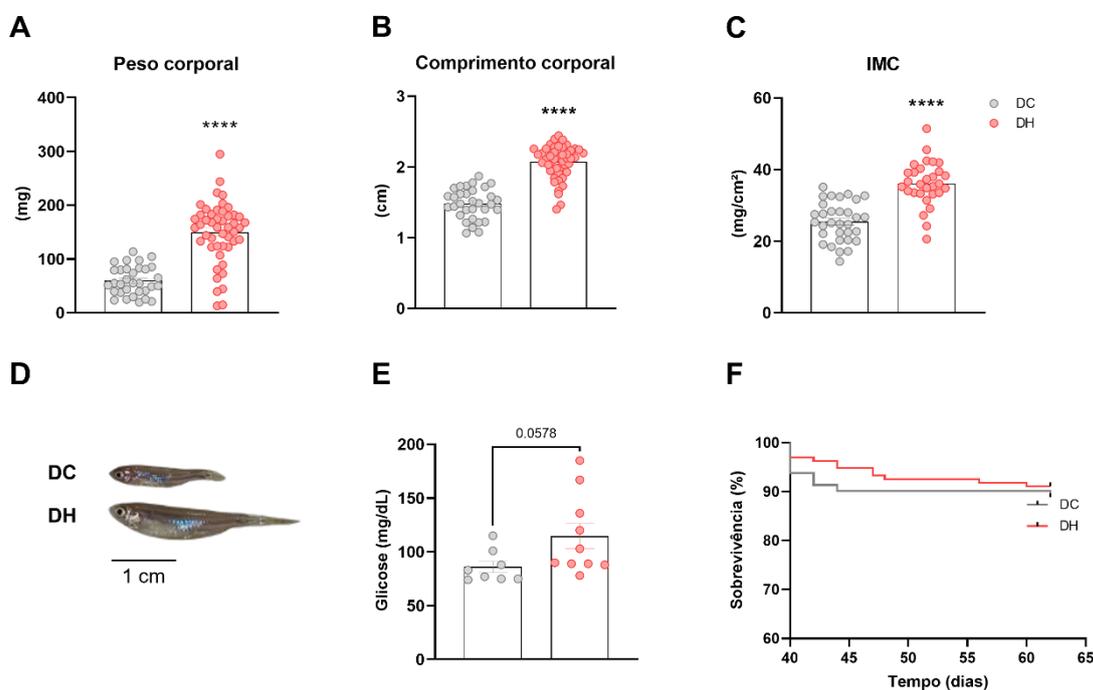
**Figura 5: Análise comportamental em larvas.** O comportamento tipo ansioso e a locomoção das larvas foi avaliado após 15 dias de dieta experimental, através do teste de tanque novo e do teste do campo aberto. Os parâmetros avaliados foram (A e E) distância total percorrida, (B e F) velocidade máxima, (C e G) tempo no centro e (D e H) índice de exploração. (I) Imagem representativa do aparato utilizado para realização dos testes e as áreas consideradas durante a análise, central e periférica. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM. A comparação entre 2 grupos foi realizada por teste *t* de Student.  $n = 9$  por grupo.

#### 5.4 Efeitos da DH sobre parâmetros morfometabólicos e sobrevivência na fase adulto-juvenil

A exposição à DH desde a fase larval (21 dpf) até a fase adulto-juvenil (5-6 mpf) resultou em um aumento significativo no peso corporal, comprimento corporal e IMC dos animais ao final do protocolo experimental (Figuras 6A, B e C;  $p < 0,0001$ ). Esses achados indicam que a DH impactou diretamente o crescimento e desenvolvimento dos animais. Além disso, embora os níveis de glicose sanguínea não tenham apresentado diferença estatisticamente significativa entre os grupos, observou-se uma tendência de aumento no grupo DH em comparação ao grupo DC (Figura 6E,  $p = 0,0578$ ).

A curva de sobrevivência dos peixes adultos juvenis foi avaliada e comparada entre os grupos no período de 40 a 62 dias de dieta experimental. Durante essa fase de desenvolvimento, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, com uma taxa de sobrevivência de 88,9% no grupo DC e 91,1% no grupo DH (Figura 6F). A comparação das curvas foi realizada utilizando o teste de Long-rank

(Mantel-Cox), resultando em  $\chi^2 = 0,3154$  e  $p = 0,5744$ , indicando que a DH não afetou a taxa de sobrevivência dos animais nesse período.

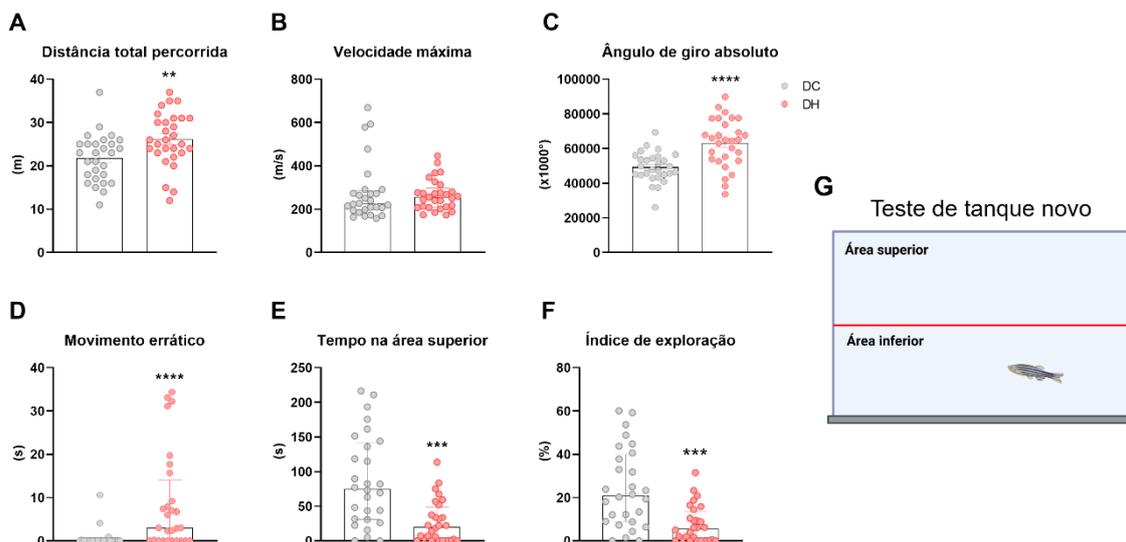


**Figura 6: Análises morfometabólicas e sobrevivência de adultos juvenis.** As larvas foram alimentadas com a dieta experimental, DC ou DH, até a fase adulta juvenil (5-6 mpf) e avaliados parâmetros, como (A) peso, (B) comprimento corporal e (C) IMC (DC n = 32 e DH n = 48). Os (E) níveis de glicose sanguínea (DC n = 8 e DH n = 10) e a (F) sobrevivência dos animais adultos juvenis (n inicial DC = 81, DH = 135) também foram avaliados. (D) Imagem representativa dos animais pertencentes a cada grupo. Os dados paramétricos estão apresentados como média  $\pm$  EPM e os não paramétricos pela mediana  $\pm$  intervalo interquartil, analisados por teste de Mann-Whitney. A comparação entre 2 grupos foi realizada por teste *t* de Student. As curvas de sobrevivência foram comparadas por teste de Mantel-Cox (Log-rank). Os asteriscos indicam diferenças estatísticas em comparação com o grupo DC. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 5.5 Efeito da DH ao longo do desenvolvimento sobre o comportamento exploratório e tipo-ansioso

A análise comportamental dos peixes adultos juvenis (5-6 mpf) foi realizada por meio da exposição dos animais a um novo ambiente, permitindo a avaliação dos padrões de locomoção e do comportamento tipo-ansioso (Figura 7). Os parâmetros locomotores indicaram um efeito significativo da DH, com aumento na distância total percorrida (Figura 7A,  $p < 0,01$ ) e no ângulo de giro absoluto (Figura 7C,  $p < 0,0001$ ) no grupo DH em comparação ao grupo DC. No entanto, a velocidade máxima não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 7B,  $p = 0,3551$ ), sugerindo que a dieta alterou o padrão de movimentação sem impactar a velocidade máxima atingida pelos animais. Além disso, o movimento errático, um parâmetro frequentemente

associado a comportamento tipo-ansioso, foi significativamente maior nos animais expostos à DH (Figura 7D,  $p < 0,0001$ ). Essa alteração comportamental foi reforçada pelos dados de exploração do ambiente: os animais do grupo DH passaram menos tempo na área superior do tanque e apresentaram um menor índice de exploração (Figuras 7E e 7F,  $p < 0,001$ ), um padrão típico de comportamento tipo-ansioso em peixes-zebra.

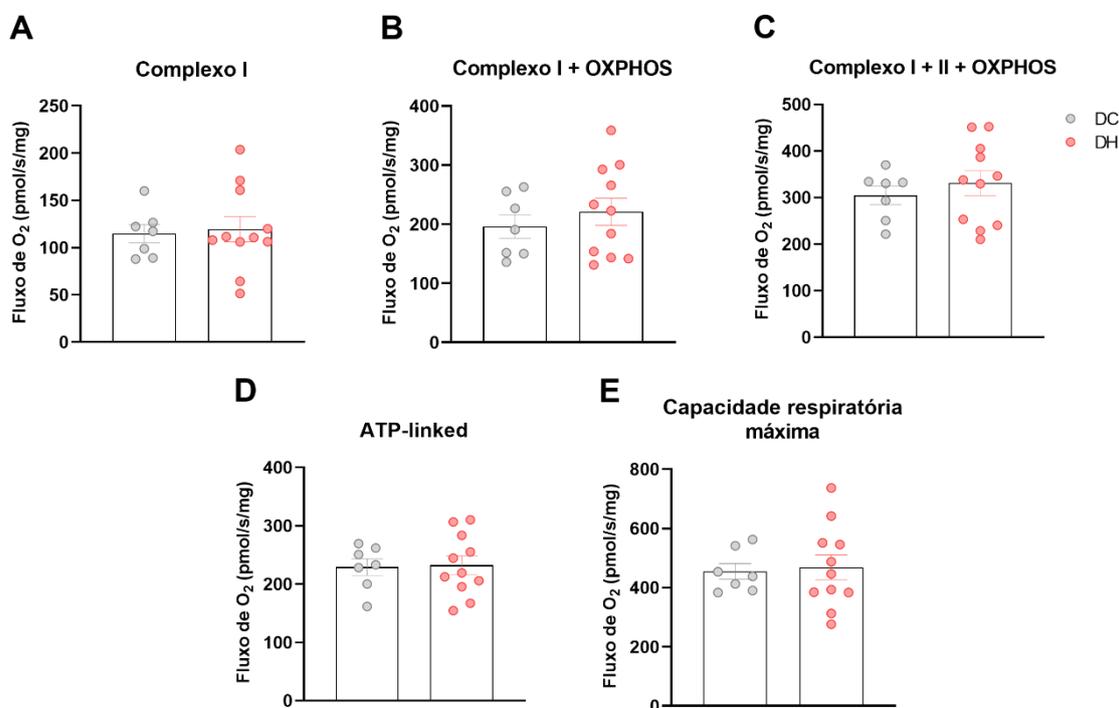


**Figura 7: Análise comportamental em adultos juvenis.** Após 5-6 mpf e alimentação com DH ou DC, os peixes adultos juvenis foram submetidos ao teste de tanque novo. Foram avaliados parâmetros de locomoção, como a (A) distância total percorrida, o (C) ângulo de giro absoluto e o (D) movimento errático. Dentre os parâmetros para avaliação do comportamento tipo-ansioso, foram avaliados (E) tempo na área superior e (F) índice de exploração. (G) Imagem representativa do aparato utilizado para realização do teste e as áreas consideradas durante a análise, superior e inferior. Os dados paramétricos estão apresentados como média  $\pm$  EPM e os não paramétricos pela mediana  $\pm$  intervalo interquartil, analisados por teste de Mann-Whitney. A comparação entre 2 grupos foi realizada por teste  $t$  de Student. DC  $n = 28$  e DH  $n = 29$ . Os asteriscos indicam diferenças estatísticas em comparação com o grupo DC. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 5.6 Efeito da DH durante o desenvolvimento sobre o consumo de oxigênio no encéfalo

A bioenergética mitocondrial no encéfalo dos peixes adultos juvenis (5-6 mpf) foi avaliada considerando seis estados mitocondriais (Figura 8). A exposição à DH durante o desenvolvimento não resultou em alterações significativas no consumo de oxigênio, indicando que a função mitocondrial cerebral foi preservada nesses animais. Os dados revelaram ausência de diferenças estatisticamente significativas nos seguintes parâmetros respiratórios: consumo de oxigênio associado ao complexo I ( $p = 0,7998$ , Figura 8A), complexo I + OXPHOS ( $p = 0,4720$ , Figura 8B) e complexo I + II + OXPHOS ( $p =$

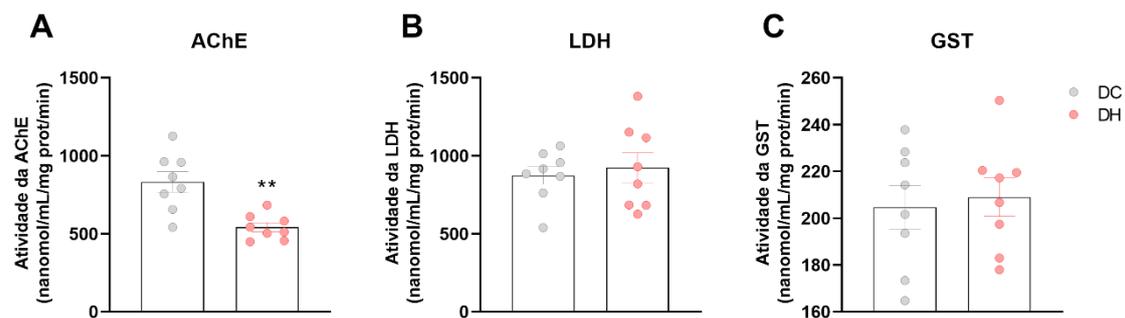
0,4860, Figura 8C). Além disso, a respiração ATP-linked ( $p = 0,8962$ , Figura 8D) e a capacidade respiratória máxima ( $p = 0,8048$ , Figura 8E) permaneceram inalteradas entre os grupos DH e DC.



**Figura 8: Análise da bioenergética mitocondrial do encéfalo em adultos juvenis.** Em peixes adultos juvenis (5-6 mpf), alimentados com DC ou DH desde a fase larval, 5 estados respiratórios mitocondriais (Fluxo de O<sub>2</sub> (pmol/s) / mg de proteína da amostra) foram avaliados através do consumo de oxigênio por respirometria de alta resolução (RAR). Os parâmetros avaliados foram: (A) complexo I, (B) complexo I + OXPHOX, (C) complexo I + II + OXPHOX, (D) ATP – linked e (E) capacidade respiratória máxima. Os dados estão apresentados como média ± EPM. A comparação entre 2 grupos foi realizada por teste *t* de Student. DC n = 7, DH n = 11.

### 5.7 Efeito da DH durante o desenvolvimento sobre a atividade enzimática de AChE, LDH e GST no encéfalo

A atividade enzimática da AChE, LDH e GST foi medida no encéfalo de peixes-zebra adultos juvenis, após 5-6 meses de dieta experimental. A análise foi realizada a partir do pool de 2 encéfalos, homogeneizados. Os resultados demonstraram uma redução significativa na atividade da AChE no grupo DH em comparação ao grupo DC ( $p < 0,01$ , Figura 9A), sugerindo um impacto da dieta sobre a regulação colinérgica no sistema nervoso central. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na atividade enzimática da LDH ( $p = 0,6705$ , Figura 9B) e da GST ( $p = 0,7282$ , Figura 9C).



**Figura 9: Avaliação da atividade enzimática da AChE, LDH e GST no encéfalo de adultos juvenis.** A atividade enzimática da (A) AChE, (B) LDH e (C) GST foi avaliada no encéfalo de peixes-zebra adultos juvenis (5-6 mpf) alimentados com DC ou DH desde a fase larval. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM. A comparação entre 2 grupos foi realizada por teste *t* de Student.  $n = 8$  por grupo. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas em comparação com o grupo DC. \*\*  $p < 0,01$ .

## 6. DISCUSSÃO

Já é bem descrito que a alimentação tem um papel crítico na regulação de processos metabólicos e no desenvolvimento do sistema nervoso central. E a dieta rica em gordura tem sido associada a alterações metabólicas, que implicam em disfunções neurobiológicas e alterações no comportamento em diversos modelos experimentais (BITTENCOURT et al., 2022; DE PAULA et al., 2021; DE SOUZA et al., 2019; VILELA et al., 2023, 2024). No entanto, as implicações dessas alterações ao longo de diferentes fases do desenvolvimento ainda são pouco compreendidas. Desta forma, essa pesquisa explorou os efeitos da DH sobre desfechos metabólicos e do neurodesenvolvimento do peixe-zebra (*Danio rerio*) ao longo da vida, desde a fase larval (a partir de 21 dpf) até a fase adulta juvenil (5-6 mpf). Os resultados mostraram que a DH impactou o desenvolvimento metabólico dos animais tanto na fase larval, quanto na fase adulta juvenil, e promoveu comportamento tipo-ansioso na fase adulta juvenil.

As análises morfometabólicas revelaram um aumento significativo no comprimento corporal das larvas submetidas à DH à base de gema de ovo por 16 dias (Figuras 4A). Resultados semelhantes foram observados no estudo de Dai e colaboradores (2015), que também utilizou modelos de larvas de peixes-zebra como modelo experimental. Nesse estudo, as larvas foram alimentadas com DH por 10 dias, sendo que um dos grupos recebeu adicionalmente colesterol na dieta. Ambos os grupos experimentais apresentaram aumento significativo no comprimento corporal em comparação ao grupo controle, sendo esse efeito já evidente com 7 dias de alimentação (DAI et al., 2015). Além disso, a área marcada com ORO, indicativo de acúmulo lipídico, foi maior nas larvas do grupo DH em comparação ao grupo DC, sugerindo maior adiposidade (Figura 4D). Nos peixes adultos juvenis, a continuidade dessa dieta promoveu a elevação do peso e do comprimento corporal no grupo DH, resultando em um IMC superior em relação ao grupo DC (Figura 6A, B e C). Esses achados estão alinhados com estudos anteriores que investigaram os efeitos da DH em peixes-zebra, utilizando fontes como gema de ovo de galinha, óleo de milho, banha e até mesmo a superalimentação com artêmia. Essas pesquisas demonstraram que a exposição a uma dieta rica em lipídios durante o desenvolvimento pode levar a alterações no crescimento, no peso corporal, IMC e deposição de lipídios, indicando um impacto prolongado da dieta hiperlipídica caracterizando um fenótipo obesogênico dos peixes-zebra (LANDGRAF et

al., 2017; OKA et al., 2010; PICOLO et al., 2021; ZHANG et al., 2024). Segundo Zhang e colaboradores, os lipídios são nutrientes indispensáveis para o crescimento animal, com papel no metabolismo, imunidade e fornecimento energético necessário para os peixes. Na aquicultura, os lipídios têm sido frequentemente incluídos já que auxiliam no crescimento dos animais, conservando as proteínas e reduzindo custos de produção. No entanto, os estudos alertam sobre os efeitos adversos do excesso da ingestão de lipídeos a longo prazo. A ingestão excessiva promove acúmulo de gordura principalmente no fígado e abdômen, levando a distúrbios metabólicos, redução da imunidade, aumento da susceptibilidade a doenças, respostas inflamatórias e desbalanço redox em órgãos metabolicamente ativos (ZHANG et al., 2024). Em humanos, a relação entre DH no início da vida e aumento do crescimento corporal também é complexa e depende de inúmeros fatores, entre elas a composição da dieta, a quantidade de gordura consumida e balanço energético. Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), deve haver um equilíbrio entre ingestão e gasto calórico, as gorduras não devem exceder 30% da ingestão calórica total, sendo menos de 10% dessa ingestão representada por gorduras saturadas (OPAS, 2019).

A glicose sanguínea é um marcador metabólico amplamente utilizado para avaliar o impacto de dietas ou condições experimentais, como a exposição a DH, sobre a homeostase glicídica. Nesse contexto, a glicemia em jejum foi avaliada em peixes adultos juvenis para investigar possíveis alterações induzidas pela dieta. Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 6E), os dados revelaram uma tendência de aumento nos níveis de glicose no grupo DH. Esse achado sugere um possível impacto da dieta na regulação glicêmica, mas a confirmação dessa relação pode ter sido limitada pela variabilidade dos dados ou pelo tamanho amostral. Mesmo dentro de uma dieta desbalanceada, os mecanismos compensatórios podem estar mantendo a homeostase glicêmica através dos hormônios regulatórios (insulina e glucagon), que mantêm os níveis de glicose dentro de uma faixa relativamente estável. Além disso, a glicemia é um parâmetro sensível a múltiplos fatores, incluindo tempo de jejum, duração da exposição à dieta e a variabilidade biológica entre os indivíduos. Em conformidade com os resultados apresentados, o estudo de Carnovali e colaboradores (2018) mostrou que a DH por 7 semanas não alterou a glicemia basal, mas sim a resposta glicêmica pós-prandial. Enquanto o grupo DC apresentou um pico de glicose (100 mg/dL) aos 60 minutos, seguido de redução ao nível basal, o grupo DH

exibiu um aumento tardio, atingindo 140 mg/dL aos 120 minutos, antes de normalizar. Além disso a insulina teve um pico aos 90 minutos, retornando ao basal posteriormente. Os achados sugeriram que a DH pode retardar a captação de glicose e indicar um possível início de resistência à insulina (CARNOVALI et al., 2018). Investigações futuras, podem incluir análises complementares ao nosso estudo, dentre elas avaliação da insulinemia, testes de tolerância à glicose e marcadores de resistência à insulina, para uma melhor compreensão do impacto da DH sobre o metabolismo glicêmico.

A análise da curva de sobrevivência larval (Figura 4B) mostrou uma taxa de sobrevivência maior no grupo DH (48,6%) em comparação ao grupo DC (29,1%), um resultado já encontrado em estudos anteriores (DAI et al., 2015). Esse achado pode estar associado às demandas energéticas do metabolismo no início da vida e desenvolvimento das larvas, já que nessa fase o organismo possui alta demanda energética, sustentando processos críticos, como o crescimento, diferenciação celular e a neurogênese. Os lipídios, além de serem fontes densas de energia, fornecem substratos essenciais para a formação de membranas celulares e para a sinalização bioquímica, favorecendo então a adaptação metabólica das larvas e garantindo a maior sobrevivência observada no grupo DH. Em contrapartida, a DC, possivelmente menos calórica, pode não ter suprido adequadamente às necessidades metabólicas das larvas em desenvolvimento, resultando em maior mortalidade. Esses resultados reforçam a importância do equilíbrio nutricional no início da vida, uma vez que a demanda energética nessa fase torna a dieta um fator crucial para a sobrevivência e desenvolvimento adequado de organismos em crescimento. Os resultados obtidos entre 40 e 62 dias de dieta experimental, nos peixes adultos juvenis, contrastam com os dados obtidos na fase larval, já que mostraram taxas de sobrevivência similares entre os grupos DH (91,1%) e DC (88,9%), sem diferença estatisticamente significativa (Figura 6F). Na fase adulta juvenil é percebida uma mudança nas necessidades metabólicas, e após a superação dos desafios iniciais do desenvolvimento, os peixes apresentam maior resiliência metabólica e fisiológica, independentemente da dieta. A partir disso, é possível notar a necessidade de estratégias nutricionais específicas para cada estágio de desenvolvimento.

Os dados sugerem que, a DH não afetou de maneira robusta a locomoção ou induziu um comportamento tipo-ansioso em larvas alimentadas com DH por 15 dias (Figura 5). Os parâmetros avaliados foram, distância total percorrida (Figura 5A e E), velocidade máxima (Figura 5B e F)), tempo no centro (Figura 5C e G) e índice de

exploração (Figura 5 D e H). Foi observada uma maior dispersão dos dados no grupo DH, refletindo uma variabilidade individual maior, possivelmente associada a diferenças no metabolismo energético citada anteriormente ou na resposta comportamental induzida pela dieta. Também foi identificada uma tendência de menor exploração do centro no teste de campo aberto, indicando um comportamento mais inibido ou maior tigmotaxia (preferência pelas bordas), mesmo após um período de habituação, associado principalmente a maior aversão ao risco ou estresse. Essas tendências podem ser biologicamente relevantes, considerando o período de exposição, talvez 15 dias não tenham sido suficientes para induzir mudanças comportamentais marcantes. A composição da dieta também pode não ter sido capaz de alterar os circuitos neurobiológicos envolvidos no comportamento nesta fase.

Já nos peixes adultos juvenis (5-6 mpf) a análise comportamental de exposição ao novo ambiente revelou diferenças significativas nos padrões de locomoção e no comportamento tipo-ansioso entre os grupos DH e DC (Figura 7). Os peixes expostos a DH apresentaram maior distância total percorrida (Figura 7A) e ângulo de giro absoluto (Figura 7C), indicando maior atividade locomotora em comparação ao grupo DC. No entanto, a velocidade máxima (Figura 7B) não diferiu entre os grupos, sugerindo um aumento na persistência do movimento e não na intensidade de deslocamento. O movimento errático (Figura 7D), um parâmetro secundário associado ao comportamento tipo-ansioso, foi significativamente maior no grupo DH. Esse comportamento é caracterizado por movimentos imprevisíveis e descoordenados, frequentemente interpretado como resposta a um ambiente estressante ou maior estado de vigilância. Essa maior atividade locomotora pode refletir um estado de hiperatividade induzido por alterações metabólicas ou até mesmo hormonais. Além disso, o menor tempo gasto na área superior (Figura 7E) e o índice de exploração (Figura 7F) reduzido no grupo DH são consistentes com comportamentos de maior aversão ao risco, típicos de animais com comportamento tipo-ansioso. Diferentemente do que foi observado na fase larval, esses achados indicam que a exposição prolongada à DH pode impactar circuitos neurobiológicos envolvidos na regulação do comportamento tipo-ansioso. Esse efeito parece estar relacionado a desequilíbrios na homeostase cerebral e alterações na resposta adaptativa ao ambiente. Corroborando esses resultados, um estudo prévio realizado por nosso grupo demonstrou que a exposição de curto prazo a uma DH à base de gema de ovo de galinha, por apenas 15 dias, na fase adulta (entre 4 e 6 meses), foi suficiente para

induzir comportamentos semelhantes à ansiedade, além de aumentar a agressividade nos animais (PICOLO et al., 2021).

Os resultados da análise bioenergética mitocondrial no encéfalo dos peixes-adultos juvenis indicam que a exposição a DH por 5-6 meses não foi suficiente para provocar alterações significativas na função mitocondrial cerebral entre os grupos DH e DC. Foram avaliados 5 estados mitocondriais (Figura 8), incluindo: complexo I, complexo I + OXPHOX, complexo I + II + OXPHOX, respiração *ATP-linked* e capacidade respiratória máxima. Esses achados sugerem que a função mitocondrial no encéfalo dos animais permaneceu resiliente e o impacto metabólico da DH, nesse modelo, não foi suficientemente severo para comprometer diretamente a bioenergética mitocondrial do encéfalo. Possivelmente o encéfalo possui mecanismos compensatórios robustos que preservam a homeostase mitocondrial mesmo diante de desafios metabólicos crônicos, como a DH. Esses resultados contrastam com estudos que mostram alterações bioenergéticas mitocondriais em outros tecidos ou em modelos mais severos de disfunção metabólica. Em um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, utilizando camundongos jovens, o tratamento com DH associada a estreptozotocina no início da vida comprometeu a bioenergética em tecidos metabólicos e termogênicos. No hipocampo, houve redução no consumo de O<sub>2</sub> relacionado à produção de ATP e na capacidade respiratória máxima. No tecido adiposo marrom, a capacidade termogênica foi prejudicada, com ausência de redução no consumo de O<sub>2</sub> após inibição da UCP-1 e aumento da capacidade respiratória de reserva. E no fígado, a função mitocondrial também foi prejudicada (VILELA et al., 2023). Cormier e colaboradores (2019) investigou o impacto de uma DH na função mitocondrial e fisiológica de *Drosophila melanogaster* ao longo do tempo. Após dois dias de DH, houve um aumento na respiração mitocondrial e ATP nos músculos do tórax, provavelmente associado a uma maior utilização de carboidratos. No entanto, após quatro dias, observou-se comprometimento da respiração mitocondrial no complexo I, redução do ATP e maior contribuição do complexo II e da glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial (mG3PDH) para a respiração. Indicando inflexibilidade metabólica, levando a perda da homeostase e alteração do status redox celular (CORMIER et al., 2019). Diante desses dados, é importante ainda considerar outras variáveis, como estresse oxidativo, dinâmica mitocondrial (fusão e fissão) (KIM et al., 2019) ou a biogênese mitocondrial (KYRIAZIS

et al., 2022), que não foram avaliadas em nosso estudo, avaliações mais sensíveis à influência da DH.

A avaliação da atividade enzimática da AChE, LDH e GST permite compreender como o metabolismo de lipídios pode impactar diretamente o funcionamento neural. Dados da atividade dessas enzimas no encéfalo de peixes-zebra adultos juvenis, após 5-6 meses de dieta experimental, revelaram alterações específicas associadas a DH. Observou-se uma redução significativa na atividade da AChE no grupo DH em comparação ao grupo DC (Figura 9A), sugerindo um impacto direto na neurotransmissão colinérgica, essencial para regulação de processos cognitivos, motores e comportamentais. A AChE é responsável principalmente pela degradação da ACh, modulando a transmissão sináptica. A sua redução pode levar ao acúmulo de ACh na fenda sináptica, alterando a comunicação neuronal e o processamento de sinais no cérebro. Além disso, o acúmulo lipídico pode prejudicar a fluidez das membranas celulares, afetando a eficácia sináptica e contribuindo para déficits cognitivos, relacionados à memória, aprendizado e comportamento. Esses efeitos são frequentemente associados a condições de estresse oxidativo e inflamação (MORGANSTERN et al., 2012; REITZ; MAYEUX, 2014). Esses achados corroboram com estudos anteriores em ratos alimentados com DH, que demonstraram uma redução na atividade da AchE em regiões como córtex frontal, hipotálamo e mesencéfalo, sugerindo um aumento na expressão da ACh nessas áreas. Indicaram ainda que o consumo prolongado de DH suprime a ação da AChE, enquanto o consumo de curto prazo estimula o sistema colinérgico e o aumento de ácidos graxos livres circulantes também parece influenciar a função colinérgica (MARTINELLI et al., 2022).

Por outro lado, a atividade da LDH, uma enzima chave no metabolismo energético, não apresentou diferenças significativas entre os grupos (Figura 9B). A LDH está envolvida na glicólise anaeróbica, e condições de sobrecarga energética ou estresse oxidativo podem favorecer o aumento da sua atividade, resultando em maior produção de lactato. Esse desequilíbrio na utilização da glicose e lipídios como fontes energéticas pode levar ao acúmulo de metabólitos tóxicos, prejudicando a função neural (LI et al., 2022; MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2018). Da mesma forma, a GST, uma enzima fundamental na defesa antioxidante não apresentou alterações significativas na atividade entre os grupos (Figura 9C). Essa enzima desempenha um papel importante na neutralização de radicais livres, protegendo as células contra danos oxidativos. Sob condições de estresse

oxidativo elevado, sua atividade pode ser insuficiente para evitar danos celulares, inflamação e até apoptose neural, contribuindo para a degeneração celular (AOYAMA; NAKAKI, 2013; DRINGEN, 2000). No entanto, os dados indicam que a DH não impactou de forma relevante a capacidade antioxidante cerebral nas condições experimentais avaliadas.

Tais achados destacam a importância de investigar os efeitos no início da vida e a longo prazo de dietas desbalanceadas no neurodesenvolvimento e comportamento, considerando mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos. Estudos futuros poderiam explorar dietas com diferentes proporções de lipídios ou análises complementares, utilizando marcadores de estresse como o cortisol (YEHUDA et al., 2023), neurogênese (MAKANTASI; DERMON, 2014; STERLING et al., 2016) e estresse oxidativo (NUNES et al., 2019), para esclarecer melhor o impacto da DH no comportamento tipo-ansioso e metabolismo energético de larvas e peixes-zebra adultos.

## 7. CONCLUSÃO

Concluimos que a DH impactou o desenvolvimento morfometabólico e comportamental de larvas e adultos juvenis de peixe-zebra, com possíveis implicações para o metabolismo e o comportamento a longo prazo. Na fase larval, a DH promoveu aumento no comprimento corporal e na taxa de sobrevivência, mas também levou a um maior acúmulo de lipídios, sugerindo alterações no metabolismo lipídico. Embora as diferenças nos testes comportamentais não tenham sido estatisticamente significativas, a tendência de menor exploração do centro no teste de campo aberto pode indicar um comportamento tipo-ansioso induzido pela DH. Na fase adulta juvenil, a DH levou ao aumento no peso, comprimento corporal e IMC, além de uma tendência de maior glicemia, refletindo possíveis desequilíbrios metabólicos. O comportamento tipo ansioso foi mais evidente pela DH na fase adulto juvenil, com maior locomoção e menor exploração da área superior, características associadas a um comportamento tipo-ansioso. Embora a função mitocondrial não tenha sido alterada, a redução significativa na atividade da AChE sugere que a DH pode afetar a neurotransmissão e a plasticidade neuronal. Esses achados sugerem efeitos prejudiciais de dietas desbalanceadas, como a DH, a longo prazo no metabolismo e comportamento, destacando o modelo do peixe-zebra como eficaz para estudos do impacto de dietas desbalanceadas sobre o neurodesenvolvimento.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBINK, M. R. et al. The involvement of astrocytes in early-life adversity induced programming of the brain. **Glia**, v. 67, n. 9, p. 1637–1653, 30 set. 2019.

AGOSTINI, M. et al. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. **Cell Death & Differentiation**, v. 23, n. 9, p. 1502–1514, 8 set. 2016.

AOYAMA, K.; NAKAKI, T. Impaired Glutathione Synthesis in Neurodegeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 21021–21044, 18 out. 2013.

BITTENCOURT, A. et al. High fat diet-induced obesity causes a reduction in brain tyrosine hydroxylase levels and non-motor features in rats through metabolic dysfunction, neuroinflammation and oxidative stress. **Nutritional Neuroscience**, v. 25, n. 5, p. 1026–1040, 4 maio 2022.

BRADFORD, M. 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, maio 1976.

CAI, G. et al. Neonatal overfeeding attenuates acute central pro-inflammatory effects of short-term high fat diet. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, 13 jan. 2015.

CAPIOTTI, K. M. et al. Persistent impaired glucose metabolism in a zebrafish hyperglycemia model. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 171, p. 58–65, maio 2014.

CARNOVALI, M. et al. Metabolic and bone effects of high-fat diet in adult zebrafish. **Endocrine**, v. 61, n. 2, p. 317–326, 22 ago. 2018.

COLLELUORI, G. et al. Early Life Stress, Brain Development, and Obesity Risk: Is Oxytocin the Missing Link? **Cells**, v. 11, n. 4, p. 623, 11 fev. 2022.

CORMIER, R. P. J. et al. Dynamic mitochondrial responses to a high-fat diet in *Drosophila melanogaster*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4531, 14 mar. 2019.

CUNNINGHAM, S. A.; KRAMER, M. R.; NARAYAN, K. M. V. Incidence of Childhood Obesity in the United States. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 5, p. 403–411, 30 jan. 2014.

DAI, W. et al. High fat plus high cholesterol diet lead to hepatic steatosis in zebrafish larvae: a novel model for screening anti-hepatic steatosis drugs. **Nutrition & Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 42, 14 dez. 2015.

DE PAULA, G. C. et al. Hippocampal Function Is Impaired by a Short-Term High-Fat Diet in Mice: Increased Blood–Brain Barrier Permeability and Neuroinflammation as Triggering Events. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, 4 nov. 2021.

DE SOUZA, R. M. et al. Behavioural, metabolic and neurochemical effects of environmental enrichment in high-fat cholesterol-enriched diet-fed mice. **Behavioural Brain Research**, v. 359, p. 648–656, fev. 2019.

DEN BROEDER, M. et al. Altered Adipogenesis in Zebrafish Larvae Following High Fat Diet and Chemical Exposure Is Visualised by Stimulated Raman Scattering Microscopy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 894, 24 abr. 2017.

DORINA YLLI, M. P. S. S. M. M. P. T. P. M. AND K. D. B. MD. **Endocrine Changes in Obesity**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279053/>>. Acesso em: 20 dez. 2024.

DORSEMANS, A.-C. et al. Diabetes, adult neurogenesis and brain remodeling: New insights from rodent and zebrafish models. **Neurogenesis**, v. 4, n. 1, p. e1281862, 31 jan. 2017.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, v. 62, n. 6, p. 649–671, dez. 2000.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, jul. 1961.

ENGEL, D. F.; VELLOSO, L. A. The timeline of neuronal and glial alterations in experimental obesity. **Neuropharmacology**, v. 208, p. 108983, maio 2022.

ESTES, R. E. et al. Lipid Metabolism Influence on Neurodegenerative Disease Progression: Is the Vehicle as Important as the Cargo? **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 14, 20 dez. 2021.

FARRUGGIA, M. C.; SMALL, D. M. Effects of adiposity and metabolic dysfunction on cognition: A review. **Physiology & Behavior**, v. 208, p. 112578, set. 2019.

GARCÍA-CÁCERES, C. et al. Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 7–14, 10 jan. 2019.

GHADDAR, B. et al. Impaired brain homeostasis and neurogenesis in diet-induced overweight zebrafish: a preventive role from *A. borbonica* extract. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 14496, 2 set. 2020.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–9, 25 nov. 1974.

HAKALA, J. O. et al. Cardiovascular Risk Factor Trajectories Since Childhood and Cognitive Performance in Midlife: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **Circulation**, v. 143, n. 20, p. 1949–1961, 18 maio 2021.

HUTTER, E. et al. High-resolution respirometry—a modern tool in aging research. **Experimental Gerontology**, v. 41, n. 1, p. 103–109, jan. 2006.

KIM, J. D. et al. Microglial UCP2 Mediates Inflammation and Obesity Induced by High-Fat Feeding. **Cell Metabolism**, v. 30, n. 5, p. 952- 962.e5, nov. 2019.

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

KÜTTER, M. T. et al. Boas práticas na criação e manutenção de zebrafish (*Danio rerio*) em laboratório no Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 24, 2023.

KYRIAZIS, I. et al. The impact of diet upon mitochondrial physiology (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 50, n. 5, p. 135, 16 set. 2022.

LANDGRAF, K. et al. Short-term overfeeding of zebrafish with normal or high-fat diet as a model for the development of metabolically healthy versus unhealthy obesity. **BMC Physiology**, v. 17, n. 1, p. 4, 21 dez. 2017.

LANDHUIS, C. E. et al. Childhood Sleep Time and Long-Term Risk for Obesity: A 32-Year Prospective Birth Cohort Study. **Pediatrics**, v. 122, n. 5, p. 955–960, 1 nov. 2008.

LEIBOLD, S.; HAMMERSCHMIDT, M. Long-Term Hyperphagia and Caloric Restriction Caused by Low- or High-Density Husbandry Have Differential Effects on Zebrafish Postembryonic Development, Somatic Growth, Fat Accumulation and Reproduction. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0120776, 23 mar. 2015.

LEIGH, S.-J.; MORRIS, M. J. Diet, inflammation and the gut microbiome: Mechanisms for obesity-associated cognitive impairment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 6, p. 165767, jun. 2020.

LI, X. et al. Lactate metabolism in human health and disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 305, 1 set. 2022.

LIU, S. et al. Sleep Deprivation and Central Appetite Regulation. **Nutrients**, v. 14, n. 24, p. 5196, 7 dez. 2022.

LUZIO, A. et al. Effects of short-term exposure to genistein and overfeeding diet on the neural and retinal progenitor competence of adult zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology and Teratology**, v. 88, p. 107030, nov. 2021.

MAGISTRETTI, P. J.; ALLAMAN, I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 4, p. 235–249, 8 abr. 2018.

MAKANTASI, P.; DERMON, C. R. Estradiol treatment decreases cell proliferation in the neurogenic zones of adult female zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Neuroscience**, v. 277, p. 306–320, set. 2014.

MARTINELLI, I. et al. Obesity-Related Brain Cholinergic System Impairment in High-Fat-Diet-Fed Rats. **Nutrients**, v. 14, n. 6, p. 1243, 15 mar. 2022.

MOREIRA, A. L. P.; LUCHIARI, A. C. Effects of oxybenzone on zebrafish behavior and cognition. **Science of The Total Environment**, v. 808, p. 152101, fev. 2022.

MORGANSTERN, I. et al. Involvement of cholinergic mechanisms in the behavioral effects of dietary fat consumption. **Brain Research**, v. 1470, p. 24–34, ago. 2012.

MS, M. DA S. **Excesso de peso e obesidade**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saps/promocao-da-saude/excesso-de-peso-e-obesidade>>. Acesso em: 17 dez. 2024a.

MS, M. DA S. **É obesidade infantil?** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-brasil/eu-queroter-peso-saudavel/noticias/2021/e-obesidade-infantil>>. Acesso em: 16 dez. 2024b.

NELSON, C. A.; GABARD-DURNAM, L. J. Early Adversity and Critical Periods: Neurodevelopmental Consequences of Violating the Expectable Environment. **Trends in Neurosciences**, v. 43, n. 3, p. 133–143, mar. 2020.

NUNES, M. E. M. et al. Acute Exposure to Permethrin Modulates Behavioral Functions, Redox, and Bioenergetics Parameters and Induces DNA Damage and Cell Death in Larval Zebrafish. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–19, 11 nov. 2019.

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

OPAS, O. P.-A. DA S. **Alimentação saudável**. Disponível em: <[https://www.paho.org/pt/topicos/alimentacao-saudavel?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.paho.org/pt/topicos/alimentacao-saudavel?utm_source=chatgpt.com)>. Acesso em: 21 jan. 2025.

PAN, W. W.; MYERS, M. G. Leptin and the maintenance of elevated body weight. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 95–105, 11 fev. 2018.

PEREIRA, A. R.; OLIVEIRA, A. Dietary Interventions to Prevent Childhood Obesity: A Literature Review. **Nutrients**, v. 13, n. 10, p. 3447, 28 set. 2021.

PICOLO, V. 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, ago. 2021.

PONT, S. J. et al. Stigma Experienced by Children and Adolescents With Obesity. **Pediatrics**, v. 140, n. 6, 1 dez. 2017.

REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 640–651, abr. 2014.

SCHLEGEL, A.; STAINIER, D. Y. R. Microsomal Triglyceride Transfer Protein Is Required for Yolk Lipid Utilization and Absorption of Dietary Lipids in Zebrafish Larvae. **Biochemistry**, v. 45, n. 51, p. 15179–15187, 1 dez. 2006.

SCHMIDT, R.; STRÄHLE, U.; SCHOLPP, S. Neurogenesis in zebrafish – from embryo to adult. **Neural Development**, v. 8, n. 1, p. 3, 21 dez. 2013.

SEPÚLVEDA, A. R. et al. Feasibility, acceptability, and effectiveness of a multidisciplinary intervention in childhood obesity from primary care: Nutrition, physical activity, emotional regulation, and family. **European Eating Disorders Review**, v. 28, n. 2, p. 184–198, 4 mar. 2020.

SEWAYBRICKER, L. E. et al. The Significance of Hypothalamic Inflammation and Gliosis for the Pathogenesis of Obesity in Humans. **Endocrine Reviews**, v. 44, n. 2, p. 281–296, 4 mar. 2023.

SON, G. et al. miR-124 coordinates metabolic regulators acting at early stages of human neurogenesis. **Communications Biology**, v. 7, n. 1, p. 1393, 25 out. 2024.

SON, G.; HAN, J. Roles of mitochondria in neuronal development. **BMB Reports**, v. 51, n. 11, p. 549–556, 30 nov. 2018.

STAVROU, S. et al. The effectiveness of a stress-management intervention program in the management of overweight and obesity in childhood and adolescence. **Journal of molecular biochemistry**, v. 5, n. 2, p. 63–70, 2016.

STERLING, M. E. et al. Effects of embryonic ethanol exposure at low doses on neuronal development, voluntary ethanol consumption and related behaviors in larval and adult zebrafish: Role of hypothalamic orexigenic peptides. **Behavioural Brain Research**, v. 304, p. 125–138, maio 2016.

TOUCHETTE, É. et al. Associations Between Sleep Duration Patterns and Overweight/Obesity at Age 6. **Sleep**, v. 31, n. 11, p. 1507–1514, nov. 2008.

TRACEY, T. J. et al. Neuronal Lipid Metabolism: Multiple Pathways Driving Functional Outcomes in Health and Disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, 23 jan. 2018.

USDA, U. S. D. OF A. **Eggs, Grade A, Large, egg yolk**. Disponível em: <<https://fdc.nal.usda.gov/food-details/748236/nutrients>>. Acesso em: 2 fev. 2025.

VAN DE SANDE-LEE, S.; VELLOSO, L. A. Disfunção hipotalâmica na obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, n. 6, p. 341–350, ago. 2012.

VILELA, W. R. et al. Early-life metabolic dysfunction impairs cognition and mitochondrial function in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 117, p. 109352, jul. 2023.

VILELA, W. R. et al. Metabolic dysfunction induced by HFD + L-NAME preferentially affects hippocampal mitochondria, impacting spatial memory in rats. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 56, n. 2, p. 87–99, 20 abr. 2024.

WANG, Q. et al. FGF21 Attenuates High-Fat Diet-Induced Cognitive Impairment via Metabolic Regulation and Anti-inflammation of Obese Mice. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 6, p. 4702–4717, 15 jun. 2018.

WEIHRAUCH-BLÜHER, S.; WIEGAND, S. Risk Factors and Implications of Childhood Obesity. **Current Obesity Reports**, v. 7, n. 4, p. 254–259, 13 dez. 2018.

WHO, W. H. O. **Noncommunicable diseases: Childhood overweight and obesity**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/noncommunicable-diseases-childhood-overweight-and-obesity>>. Acesso em: 16 dez. 2024.

WHO, W. H. O. **Obesidade e sobrepeso**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 17 dez. 2024.

WILLIAMS, L. M. Hypothalamic dysfunction in obesity. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 4, p. 521–533, 6 nov. 2012.

WORLD OBESITY, W. O. F. **World Obesity Atlas 2024**. Disponível em: <[https://www.worldobesityday.org/assets/downloads/WOF\\_Obesity\\_Atlas\\_2024.pdf](https://www.worldobesityday.org/assets/downloads/WOF_Obesity_Atlas_2024.pdf)>. Acesso em: 17 dez. 2024.

WROBLEWSKI, F.; LADUE, J. S. Lactic Dehydrogenase Activity in Blood. **Experimental Biology and Medicine**, v. 90, n. 1, p. 210–213, 1 out. 1955.

YANG, C. et al. Effects of Prolonged High-Fat Diet Consumption Starting at Different Ages on Behavioral Parameters and Hippocampal Neuroplasticity in Male Mice. **Journal of Integrative Neuroscience**, v. 22, n. 1, 13 jan. 2023.

YANG, Y. et al. Early-life high-fat diet-induced obesity programs hippocampal development and cognitive functions via regulation of gut commensal *Akkermansia muciniphila*. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 12, p. 2054–2064, 17 nov. 2019.

YEHUDA, H. et al. Inversely Regulated Inflammation-Related Processes Mediate Anxiety–Obesity Links in Zebrafish Larvae and Adults. **Cells**, v. 12, n. 13, p. 1794, 6 jul. 2023.

YURTDAS, G. et al. The effects of Mediterranean diet on hepatic steatosis, oxidative stress, and inflammation in adolescents with <sc>non-alcoholic</sc> fatty liver disease: A randomized controlled trial. **Pediatric Obesity**, v. 17, n. 4, 8 abr. 2022.

ZHANG, P. et al.  $\beta$ -Sitosterol Reduces the Content of Triglyceride and Cholesterol in a High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Zebrafish (*Danio rerio*) Model. **Animals**, v. 14, n. 9, p. 1289, 25 abr. 2024.

ZHENG, X. et al. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. **eLife**, v. 5, 10 jun. 2016.

ZHOU, J. et al. Rapid analysis of hypolipidemic drugs in a live zebrafish assay. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 72, p. 47–52, mar. 2015.

ZHUANG, H. et al. Long-term high-fat diet consumption by mice throughout adulthood induces neurobehavioral alterations and hippocampal neuronal remodeling accompanied by augmented microglial lipid accumulation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 100, p. 155–171, fev. 2022.