



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Biologia
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

WHITNEY RIBEIRO SANTOS

**EFEITO INTERGERACIONAL DE DIETA RICA EM GORDURA SOBRE
DESFECHOS METABÓLICOS E DO NEURODESENVOLVIMENTO DA
PROLE DO PEIXE-ZEBRA**

Brasília - DF

2025

WHITNEY RIBEIRO SANTOS

**EFEITO INTERGERACIONAL DE DIETA RICA EM GORDURA SOBRE
DESFECHOS METABÓLICOS E DO NEURODESENVOLVIMENTO DA
PROLE DO PEIXE-ZEBRA**

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

Orientação: Prof^a. Dr^a. Andreza Fabro de Bem

Brasília – DF

2025

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Tuliper e Ângela, pelo apoio, amor e carinho ao longo da minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me manter firme em toda minha caminhada e por sempre me lembrar que é possível a realização dos meus sonhos. Agradeço à Maria, que sempre me guardou e passou na frente de todos os meus passos ao longo desse caminho.

Agradeço à minha orientadora, Dr^a. Andreza Fabro de Bem pelos ensinamentos, pela paciência e compreensão durante todo o percurso de realização do meu trabalho. Você me inspira como pesquisadora com o seu exemplo de perseverança e dedicação à ciência. Também agradeço aos professores, Dr. Jair Trapé Goulart e Dr^a. Paula Quaglio por serem grandes incentivadores do meu trabalho desde a iniciação científica, por serem apoio e sempre contribuírem para o meu crescimento acadêmico.

Aos colegas do Lab de Bem, pela disponibilidade em participar dos meus experimentos, aprendizado, discussões enriquecedoras e ajuda na resolução dos problemas e principalmente pela amizade ao longo dessa caminhada. Em especial agradeço a minha amiga de laboratório Letícia Alves Tavares, por ser fundamental na realização do meu projeto por não medir esforços em me ajudar, por sempre doar o seu perfeccionismo, organização, dedicação e pôr está sempre presente nos momentos mais difíceis me ajudando a superar os obstáculos no decorrer deste trabalho.

Aos meus pais, pelo exemplo de comprometimento, esforço, dedicação e amor. A fé e a perseverança de vocês foram essenciais para eu me manter forte perante as dificuldades. Além disso, agradeço a toda assistência necessária e por abdicarem da realização dos sonhos de vocês para investirem nos meus. Meus irmãos, que foram grandes incentivadores e conforto nas horas difíceis. Ao meu namorado, Felipe Melo, que compartilhou de todos os momentos deste trabalho comigo, das alegrias e das dores e por sempre me ajudar a superar adversidades.

À CAPES, à FAPDF e ao CNPq pelo apoio financeiro.

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.
Agora é hora de compreender mais para temer menos."

Marie Curie

RESUMO

A ingestão crônica de dieta desequilibrada rica em gordura ao longo da vida pode estar associada a alterações metabólicas e disfunções cerebrais, incluindo modificações no comportamento. O padrão de alimentação familiar nos últimos anos, com uma maior facilidade de acesso e consumo de alimentos ultraprocessados, tem afetado a saúde metabólica. Evidências demonstram que o consumo parental de dieta desequilibrada pode influenciar a saúde dos descendentes, gerando implicações que podem ser persistentes a curto e longo prazo. Essas complicações incluem uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos e propensão a disfunções comportamentais. Para investigar os efeitos intergeracionais de uma dieta rica em gorduras sobre parâmetros metabólicos e do neurodesenvolvimento na prole do peixe-zebra, empregamos um protocolo multifatorial em que os progenitores (geração F0, machos e fêmeas) foram alimentados com dieta controle (DC) ou dieta hiperlipídica (DH). Após 36 dias com as diferentes dietas, os grupos F0 foram colocados para reprodução e produção de descendência, e os efeitos intergeracionais das dietas na prole (F1) foram avaliados. Análises comportamentais, metabólicas e bioquímicas foram realizadas nos progenitores e na prole. O consumo de DH pelos progenitores provocou um aumento significativo do peso corporal tanto em fêmeas como nos machos da geração F0. No teste do tanque novo, que avalia a atividade motora e o comportamento tipo ansioso, a DH provocou uma redução na distância total percorrida pelas fêmeas F0, mas não afetou este comportamento nos machos. Além disso, a DH diminuiu a exploração da zona superior tanto em fêmeas e machos da geração F0 sugerindo comportamento tipo ansioso nos animais. A prole (F1), oriunda de progenitores dos grupos DC ou DH, foi alimentada exclusivamente com DC até 5 meses pós-fertilização (mpf), quando foi então subdividida em quatro grupos experimentais (9–11 animais/grupo) e alimentada por 14-16 dias com dieta DC ou DH. Os grupos foram compostos por prole de progenitores DC alimentados com DC ou DH, e prole de progenitores alimentados com DH alimentados com DC ou DH. Em relação à prole (F1), a DH afetou a viabilidade dos ovos e a sobrevivência das larvas até os 15 primeiros dias de vida. A ingestão de DH nos progenitores induziu aumento significativo do peso corporal dos descendentes. A prole (F1) alimentada com DH por 14-18 dias apresentou modificações comportamentais semelhantes às dos progenitores, com redução do índice de exploração, caracterizando um comportamento

tipo ansioso. O metabolismo mitocondrial no encéfalo da prole foi afetado pela dieta parental. Os animais em que os progenitores foram alimentados com DH apresentaram um menor consumo de oxigênio mitocondrial no Complexo I. Houve um padrão de interação entre os fatores progenitores e dieta nos demais estados mitocondriais, com diminuição do consumo de oxigênio dependente da ingestão parental e pela prole da DH. Concluímos que a DH induziu mudanças morfométricas tanto nos progenitores como na prole. Os descendentes dos progenitores alimentados com DH apresentaram maior suscetibilidade ao aumento no ganho de peso, redução significativa na viabilidade de ovos e na sobrevivência larval e prejuízo no metabolismo mitocondrial no encéfalo. Observamos ainda o efeito da DH, sem a influência da alimentação parental, sobre a redução do tempo de exploração na zona superior do aquário e do índice de exploração na prole. Esses achados destacam o peixe-zebra como um modelo eficaz para estudar os efeitos intergeracionais da DH na prole do peixe-zebra.

Palavras-chaves: Peixe-zebra, dieta hiperlipídica, metabolismo mitocondrial, comportamento, intergeracional.

ABSTRACT

Chronic intake of an imbalanced, fat-rich diet throughout life may be associated with metabolic alterations and brain dysfunctions, including behavioral changes. The family eating patterns in recent years, with greater access to and consumption of ultraprocessed foods, have impacted metabolic health. Evidence suggests that parental consumption of an imbalanced diet may influence the health of offspring, leading to implications that could persist both in the short and long term. These complications include increased susceptibility to the development of metabolic disorders and a tendency toward behavioral dysfunctions. To investigate the intergenerational effects of a fat-rich diet on metabolic parameters and neurodevelopment in offspring of the zebrafish, we employed a multifactorial protocol in which parents (F0 generation, males and females) were fed either a control diet (CD) or a high-fat diet (HFD). After 36 days on the different diets, the F0 groups were placed for reproduction and offspring production, and the intergenerational effects of the diets on the offspring (F1) were evaluated. Behavioral, metabolic, and biochemical analyses were performed on both the parents and the offspring. The consumption of HFD by the parents caused a significant increase in body weight in both females and males of the F0 generation. In the novel tank test, which evaluates motor activity and anxiety-like behavior, HFD caused a reduction in the total distance traveled by female F0, but did not affect this behavior in males. Moreover, HFD decreased exploration of the upper zone in both female and male F0, suggesting anxiety-like behavior in the animals. The offspring (F1), originating from parents in the CD or HFD groups, were fed exclusively with CD until 5 months post-fertilization (mpf), when they were subdivided into four experimental groups (9–11 animals/group) and fed for 14–16 days with either CD or HFD. The groups consisted of offspring from CD-fed parents fed either CD or HFD, and offspring from HFD-fed parents fed either CD or HFD. Regarding the offspring (F1), HFD affected egg viability and larval survival up to the first 15 days of life. Parental intake of HFD induced a significant increase in the body weight of the descendants. The F1 offspring fed HFD for 14–18 days exhibited behavioral modifications similar to those of the parents, with a reduction in the exploration index, characterizing anxiety-like behavior. Mitochondrial metabolism in the offspring's brain was affected by the parental diet. Animals with HFD-fed parents showed lower mitochondrial oxygen consumption at Complex I. There was an interaction pattern

between the parental and diet factors in the other mitochondrial states, with decreased oxygen consumption dependent on both the parental and offspring HFD intake. We concluded that HFD induced morphometric changes in both the parents and offspring. Descendants of parents fed with HFD exhibited greater susceptibility to increased weight gain, a significant reduction in egg viability and larval survival, and impairment of mitochondrial metabolism in the brain. We also observed the effect of HFD, without the influence of parental feeding, on the reduction of exploration time in the upper zone of the aquarium and exploration index in the offspring. These findings highlight the zebrafish as an effective model for studying the intergenerational effects of DH on zebrafish offspring.

Keywords: Zebrafish, high-fat diet, mitochondrial metabolism, behavior, intergenerational.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos intergeracionais e transgeracionais.....	19
Figura 2: Fosforilação oxidativa.. ..	25
Figura 3: Protocolo experimental.....	31
Figura 4: Efeito da DH nos parâmetros morfometabólicos.....	39
Figura 5: Efeito da DH nos parâmetros morfometabólicos.....	40
Figura 6: Análise comportamental em adultos.....	42
Figura 7: Análise comportamental em adultos.....	42
Figura 8: A DH não causou prejuízo cognitivo nos animais.....	43
Figura 9: A DH não causou prejuízo cognitivo nos animais.....	44
Figura 10: A DH não alterou o metabolismo energético no encéfalo dos animais.	45
Figura 11: A DH não alterou o metabolismo energético no encéfalo dos animais.	46
Figura 12: A DH prejudicou a sobrevivência da prole.....	47
Figura 13: Efeito da DH dos progenitores (F0) na prole (F1).....	49
Figura 14: A ingestão de DH pelos progenitores (F0) não causou alterações comportamentais na prole (F1).....	50
Figura 15: A prole sofreu danos mitocondriais no encéfalo devido ao consumo de DH pelos progenitores.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais: Progenitores adultos F0 (machos ou fêmeas) e prole (F1)	33
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina sérica bovina - Bovine serum albumin
CCCP	Cianeto de carbonila 3-clorofenil-hidrazona
CoQ	ubiquinona CoQ
DC	Dieta controle
DH	Dieta hiperlipídica
HFD	Dieta rica em gordura – High fat diet
DIO	Obesidade induzida por dieta
DOHaD	Origens do Desenvolvimento da Saúde e da Doença
DPF	Dias pós-fertilização
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ETC	Cadeia transporte de elétrons
F1DC	Alimentados com dieta controle
F1 DH	Alimentados com dieta hiperlipídica
F0	Progenitores
F1	Prole
FADH ₂	Flavina Adenina Dinucleotídeo
IGF2	Fator de crescimento semelhante à insulina II
IM	Espaço intermembranar
IMC	Índice de massa corporal
mHFD	Dieta materna rica em gordura
MPF	Meses pós-fertilização
mtDNA	DNA mitocondrial
MR	Meio de reação
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
OMY	Oligomicina
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORO	Corante <i>Oil Red O</i>
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PFA	Paraformaldeído
PH	Concentração de prótons
PM	Piruvato e Malato
QH2	Ubiquinol QH2
RAR	Respirometria de alta resolução
RNA	Ácido ribonucleico
ROT	Rotenona
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S	Succinato
SNC	Sistema nervoso central
TCA	Ácido tricarboxílico
TNT	Teste de tanque novo
TLT	Teste de labirinto em T
UPFs	Alimentos ultraprocessados

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 <i>Efeito das dietas desbalanceadas sobre o metabolismo e o comportamento ..</i>	<i>16</i>
1.2 <i>Transmissão intergeracional dos efeitos da obesidade</i>	<i>18</i>
1.3 <i>Peixe-zebra como modelo de desordens metabólicas.....</i>	<i>21</i>
1.4 <i>Impacto da dieta obesogênica sobre a mitocôndria</i>	<i>23</i>
1.5 <i>Disfunção mitocondrial e Regulação Epigenética em peixe-zebra: Evidências de Efeitos intergeracionais</i>	<i>26</i>
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS	30
3.1 <i>Objetivo Geral</i>	<i>30</i>
3.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>30</i>
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 <i>Animais</i>	<i>31</i>
4.2 <i>Protocolo experimental.....</i>	<i>31</i>
4.3 <i>Parâmetros metabólicos</i>	<i>34</i>
4.3.1 <i>Caracterização da obesidade.....</i>	<i>34</i>
4.3.2 <i>Retirada de sangue e encéfalo</i>	<i>35</i>
4.4 <i>Análises comportamentais</i>	<i>35</i>
4.4.1 <i>Teste de tanque novo (TTN).....</i>	<i>35</i>
4.4.2 <i>Teste de labirinto em T (TLT)</i>	<i>36</i>
4.5 <i>Análise Bioenergética</i>	<i>37</i>
4.5.1 <i>Avaliação do consumo de oxigênio</i>	<i>37</i>
4.6 <i>Análise estatística</i>	<i>38</i>
5. RESULTADOS	39
5.1 <i>Efeito da DH sobre os progenitores.....</i>	<i>39</i>
5.1.1 <i>Efeito da DH sobre parâmetros morfometabólicos nos progenitores fêmeas (F0).....</i>	<i>39</i>
5.1.2 <i>Efeito da DH sobre parâmetros morfometabólicos nos progenitores machos (F0).....</i>	<i>40</i>
5.1.3 <i>Impacto da DH sobre comportamento exploratório e tipo-ansioso em progenitores fêmeas.....</i>	<i>41</i>
5.1.7 <i>A DH não alterou o consumo de oxigênio mitocondrial no encéfalo de progenitores fêmeas (F0).....</i>	<i>45</i>

5.1.8 A DH não alterou o Consumo de oxigênio mitocondrial no encéfalo de progenitores machos s (F0)	46
5.2 <i>Efeito da DH sobre a prole</i>	47
5.2.1 A DH dos progenitores (F0) afetou a viabilidades de ovos e a sobrevivência larval da prole (F1)	47
5.2.2 Efeito da dieta dos progenitores (F0) sobre o peso corporal da prole (F1)	48
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 Efeito das dietas desbalanceadas sobre o metabolismo e o comportamento

Dietas não saudáveis, caracterizadas pelo alto consumo de açúcar, gordura, sódio, amido e carnes vermelhas, somadas à ingestão excessiva de calorias e pobreza nutricional, têm sido associadas a prejuízos na saúde (CHUNG et al., 2022; FANZO; DAVIS, 2019). O consumo excessivo desses nutrientes, associado ao sedentarismo, e ao baixo gasto energético contribui para o acúmulo excessivo de gordura corporal e está relacionado a impactos negativos à saúde metabólica (RAIMAN et al., 2023; SAÚDE, 2024). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), dietas prejudiciais à saúde desempenha um papel crítico no aumento da prevalência de condições crônicas, como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e outras comorbidades associadas à obesidade (SAÚDE, 2023).

No sistema nervoso central (SNC), a cognição pode ser comprometida por dietas ocidentalizadas. Evidências clínicas e experimentais apontam relação etiológica entre o consumo excessivo de gordura saturada e açúcares simples com o crescimento da prevalência da doença de Alzheimer (BERRINO, 2002; PASINETTI; EBERSTEIN, 2008) e formas mais leves de declínio cognitivo (ESKELINEN et al., 2008; JURDAK; LICHTENSTEIN; KANAREK, 2008). De fato, o consumo elevado de dieta rica em gordura é associado a disfunções na memória e aprendizado em crianças (BAYM et al., 2014), adultos (GOMES GONÇALVES et al., 2023) e em idosos (GARDENER, 2014), demonstrando que o consumo excessivo de gordura na dieta prejudica a cognição em todas as fases da vida (BAYM et al., 2014; GARDENER et al., 2015; GOMES GONÇALVES et al., 2023).

Um estudo multicêntrico recente, com 10.775 indivíduos, avaliou o consumo de alimentos ultraprocessados (UPFs) por uma porcentagem da população brasileira no período compreendido entre 2008 a 2019. Os indivíduos que tiveram um consumo de UPFs maior do que 19,9% de calorias diárias apresentaram um declínio na performance cognitiva e uma taxa acelerada de declínio cognitivo global (GOMES GONÇALVES et al., 2023). Em crianças e adolescentes, o sobrepeso e obesidade têm sido associados não apenas a desfechos metabólicos negativos na fase adulta, mas também a um aumento na prevalência de distúrbios psiquiátricos, como a depressão (RAO et al., 2020). Um estudo longitudinal avaliou uma coorte populacional de crianças com idade entre 3 e 18 anos

pelo período de 31 anos. Demonstrou que o aumento da pressão arterial sistólica, colesterol total e obesidade na infância está associado a prejuízos na memória episódica e aprendizagem associativa durante a fase adulta. Além disso, sobrepeso e obesidade persistentes desde a infância até a fase adulta estão relacionados a um comprometimento do processamento visual e da atenção sustentada (HAKALA et al., 2021). Essas evidências fortalecem a relação entre o consumo de dieta rica em gordura e açúcares, desregulação metabólica e predisposição à disfunção cognitiva.

Além disso, um estudo com crianças de 4 a 12 anos demonstrou que a influência de um estilo de vida negativo dos parentais, como a inatividade física, hábitos alimentares inadequados e uso excessivo de telas, exercem impacto significativo na saúde dos descendentes (KONTOCHRISTOPOULOU et al., 2024). Durante a gestação, a obesidade materna, particularmente no período periconcepcional, está associada a complicações como diabetes gestacional, pré-eclâmpsia e parto de bebês macrossômicos, além de efeitos de curto e longo prazo na saúde cognitiva dos descendentes (BASATEMUR et al., 2013; GODFREY et al., 2017). Em síntese, o padrão alimentar inadequado das famílias apresenta não apenas um impacto imediato sobre a saúde metabólica, mas também efeitos transgeracionais que podem comprometer o SNC da prole. Esses achados destacam a relevância de investigar os mecanismos subjacentes às alterações metabólicas e comportamentais induzidas por dietas desbalanceadas, especialmente em fases críticas do desenvolvimento, para orientar estratégias de prevenção e intervenção eficazes.

Modelos animais de ingestão de dietas ricas em gorduras saturadas e açúcares refinados têm sido frequentemente utilizados para indução de condições relacionada a disfunções metabólicas, como a obesidade, hipertensão arterial, hiperglicemia e hipercolesterolemia corroborando a robustez de dados observados em humanos (DE BEM et al., 2021). Evidências experimentais em roedores reforçam os achados epidemiológicos que sugerem que o consumo de DH está ligada ao desenvolvimento de fatores de risco metabólico e prejuízos nas funções cerebrais (DE SOUZA et al., 2019; FUENTES et al., 2023). Roedores alimentados com uma dieta rica em açúcar/gordura apresentaram aumento significativo do peso corporal, da glicemia, resistência à insulina, inflamação sistêmica e acúmulo de gordura, alteração no metabolismo de lipídios e elevação de biomarcadores de estresse oxidativo em órgão metabolicamente ativos (MORENO-FERNÁNDEZ et al., 2018).

Por outro lado, o consumo de DH tem sido associado à indução de comportamentos ansiosos, depressivos, bem como déficits de memória e aprendizagem em roedores (FUENTES et al., 2023; ZHUANG et al., 2022). Dados do nosso grupo também demonstram o impacto da DH sobre funções cerebrais. Observamos que o consumo de DH por um período curto de tempo provocou comprometimento cognitivo em memória de reconhecimento, comportamento tipo depressivo, aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e diminuição da capacidade oxidativa de mitocôndria hipocámpais de camundongos Swiss (DE PAULA et al., 2021).

1.2 Transmissão intergeracional dos efeitos da obesidade

A transmissão intergeracional refere-se ao processo pelo qual características dos progenitores influenciam gerações subsequentes por meio de fatores ambientais, comportamentais e predisposição genética (BRANJE et al., 2020; SANTILLI; BOSKOVIC, 2023). Estudos demonstram que a saúde dos progenitores impacta diretamente seus descendentes, gerando efeitos que podem ser persistentes a curto e longo prazo, sejam eles benéficos ou prejudiciais (KALMIJN, 2022).

De acordo com a hipótese das “Origens do Desenvolvimento da Saúde e da Doença” (DOHaD), o ambiente nos primeiros estágios da vida influencia o desenvolvimento e pode aumentar a susceptibilidade a doenças na fase adulta (BARKER, 1995; HEINDEL et al., 2015). A transmissão intergeracional pode ser modulada tanto por fatores maternos quanto paternos, incluindo a exposição ambiental das células gaméticas, dieta, contato com toxinas e tabagismo. Além disso, aspectos específicos do sexo desempenham um papel relevante, como a herança materna do ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA), o ambiente intrauterino, a função placentária e a microbiota vaginal, além de mecanismos epigenéticos associados ao esperma e ao fluido seminal paternos (PATTI, 2013; SU; PATTI, 2019).

A herança epigenética envolve modificações na expressão gênica que não alteram a sequência do DNA, sendo classificadas como **intergeracionais**, quando afetam diretamente a geração F1 devido a mudanças nos gametas, ou **transgeracionais**, quando os efeitos se propagam para gerações subsequentes (F2 e F3) sem exposição direta ao fator desencadeante (F0) (HEINDEL et al., 2015; INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES, 2018; JIANG et al., 2022; SANTILLI; BOSKOVIC, 2023). Durante o desenvolvimento, adversidades nutricionais, exposição a toxinas e estresse

podem modular marcas epigenéticas, como a metilação do DNA, modificações de histonas e regulação por ácido ribonucleico (RNA) não codificantes, impactando tanto células somáticas quanto germinativas e perpetuando alterações metabólicas ao longo das gerações (HEINDEL et al., 2017; PATEL; SRINIVASAN, [s.d.]; ZHU; CAO; LI, 2019).

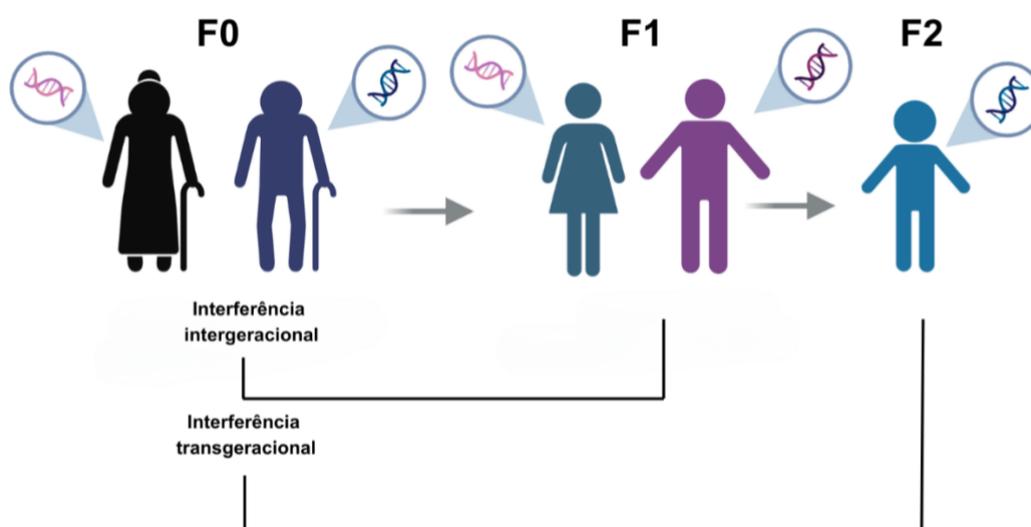


Figura 1: Efeitos intergeracionais e transgeracionais. Os efeitos intergeracionais ocorrem nos filhos (F1) e os efeitos transgeracionais ocorrem nos netos (F2) e bisnetos (F3) da mesma geração (F0). Criado em BioRender. De bem, L. (2025) <https://BioRender.com/s87y521>.

O estresse nutricional por desequilíbrio dietético pode ocorrer antes, durante ou após a concepção tendo impacto na programação metabólica a longo prazo (INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES, 2018; SANTILLI; BOSKOVIC, 2023). Esse fenômeno foi amplamente estudado em modelos animais e humanos. Por exemplo, a prole de roedores submetidos à dieta materna rica em gordura (mHFD) apresentou alterações na vascularização cortical, desregulação na resposta imunológica cerebral e comportamental, como ansiedade e movimentos repetitivos (BORDELEAU et al., 2022). Em humanos, Heijmans et al. (2008) destacaram o impacto de eventos adversos na primeira infância e a sua associação com alterações epigenéticas na fase adulta, observando redução na metilação do fator de crescimento semelhante à insulina II (IGF2) em descendentes expostos à desnutrição periconcepcional (HEIJMANS et al., 2008). Por outro lado, a supernutrição lipídica e glicídica no período perinatal pode modificar o epigenoma nuclear dos descendentes, perpetuando riscos para doenças cardiovasculares, obesidade, síndrome metabólica e disfunção endócrinas (JAEGER; SABEN; MOLEY,

2017). O consumo de HFD pode modular alterações epigenéticas e proporcionar o desenvolvimento de outras desordens metabólicas. Por exemplo, a nutrição crônica com HFD pode promover reprogramação epigenética alterando a metilação do DNA do tecido adiposo branco. Além disso, o estresse promovido pelo consumo de uma HFD pode levar à transcrição anormal de gene, promovendo anomalias congênitas (RAI, 2025). Roedores machos alimentados com HFD por 12 semanas apresentaram regiões diferencialmente metiladas em espermatozoides (DE CASTRO BARBOSA et al., 2016).

O Millennium Cohort Study revelou associação entre o índice de massa corporal (IMC) pré-gestacional materno e desempenho cognitivo reduzido em crianças de 5 e 7 anos de idade (BASATEMUR et al., 2013). Modelos experimentais em roedores e primatas expõem que obesidade materna afeta a prole, induzindo obesidade, diabetes, hipertensão, esteatose hepática e alterações comportamentais devido a mudanças no metabolismo materno e função placentária (GODFREY et al., 2017).

Além disso, a obesidade parental, especialmente materna, amplifica os riscos para obesidade infantil e resistência à insulina, como relatado em estudos pediátricos (MARTÍNEZ-VILLANUEVA et al., 2019). Apesar das limitações dos estudos epidemiológicos humanos, modelos animais oferecem vantagem para a análise da transmissão hereditária devido ao curto ciclo reprodutivo, custo acessível e similaridade fisiológica com os humanos (INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES, 2018).

Por exemplo, o consumo paterno de DH foi associado a fenótipos metabólicos prejudiciais na prole, incluindo intolerância à glicose/insulina e alteração na expressão gênica hepática e de adipócitos (SANTILLI; BOSKOVIC, 2023). Descendentes de pais submetidos a DH apresentam hipertrofia de adipócitos e cardiomiócitos, inflamação do tecido adiposo, resistência à insulina e disfunções cardiovasculares manifestadas da infância à fase adulta (INZANI; OZANNE, 2022).

Adicionalmente, Lin e colaboradores (2021) relataram comprometimento da plasticidade sináptica e memória hipocampal na prole de roedores machos submetidos à DH durante a gestação. Outro estudo, demonstrou que a dieta obesogênica materna durante a gravidez e lactação comprometem a neurogênese adulta, resultando em déficits cognitivos, ansiedade e distúrbio de nocicepção na prole (FABIANOVÁ et al., 2022; LIN et al., 2021).

1.3 Peixe-zebra como modelo de desordens metabólicas

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno teleósteo de água doce originário do sul da Ásia. É conhecido popularmente como paulistinha e amplamente utilizado em aquarismo. Esse organismo apresenta expectativa de vida de 2 a 4 anos, mede entre 3 e 4 cm e exibe dimorfismo sexual marcante. São organismos ovíparos, caracterizados pela fertilização externa e sem cuidado parental, ciclo reprodutivo curto e elevada taxa de fecundação (200 ovos/fêmea). A desova das fêmeas é estimulada pela presença dos machos. A biologia molecular e embriológica das células germinativas do peixe-zebra é semelhante à dos humanos, os peixes-zebras machos apresentam um par de testículos e as fêmeas possuem ovário. O ciclo de vida dos animais tem início com a liberação dos óvulos pelas fêmeas e espermatozoides pelos machos, com fertilização externa dos ovos. A eclosão dos ovos ocorre 48-95 horas depois da fertilização. Seus embriões e larvas são translúcidos, facilitando a observação, e possuem um rápido ciclo de desenvolvimento (DAMMSKI et al., [s.d.]; LICITRA et al., 2024; NASIADKA; CLARK, 2012; RESENDE; SOCCOL, 2015). O peixe-zebra é um modelo eficiente para estudos de toxicidade transgeracional. No entanto, as restrições do seu uso são as limitações de estudo de efeitos placentários devido à ausência de um período gestacional, como o que ocorre em mamíferos (ZHAO et al., 2024).

Devido às suas características biológicas, o peixe-zebra é um modelo emergente em pesquisa translacional destinadas à elucidação de mecanismos biológicos e ao estudo de diversas doenças humanas. Ele compartilha cerca de 70% dos genes humanos (HOWE et al., 2013) e apresenta similaridades fenotípicas e anatômicas com humanos (GUT et al., 2017; OKA et al., 2010; ZANG; MADDISON; CHEN, 2018). Estudos mitocondriais também destacam a conservação do DNA mitocondrial (mtDNA) e das proteínas nucleares entre o peixe-zebra e os humanos, com aproximadamente 70% de similaridade no mtDNA (STEELE; PRYKHOZHII; BERMAN, 2014).

O peixe-zebra está sendo amplamente utilizado em pesquisas científicas devido às suas vantagens em relação aos roedores, tais como seu baixo custo, rápido desenvolvimento e alta fecundidade (RESENDE; SOCCOL, 2015). Ele tem sido amplamente utilizado para investigar distúrbios metabólicos, como hiperglicemia, diabetes e obesidade (GHADDAR; DIOTEL, 2022). O peixe-zebra apresenta semelhanças com órgãos e tecidos envolvidos na homeostase energética em mamíferos,

incluindo órgãos digestivos, tecido adiposo e músculos esqueléticos (ZANG; MADDISON; CHEN, 2018).

A dieta comumente utilizada em laboratórios de peixe-zebra é composta por náuplios de *Artêmia (Artemia salina)* e dietas comerciais (LAWRENCE et al., 2012). Modelos de obesidade no peixe-zebra são alcançados por meio de uma alta ingestão de gordura seja, por uma superalimentação ou pelo consumo excessivo gema de ovo cozido de galinha. A obesidade por supernutrição pode ser desenvolvida já nos primeiros dias de vida. Nesse sentido, diversos modelos de obesidade já foram descritos para peixe-zebra, incluindo DIO e modelos genéticos (ZANG; MADDISON; CHEN, 2018). O modelo DIO, por exemplo, pode ser alcançado em peixe-zebra adulto usando dietas ricas em gordura, açúcar e/ou colesterol, levando ao aumento do peso corporal, índice de massa corporal, teor de gordura visceral e subcutânea, esteatose e alteração metabólica, como aumento da glicemia de jejum, colesterol e níveis de triglicerídeos (LANDGRAF et al., 2017; MEGURO; HASUMURA; HASE, 2015; OKA et al., 2010). O modelo de obesidade induzida por dieta (DIO) em peixe-zebra reproduz complicações multifatoriais complexas semelhantes às observadas em mamíferos eleva os níveis de triglicerídeos plasmáticos, IMC e provoca hepatoesteatose (OKA et al., 2010). Numerosos estudos na literatura demonstram que a ingestão de gema de ovo por peixe-zebra promove um fenótipo obeso nos animais, resultando consequentemente em aumento gradual de peso, comprimento corporal e abdominal, glicemia em jejum e IMC (LI et al., 2023; PICOLO et al., 2021; SU et al., 2021). Esses estudos de DIO em peixe-zebra demonstram a possibilidade da utilização desse modelo animal para mimetizar a patologia da obesidade em humanos (FAILLACI et al., 2018). Em larvas, esse modelo demonstra lipogênese aumentada, esteatose e níveis elevados de triglicerídeos (DAI et al., 2015; DEN BROEDER et al., 2017a; MA et al., 2019; THOMPSON et al., 2024).

O peixe-zebra também é amplamente utilizado em estudos de neurociência, com foco em funções neurológicas e comportamentais. Sua rede neuronal apresenta similaridade com às redes neurais humanas (LIESCHKE; CURRIE, 2007). Estudos demonstram que a hiperglicemia crônica no peixe-zebra pode aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), o estresse oxidativo e a inflamação, além de reduzir a plasticidade cerebral (GHADDAR; DIOTEL, 2022). Similar a outros modelos experimentais, o peixe-zebra pode apresentar mudanças comportamentais e déficits de memória induzidos por uma superalimentação. Em um estudo recente, nosso grupo de

pesquisa demonstrou que o tratamento com DH induziu obesidade, além de impactar funções cerebrais relacionadas a comportamentos tipo ansioso e agressivo e funções cognitivas (PICOLO et al., 2021).

1.4 Impacto da dieta obesogênica sobre a mitocôndria

As mitocôndrias são organelas celulares dinâmicas, essenciais para o metabolismo e fundamentais para as funções neuronal e muscular, além de desempenhar papel crucial no metabolismo energético. Dotadas de genoma próprio mtDNA, as mitocôndrias produzem energia para as células na forma de trifosfato de adenosina (ATP) por meio da fosforilação oxidativa (OXPHOS). Além disso, participam de processos como síntese de ácidos graxos, formação de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), termogênese, homeostase do cálcio (Ca^{2+}) e apoptose. Essas organelas possuem duas membranas - interna e externa - constituídas por bicamadas lipídicas e proteínas, separadas pelo espaço intermembranar (IM) e pela matriz mitocondrial (CHEN; ZHAO; LI, 2023; NELSON; COX, 2014; NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012; STEELE; PRYKHOZHII; BERMAN, 2014).

No interior da matriz mitocondrial, enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) fornecem transportadores de elétrons como Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH) e Flavina Adenina Dinucleotídeo (FADH_2), que cedem elétrons para a cadeia transporte de elétrons (ETC) localizada na membrana interna. (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012). Esses elétrons transitam por quatro complexos mitocondriais (IV), promovendo o bombeamento de prótons através da membrana interna.

Complexo I (CI, NADH: ubiquinona oxidoredutase) e o complexo II (CII, Succinato: ubiquinona oxidoredutase) são responsáveis por catalisar a transferência de elétrons para ubiquinona. O Complexo III (CIII, ubiquinol: citocromo c oxidoredutase) transporta elétrons da ubiquinona reduzida para o citocromo C e, por fim, o complexo IV (CIV, citocromo c oxidase) transfere os elétrons do citocromo C para o O_2 (BANERJEE; PURHONEN; KALLIJÄRVI, 2022; MIMAKI et al., 2012; NELSON; COX, 2014).

O Complexo I desempenha um papel fundamental no metabolismo celular de humanos e organismos aeróbicos. Ele participa de reações de oxidação-redução, transferindo os elétrons ao oxidante o NADH, substrato produzido no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e pela β -oxidação de ácidos graxos. Nesse processo, o Complexo I utiliza dois elétrons da oxidação de NADH para reduzir a ubiquinona a ubiquinol na

membrana mitocondrial interna (HIRST, 2013). O Complexo II é a única enzima do TCA associada à membrana, e catalisa a oxidação de succinato a fumarato. Os elétrons gerados são transferidos para o cofator FAD e, através de três centros de ferro-enzofre (Fe-S), para a ubiquinona, uma molécula lipofílica que se move na membrana mitocondrial interna (GOETZMAN et al., 2023). Complexo III é formado por um dímero de monômeros idênticos. Ele recebe elétrons da ubiquinona (CoQ), reduzido a ubiquinol (QH₂) nos complexos (CI e CII) e transfere-os para o citocromo C, enquanto realiza o transporte vetorial de prótons da matriz mitocondrial para o espaço IM. Por fim, o Complexo IV mitocondrial é uma grande enzima que faz parte da membrana mitocondrial interna e tem como função transportar os elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular, reduzindo-o em H₂O. Além disso, ele utiliza a energia liberada na reação redox para bombear prótons para o IM (NELSON; COX, 2014).

A passagem de elétrons entre os complexos do ETC cria um gradiente eletroquímico de prótons (Δp), composto pela concentração de prótons (pH) e pelo potencial de membrana ($\Delta \Psi$). No complexo V (ATP sintase), a difusão de prótons ao longo desse gradiente gera energia para a síntese de ATP a partir de Adenosina difosfato (ADP) (BANERJEE; PURHONEN; KALLIJÄRVI, 2022; MIMAKI et al., 2012; NOLFI-DONEGAN; BRAGANZA; SHIVA, 2020)

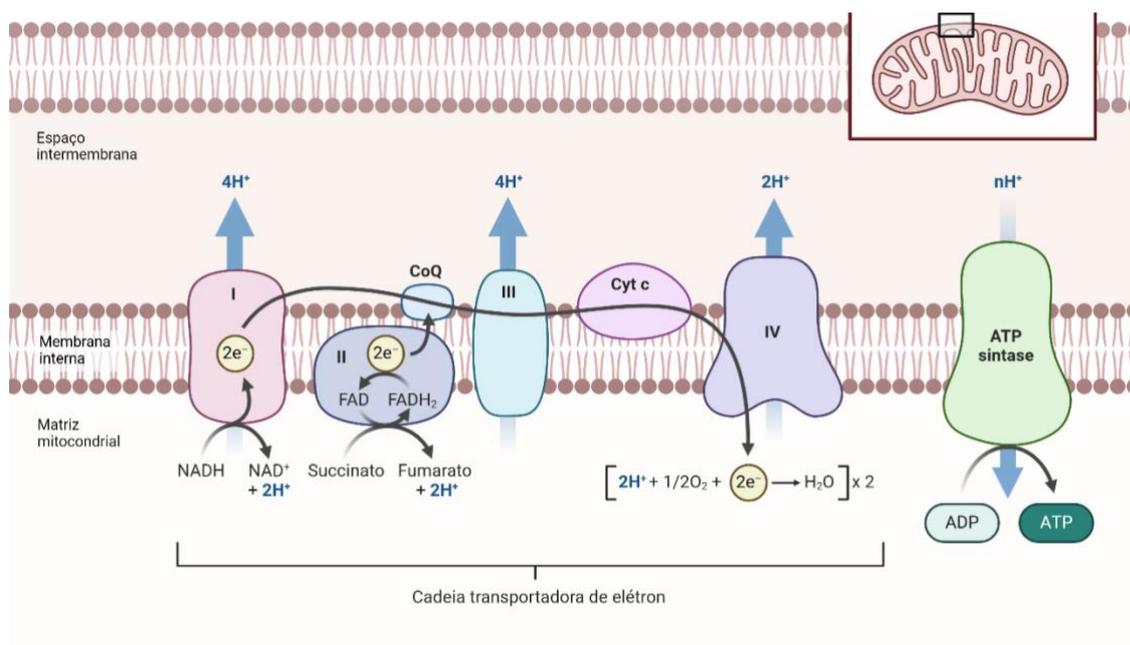


Figura 2: Fosforilação oxidativa. A cadeia transportadora de elétrons (CTE) ocorre na membrana interna mitocondrial e envolve diversos complexos enzimáticos. O ciclo do ácido tricarbóxico, que ocorre na matriz mitocondrial, gera NADH e FADH₂. Esses transportadores de elétrons transferem seus elétrons para os Complexos I e II da CTE. À medida que os elétrons passam pelos Complexos I, II e III, prótons (H⁺) são bombeados do interior da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana (IM), fornecendo um gradiente de prótons que é fundamental para produção de ATP. No complexo V os elétrons são transferidos para o oxigênio (O₂), formando água (H₂O). O gradiente de prótons gerado ao longo da CTE é utilizado pelo Complexo V (ATP sintase), que permite que os prótons retornem para matriz mitocondrial. Criado em BioRender. De bem, L. (2025) <https://BioRender.com/s87y521>.

O funcionamento adequado das mitocôndrias é essencial para a homeostase celular, mas sua disfunção pode levar à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS). O excesso de nutrientes nos adipócitos, por exemplo, aumenta a oxidação de ácidos graxos, resultando em acumulação de acetil coenzima A e produção exacerbada de NADH e FADH₂ no TCA. Isso sobrecarrega a ETC, causando vazamento de elétrons de alta energia e geração de ROS, o que pode desequilibrar o sistema de defesa antioxidante e induzir o estresse oxidativo (PRASUN, 2020). A superprodução de ROS pode danificar macromoléculas celulares, comprometendo proliferação, diferenciação e apoptose celular (GARCÍA-GARCÍA et al., 2020).

O cérebro é o principal órgão do SNC e necessita de um alto consumo energético. Contudo, não dispõe de reservas de energia, necessitando de suprimento ininterrupto de fontes energéticas. Cerca de 25% da demanda de glicose, uma fonte primária de energia corporal, é indispensável para a realização das funções cerebrais, sendo o principal substrato energético do cérebro (BARROS et al., 2023; BÉLANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011; BONVENTO; BOLAÑOS, 2021; MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2015). Em estado de repouso, o cérebro utiliza preferencialmente a via metabólica da fosforilação oxidativa mitocondrial. Em situações que exigem alta demanda energética, como na plasticidade sináptica, aprendizado e memória, ele pode recorrer a outros processos metabólicos, como a glicólise ou metabolismo do lactato (YASSINE et al., 2023). Nesse tecido, as diferentes células cerebrais envolvidas na bioenergética cerebral contabilizam as exigências de perfis metabólicos distintos. Os neurônios são responsáveis pela utilização de 70-80% da energia cerebral para sua sobrevivência, eles utilizam essencialmente o metabolismo oxidativo para a geração de ATP. Mediante a um processo que envolve a OXPHOS mitocondrial com consumo de oxigênio e geração de CO₂ e as mitocôndrias neuronais possuem um papel essencial na sustentação da estrutura axonal e renovação de neurotransmissores contribuindo para plasticidade sináptica. Já os astrócitos utilizam predominantemente a glicólise para a

produção de ATP, por meio da conversão de glicose em piruvato por uma série de reações metabólicas (BARROS et al., 2023; MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2015; SONG; BAI; SONG, 2025).

Devido à alta exigência metabólica neuronal, as mitocôndrias desempenham um papel crucial no seu aporte energético, influenciando sua plasticidade e seu bom funcionamento. Irregularidades no funcionamento mitocondrial estão associadas a comprometimento cognitivo, como o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (BELENGUER et al., 2019). Descobertas recentes indicam que disfunções no metabolismo energético podem estar associadas de forma adversa ao envelhecimento cerebral. Ainda, a adoção de hábitos prejudiciais a saúde, como a inatividade física, consumo dietético excessivo e déficit de atividade cognitiva, reforça ainda mais essa relação (CAMANDOLA; MATTSON, 2017; KAPOGIANNIS, 2015). Em virtude do estado ectotérmico, as exigências metabólicas no cérebro de peixes são entre 20 e 50 vezes menores do que as observadas em mamíferos. Além disso, semelhante aos mamíferos em teleosteos o processo de oxidação da glicose e a fosforilação oxidativa mitocondrial são os principais responsáveis no fornecimento de ATP exigidos em diferentes atividades neuronais que necessitam de energia, porém o que difere ente os grupos são as necessidades de renovação de glicose (SOENGAS; ALDEGUNDE, 2002).

Estudos conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram disfunção mitocondrial em órgãos metabólicos e no hipocampo de camundongos expostos precocemente a uma dieta obesogênica. Esses camundongos apresentaram astrogliose e alterações comportamentais, incluindo déficits de memória dependente do hipocampo (VILELA et al., 2023). Em outro estudo com roedores, o consumo de HFD levou a prejuízos metabólicos e no SNC, incluindo comprometimento da função e estrutura das mitocôndrias dos oligodendrócitos (LANGLEY et al., 2020). Esses achados destacam o impacto deletério de dietas obesogênicas sobre a função mitocondrial, com consequências significativas para a saúde metabólica e neurológica.

1.5 Disfunção mitocondrial e Regulação Epigenética em peixe-zebra: Evidências de Efeitos intergeracionais

Em um estudo realizado com peixe-zebra machos alimentados com HFD, foi observado que o tratamento dietético induziu obesidade, esteatose hepática e prejudicou o comportamento locomotor dos animais. Além disso, o trabalho evidenciou prejuízos na

biogênese mitocondrial muscular, incluindo mitocôndrias degeneradas, aumentadas e inchadas, acompanhadas de supressão da função mitocondrial e desregulação nos processos de fissão e fusão. (ZOU et al., 2022). Em outro estudo, a HFD enriquecida com propionato causou danos intestinais, como aumento de ROS e disfunção mitocondrial (DING et al., 2021)

O peixe-zebra é um modelo promissor de estudo intergeracional, pois a maioria das alterações epigenéticas que ocorrem durante o processo de desenvolvimento é preservada em vertebrados (BALASUBRAMANIAN; RAGHUNATH; PERUMAL, 2019). Por exemplo, um estudo investigou o efeito intergeracional da exposição ambiental materna pré-natal ao óxido de grafeno modificado com polietilenoimina e irradiado por luz solar. Os resultados indicaram uma maior taxa de má formação e estresse oxidativo na progênie. A análise de ultraestrutura mitocondrial, revelou danos significativos na membrana externa e nas cristas mitocôndrias. A prole apresentou alterações no repertório comportamental, incluindo menor atividade locomotora, prejuízos no comportamento social e menor capacidade de resposta a estímulos ambientais. Além disso, análises epigenéticas mostraram alterações na metilação do DNA (VALLES et al., 2020).

Seguindo essa linha de pesquisa, um estudo sobre genotoxicidade intergeracional envolvendo a exposição ambiental a um fungicida agrícola demonstrou que a prole de peixes tratados apresentou menor taxa de eclosão, comprimento corporal reduzido, frequência cardíaca alterada, desenvolvimento anormal e aumento de movimentos erráticos no repertório comportamental. O tratamento também impactou a regulação epigenética, alterando a expressão gênica (TIAN et al., 2023).

O peixe-zebra também é um modelo eficaz para estudar os impactos da obesidade intergeracional. Em um estudo recente, peixes-zebra obesos, alimentados com dieta rica em gordura e carboidrato, geraram uma prole que também apresentou obesidade. Em particular, os descendentes de progenitores alimentados com dieta rica em carboidrato demonstraram menor atividade em testes de tigmotaxia quando comparados a outros grupos (TÜRKOĞLU et al., 2022). No entanto, esse estudo analisou apenas o período em que a prole dependia exclusivamente do saco vitelino para se alimentar, destacando a necessidade de investigações adicionais que abarquem os períodos larval, juvenil e adultos desse modelo.

2. JUSTIFICATIVA

A obesidade é uma das doenças com uma maior incidência mundial (CAMMARANO et al., 2022). De acordo com a dados da OMS, a obesidade adulta em todo mundo dobrou desde 1990 e em adolescentes quadruplico (SAÚDE, 2024). Atualmente, a obesidade é comumente presente em ambientes sociais de desvantagem socioeconômica, com um menor acesso à informação e cuidados com a saúde, piores escolhas alimentares e falta de acessibilidade a instalações de atividades físicas (CAMMARANO et al., 2022). Essas alterações nos padrões alimentares das famílias nos últimos anos, impulsionadas pelo aumento da acessibilidade e consumo de alimentos ultraprocessados, ricos em gorduras e açúcares, têm contribuído para o aumento substancial de disfunções metabólicas, como obesidade e diabete, impactando negativamente a saúde das populações. Esses efeitos não se limitam à geração atual, podendo alcançar os descendentes e até mesmo gerações futuras, influenciando o desenvolvimento metabólico e neuronal.

Complicações relacionadas às doenças metabólicas e comportamentais, incluindo maior predisposição à obesidade e alterações em aspectos cognitivos, como concentração, aprendizado e memória, já são descritas nos descendentes. Revisões na literatura demonstram relação entre a obesidade parental e uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de obesidade na prole, englobando um risco significativo de obesidade infantil (HEMMINGSSON et al., 2023). Crianças cujos progenitores consomem dietas desbalanceadas demonstram maior vulnerabilidade a esses efeitos adversos, reforçando a urgência em compreender os mecanismos subjacentes a essa herança metabólica e comportamental, que pode ter um caráter intergeracional e transgeracional. Estimativas do Atlas Mundial da Obesidade 2024, demonstram que de acordo com as tendências atuais, cerca de 770 milhões de crianças e adolescentes em todo mundo apresentarão sobrepeso ou obesidade até 2035 (WORLD OBESITY, 2024). A obesidade durante a infância e a adolescência pode contribuir para danos psicossociais como desempenho escolar prejudicado, menor qualidade de vida e bullying. Além disso, ao longo da vida, pode favorecer o desenvolvimento de diabete tipo 2, doenças cardíacas, prejuízos na saúde óssea e complicações reprodutivas (SAÚDE, 2024).

A utilização do modelo do peixe-zebra para estudos intergeracionais e transgeracionais apresenta vantagens significativas em comparação com modelos de roedores pelo seu baixo custo, ciclo de vida rápido e alta fecundidade (RESENDE; SOCCOL, 2015). Pesquisas emergentes demonstram que o peixe-zebra é um potente modelo experimental para ser utilizado em diversas áreas. No entanto, em virtude da pouca exploração do seu potencial translacional, são necessários trabalhos para expandir o uso desse novo modelo. Ainda, poucos estudos avaliaram a interferência intergeracional da dieta com alta ingestão de gordura e as complicações associadas à prole. Assim, esse trabalho teve como objetivo decifrar as mudanças metabólicas e comportamentais induzidas por DH na prole do peixe-zebra e assim contribuir com novas medidas de prevenção e tratamento.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos da ingestão de uma dieta obesogênica por progenitores (F0) sobre os desfechos metabólicos, bioenergéticos, e comportamentais na prole de peixe-zebra (F1).

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da alimentação parental com dieta obesogênica nos progenitores (F0 machos e fêmeas) e na prole de peixe-zebra (F1- 5 meses pós fertilização) sobre os seguintes parâmetros:

- Morfo-metabólicos: peso corporal, IMC e os níveis sanguíneos de glicose;
- Comportamentais: teste do tanque novo para avaliar a atividade motora e o comportamento semelhante à ansiedade e o teste do labirinto em T para mensurar memória e aprendizado;
- Bioenergéticos: análise do consumo de oxigênio no encéfalo por respirometria de alta resolução;
- Viabilidade e sobrevivência: avaliação da morfologia dos ovos e sobrevivência larval.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Os progenitores (F0) utilizados no experimento foram peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos de tipo selvagem, adquiridos de fornecedor local (Acquaplan, DF, Brasil). Os animais foram mantidos em sala de experimentação com paredes azuis, onde os aquários foram organizados em estantes apropriadas. Os peixes foram alojados em aquários de vidro (18 cm de largura, 15 de comprimento e 20 de altura) contendo 4 litros de água retirada do sistema ZebTEC (Tecniplast, Itália) com aeração permanente. A temperatura foi controlada em 27 ± 1 °C, e o fotoperíodo de claro/escuro foi de 12 h/12h (luzes acessas às 8 horas). O controle da água foi realizado por meio de kits para detecção de amônia tóxica e nitrito Labcon Test (Alcon Ltda., Santa Catarina, Brasil) e o pH, de $7,0 \pm 0,5$, foi verificado por meio de um pHmetro, condutibilidade de 650 ± 100 μ S/cm, saturação de oxigênio de % 95 e a água renovada a cada 2 dias.

4.2 Protocolo experimental

3.2.1 Efeito intergeracional do consumo de dieta hiperlipídica (DH) sobre desfechos metabólicos, bioquímicos e comportamentais na prole. *Como a ingestão de dieta obesogênica na geração F0 pode afetar desfechos metabólicos, bioquímicos e comportamentais na F1 do peixe-zebra (Danio rerio)?*

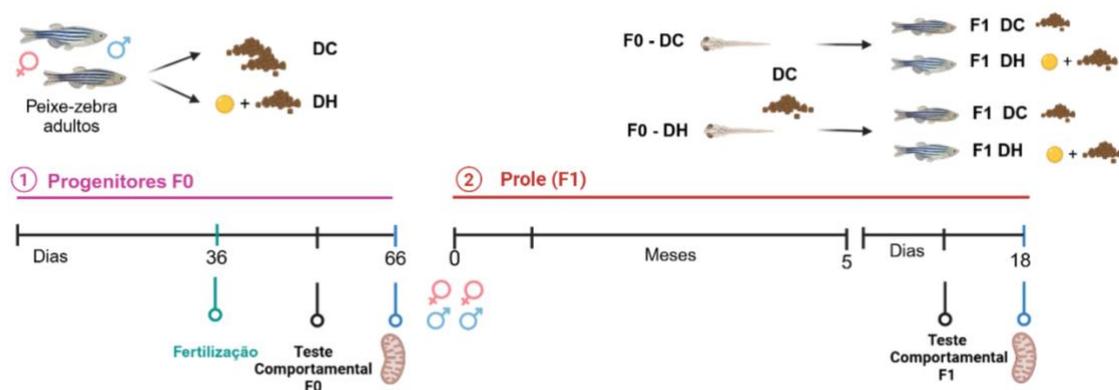


Figura 3: Protocolo experimental. Os progenitores adultos F0 (machos e fêmeas) foram alimentados diariamente com as dietas experimentais: dieta controle (DC) ou dieta hiperlipídica (DH). Após um período inicial de 36 de alimentação com as respectivas dietas, foram realizados os cruzamentos para obtenção dos ovos. Os progenitores (F0) continuaram recebendo as dietas experimentais (DC ou DH) por 8 semanas (fêmeas) ou 9 semanas (machos). Os ovos foram coletados e selecionados, e as larvas viáveis foram mantidas com dieta padrão (DC) até atingirem 5 meses pós-fertilização (mpf). Após este período de

crescimento, a prole (F1) foi separada de acordo com a dieta dos progenitores: prole de progenitores alimentados com dieta controle (F1DC) e prole de progenitores alimentados com dieta hiperlipídica (F1DH). A prole então foi submetida a uma dieta experimental (DC ou DH) por 14-18 dias. Ao final de cada tratamento, os indivíduos adultos progenitores (F0) e prole (F1) foram submetidos a testes comportamentais. Em seguida, os animais foram eutanasiados para coleta de sangue e realização de análises morfométricas. O encéfalo foi dissecado para a avaliação do consumo de oxigênio por oximetria de alta resolução e para análises enzimáticas. Criado em BioRender. De bem, L. (2024) <https://BioRender.com/s87y521>.

Este estudo investigou os efeitos diretos da DH tanto nos progenitores (F0) quanto o efeito intergeracional da DH sobre a prole (F1). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas de manuseio e uso de animais recomendados pela Comissão de Ética no Uso de Animais. Antes do início do experimento, as fêmeas progenitoras (F0) foram submetidas a um ciclo de cruzamento-reprodução para induzir a desova, garantindo que estivessem aptas para o protocolo. Fêmeas que não desovaram foram removidas do estudo. Um total de 78 peixes-zebra adultos da geração F0 (50 machos e 28 fêmeas) foram divididos em 16 aquários. O experimento foi conduzido em duas etapas. Na primeira etapa, os progenitores (F0 machos ou fêmeas) foram alimentados por 36 dias com dietas específicas: dieta controle (DC), composta por 7,5 mg/peixe de ração comercial seca (Tetra-ColorBits 47,5% de proteínas, 6,5% de gorduras, 18% de carboidratos 4,9 cal/mg; Tetra, Alemanha), ou dieta hiperlipídica (DH), composta por 5 mg/peixe de ração comercial suplementada com 15 mg/peixe de gema de ovo cozida (26% de gordura, 16% de proteínas, 2% de carboidratos, 3,23 cal/mg). A alimentação era oferecida uma vez ao dia, entre 14h e 16h, e o peso dos animais foi registrado semanalmente.

Após os 36 dias de alimentação experimental, foram realizados cruzamentos para a obtenção da prole F1. Para isso, os peixes F0 foram alojados em caixas de reprodução individuais do sistema ZebTEC, com enriquecimento ambiental que estimula a desova das fêmeas. Os cruzamentos ocorreram à noite, com dois machos para cada fêmea, e a desova foi induzida pela exposição à luz na manhã seguinte. Foram necessários quatro ciclos de reprodução para coletar 3.067 ovos, assegurando um número adequado para o experimento. Após o cruzamento, os progenitores F0 continuaram recebendo as dietas experimentais (DC ou DH) por até 8 semanas para fêmeas e 9 semanas para machos.

Na segunda etapa, avaliamos o efeito intergeracional da DH sobre a prole (F1). Os ovos viáveis foram selecionados sob microscópio estereoscópico binocular (Stemi 508, Zeiss, Alemanha), totalizando 2.930 ovos viáveis e 137 não viáveis (coagulados).

Ovos viáveis foram transferidos para aquários menores (200 ovos/2 L de água filtrada do sistema ZebTEC), mantidos a 27 ± 1 °C e sob fotoperíodo controlado. No primeiro dia, foi adicionado azul de metileno à água para prevenir contaminação fúngica, e a limpeza dos aquários foi realizada diariamente até 30 dias pós-fertilização (dpf) e, posteriormente, a cada 2 dias, por meio da troca parcial de água. Durante os primeiros sete dias, as larvas se alimentaram de reservas endógenas do vitelo; após o sexto dia, iniciaram-se as alimentações exógenas com dieta controle (DC), oferecida uma vez ao dia até a fase adulta. A partir dos 30 dpf, as larvas foram realocadas no sistema ZebTEC e mantidas até 5 mpf. Ao atingirem essa idade, foram selecionadas (18–20 animais/grupo) de forma randomizada e transferidas para aquários de vidro na sala de experimentação para um período de aclimação de uma semana. Após a aclimação, a prole F1 foi submetida a uma dieta experimental (DC ou DH) por 14-18 dias e dividida em quatro grupos experimentais (18–20 animais/grupo):

Tabela 1: Grupos experimentais: Progenitores adultos F0 (machos ou fêmeas) e prole (F1)

Progenitores (Machos ou Fêmeas)	Prole
F0 – DC	F1 - DC
	F1 - DH
F0 – DH	F1 - DC
	F1 - DH

Em relação a prole (F1) os peixes foram divididos em quatro grupos de acordo com a dieta experimental parental e a dieta da prole (Tabela 1). Os grupos que receberam a dieta controle (DC) foram alimentados com uma mistura (1:1) de duas rações comerciais (Tetra-ColorBits e Tetra Tetramin, Alemanha), trituradas até obter um pó fino, fornecido até a saciedade. Para padronizar a quantidade de ração disponibilizada, colocamos a ração na ponta de uma espátula pequena. Os grupos que receberam a dieta hiperlipídica (DH) foram alimentados com ração Tetra-ColorBits suplementada com gema de ovo de acordo com o protocolo de Broeder et al. (2017). A gema foi cozida por 10 minutos, diluída em água do sistema (1 g/15 mL) e alocada em tubos de 0,5 mL, armazenada a -20 °C até o uso. Foi ofertado aproximadamente 33 mg de gema por aquário. Os peixes foram alimentados uma vez ao dia, por 14-18 dias, e pesados no final do experimento. Ao final do protocolo experimental, os animais (progenitores F0 e prole F1) foram submetidos a

testes comportamentais. Em seguida, foram anestesiados e eutanasiados para coleta de sangue e análise morfométrica. O encéfalo foi dissecado para avaliar o consumo de oxigênio por oximetria de alta resolução. Todos os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IB/UnB (nº 23106.075530/2024-12).

4.3 Parâmetros metabólicos

4.3.1 Caracterização da obesidade

4.3.1.1 Peixes adultos

Para avaliar o impacto das dietas sobre o peso corporal dos peixes adultos, foram realizadas pesagens semanais. O procedimento de pesagem seguiu um método padronizado: os peixes foram cuidadosamente retirados dos aquários com redes e, após uma leve secagem em papel absorvente na bancada, foram transferidos para um béquer contendo água do sistema ZebTEC, previamente tarado em uma balança de precisão. Após estabilização da balança, o peso de cada animal foi registrado. O comprimento padrão dos peixes foi avaliado ao final do protocolo experimental. Para essa medida, os animais foram anestesiados com triclaína (0,2%) e posicionados lateralmente sobre um papel branco na bancada, próximo a uma régua para referência de escala. Em seguida, cada peixe foi fotografado individualmente com uma câmera digital. As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ (NIH, Bethesda, Estados Unidos), onde o comprimento padrão foi definido como a distância entre a ponta da cabeça e o pedúnculo caudal. O índice de massa corporal (IMC; $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$) foi calculado para cada peixe, utilizando o peso corporal médio da última pesagem (mg), dividido pelo quadrado do comprimento padrão (cm^2), conforme descrito por Oka et al. (2010) e Picolo et al. (2021) (OKA et al., 2010; PICOLO et al., 2021).

4.3.1.2 Período Larval

As larvas foram separadas em grupos de acordo com a dieta parental e colocadas individualmente em placa de Petri, sendo fotografadas semanalmente a partir do décimo primeiro dia de dieta. As imagens foram obtidas com em estereoscópio binocular Stemi 508 com ampliação de 2.0x e 1.6x (Zeiss, Alemanha). O crescimento foi monitorado pelo comprimento padrão (da ponta da cabeça até o pedúnculo caudal). As análises de

comprimento foram realizadas no software ImageJ, conforme descrito em Den Broeder et al. (2017) (DEN BROEDER et al., 2017b).

4.3.2 Retirada de sangue e encéfalo

Após um período de jejum noturno, os níveis de glicose no sangue dos animais foram determinados. Para isso, os peixes foram anestesiados em solução de tricafina 0,2% por cerca de 2 minutos, ou até a obtenção de anestesia completa. Em sequência, uma pequena incisão transversal foi realizada na cauda, próxima à nadadeira anal, para coleta do sangue. As medições de glicose foram realizadas imediatamente utilizando um com glicosímetro (One-Touch Ultra, Accu Check) conforme descrito por (Pedroso et al., 2012). Para a dissecação do encéfalo, os animais foram colocados em um béquer com gelo por 2 minutos e eutanasiados por choque térmico. Após a eutanásia, o encéfalo foi cuidadosamente dissecado e coletado para análises posteriores, seguindo o protocolo de (GUPTA; MULLINS, 2010).

4.4 Análises comportamentais

Para a realização dos testes, foram utilizados animais adultos ($n = 15$ por grupo) da geração F0 (fêmeas com 58 dias e machos com 66 dias de dieta) e animais da geração F1 ($n = 21$ a 23 por grupo) com 5 mpf. Os testes foram realizados no período entre às 9:00h e 16:00h em aquários retangulares com (15 cm de comprimento \times 20 cm de altura \times 18 cm de largura) contendo 4 L de água do sistema ZebTEC (27 ± 1 °C). O aparato utilizado foi um biombo de isopor branco para evitar interferências no campo visual, dividido em três quadrantes com um aquário em cada. Adicionalmente, colocamos papel celofane azul nas luminárias e a quantidade de luz foi quantificada com luxímetro. Os animais estavam em jejum noturno, e foram submetidos a um período de uma hora de aclimatação antes da realização de cada teste, realizados em dias seguidos. Os vídeos foram registrados por câmera na parte frontal e superior dos aquários e analisados no *software* ANY-maze (versão 7.37, Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA).

4.4.1 Teste de tanque novo (TTN)

O TTN visou avaliar as atividades locomotoras e exploratórias estimuladas por um novo ambiente. O peixe-zebra, ao ser introduzido a um novo ambiente, tende a ficar o maior tempo na área inferior do aquário e, gradualmente, se deslocar para a superior, explorando a superfície (LEVIN; BENCAN; CERUTTI, 2007). Os animais foram

colocados individualmente no aparato com o auxílio de uma rede e deixados explorar o ambiente livremente por 6 minutos. O tempo de análise do teste é de 5 minutos, o aquário é dividido virtualmente em duas áreas iguais (superior e inferior). A distância percorrida, velocidade máxima e ângulo de giro absoluto são utilizados como medida de locomoção. Já a latência para entrada na área superior, o tempo na zona inferior, o tempo na zona superior, os movimentos erráticos e o índice de exploração são utilizados como medida de ansiedade induzida por um novo ambiente (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009; FONTANA et al., 2019; PICOLO et al., 2021). O índice de exploração ($IE = ZN / (ZN + ZI) \times 100$, onde ZN e ZI são o tempo de exploração da zona superior e inferior, respectivamente) é calculado. Todos os dados são extraídos offline e obtidos por análise automatizada utilizando o software ANY-maze.

4.4.2 Teste de labirinto em T (TLT)

O teste de labirinto em T verificou se a aprendizagem espacial e a memória de curto prazo dos animais (NINKOVIC et al., 2006) foram alteradas pelo tratamento das dietas experimentais. O peixe-zebra apresenta a capacidade de adquirir e lembrar informações espaciais (GERLAI, 2016). Sendo assim, o teste baseia-se na tendência do peixe-zebra em explorar ambientes novos. Com a consolidação da memória de curto prazo do animal, espera-se que ele explore por mais tempo o braço novo em relação ao antigo. O aparato foi projetado como um aquário em formato de T, com um braço longo e dois braços curtos (30 cm de comprimento, 10 cm de altura e 10 cm de largura). As paredes foram cobertas com papel adesivo preto para evitar estímulos externos e o fundo com papel adesivo branco para realçar a cor do animal em relação ao aparato. São colocadas pistas visuais diferentes em cada braço curto (círculos, triângulos e quadrados). O teste consiste em duas fases com duração de 6 minutos cada, sendo a fase de treino e a fase de teste. No treino, o animal é colocado no braço inicial e um dos braços curtos do aparato é fechado com uma placa de vidro preta, proibindo a entrada do animal, denominado de braço novo. O animal pode explorar o braço inicial e o braço curto aberto, livremente, durante o tempo do teste. Os braços novos e antigos foram randomizados para reduzir a preferência dos animais por um dos lados. Ao fim do treino, o animal é retirado do aparato e colocado de forma individual em um pequeno aquário. Depois de uma hora do período de retenção de memória espacial, o animal é recolocado no labirinto para a fase de teste. Nessa fase, o animal é disposto no braço inicial e os outros dois braços curtos encontram-se abertos. Os parâmetros de locomoção analisados foram distância

total percorrida, velocidade máxima e o ângulo do giro absoluto. O tempo no braço novo, tempo no braço antigo e o índice de memória são utilizados como consolidação de memória espacial (MOREIRA; LUCHIARI, 2022). O índice de exploração ($IE = TN / (TN+TA) \times 100$, onde TN e TA são o tempo de exploração no braço novo e antigo, respectivamente) é calculado. Todos os dados são extraídos offline e obtidos por análise automatizada utilizando o software ANY-maze.

4.5 Análise Bioenergética

4.5.1 Avaliação do consumo de oxigênio

O consumo de O₂ foi determinado pela análise do metabolismo mitocondrial, utilizando o consumo de oxigênio pela respirometria de alta resolução (RAR) no respirômetro Oxygraph-2k (Oroboros, Innsbruck, Áustria) a 28°C. A técnica foi utilizada para mensurar e interpretar os resultados obtidos do metabolismo mitocondrial em tempo real. Para isso, utiliza-se o oxígrafo que tem duas câmeras equipadas com sensores de oxigênio polarográfico. Ao analisar a função mitocondrial, é possível identificar diferentes estados metabólicos através da titulação com seringas *hamilton* nas câmeras do oxígrafo de substratos e inibidores, conforme o protocolo experimental. Os resultados obtidos são observados em um *software*, por meio de gráficos que demonstram a taxa de consumo de oxigênio (DJAFARZADEH; JAKOB, 2017; GNAIGER, 2020). Em seguida, o método de Bradford foi realizado para normalização dos dados da oximetria pela determinação do total de proteínas nas amostras (BRADFORD, 1976).

Após a dissecação, o encéfalo dos progenitores foi coletado, adicionado 200 µ L de meio de reação (MR) (MR: sacarose 125mM, KCl 65mM, K₂HPO₄ 2mM, MgCl₂ 1mM, Hepes 10mM e EGTA 0,2mM) e homogeneizado com homogeneizador *Potter* produzido de vidro-teflon. Na oximetria foram adicionados 100µl da amostra homogeneizada e 2 mL de tampão MR e 0,1% de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (*Bovine Serum Albumin fat-free*, BSA *fat-free*). Na prole, foram feitos pools de 2 encéfalos por grupo e adicionados 150 µ L de meio de reação MR para o DC e 350 MR para o DH e foram homogeneizados com homogeneizador *Potter*. Na oximetria foram adicionados 80µl das amostras homogeneizadas e 2 mL de tampão MR e 0,1% de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (*Bovine Serum Albumin fat-free*, BSA *fat-free*). Uma parte das amostras foi reservada para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

Nos dois protocolos, as amostras foram colocadas no respirômetro, substratos e drogas (inibidores) foram utilizados para avaliar os estados respiratórios. Adicionamos piruvato + malato (PM: 15 e 7,5 mM) substratos relacionados ao complexo I. A adenosina di-fosfato (ADP: 500 μ M) para avaliar o estado da fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS). Na sequência, foi adicionado succinato (S: 12mM) para analisar o complexo II. A adição da oligomicina (0,2 μ g/mL) foi usada para analisar o vazamento de prótons, por inibição da produção de ATP, o estado de capacidade respiratória relacionada à ATP-sintase (ATP-linked) foi calculado como:

$$ATP-linked = [\text{Fluxo de oxigênio (OXPHOS)} - \text{vazamento de prótons}]$$

A respiração máxima foi atingida com a titulação de cianeto de carbonila 3-clorofenil-hidrazona (CCCP) (0,6 μ M).

4.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software Graphpad Prism (GraphPad, Califórnia, EUA, versão 9.2). Em todos os testes os *outliers* foram detectados através do método de ROUT (Q = 1%) e excluídos em seguida. Para verificar a normalidade dos dados, foram aplicados os testes de D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov e a distribuição foi considerada normal se passou em pelo menos um dos testes. Os dados paramétricos foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados utilizando o *Teste t* de Student. Os não paramétricos foram expressos pela mediana \pm intervalo interquartil e para cada caso os testes específicos estão descritos na sessão de resultados. Os dados são considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da DH sobre os progenitores

5.1.1 Efeito da DH sobre parâmetros morfometabólicos nos progenitores fêmeas (F0)

O peso das fêmeas F0 foi avaliado semanalmente para monitorar alterações morfometabólicas ao longo do experimento. A análise estatística do peso corporal ao longo do tempo indicou um efeito significativo da DH sobre a massa corporal das fêmeas. A Figura 4A representa a progressão temporal do peso corporal nos diferentes grupos experimentais. Observou-se um aumento significativo no peso corporal das fêmeas alimentadas DH ao longo do tempo, conforme demonstrado pela análise de regressão linear [$F(2, 156) = 6,618$; $p = 0,0017$]. O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi $-0,5359$ para DC e $0,5321$ para DH (A). Ao final do protocolo, os animais do grupo DH apresentaram um peso significativamente maior em comparação ao grupo controle (DC) (B; $p < 0,05$). No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de comprimento corporal (C; $p = 0,9344$) e índice de massa corporal (IMC) (D; $p = 0,3016$) entre os grupos. Além disso, a ingestão da DH não alterou os níveis sanguíneos de glicose em jejum (E; $p = 0,2129$).

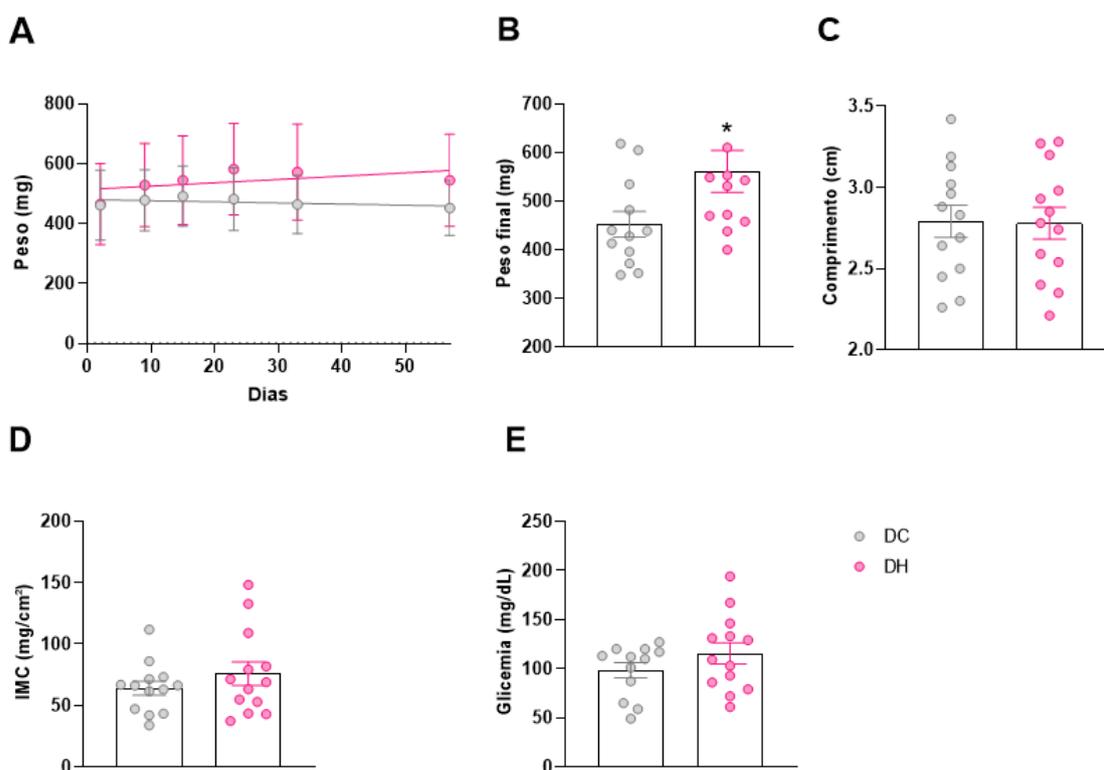


Figura 4: Efeito da DH nos parâmetros morfometabólicos. As fêmeas F0 foram alimentadas por 58 dias com DC ou DH. (A) Peso corporal ao longo do tempo do protocolo experimental. (B) Peso corporal final

no último dia de experimento. (C) Comprimento corporal no último dia de experimento. (D) IMC no último dia de experimento. (E) Glicemia em jejum. Os dados paramétricos são expressos como média \pm EPM. Para comparação entre 2 grupos, foi utilizado o teste t de Student. $n = 12-15$ por grupo. Os asteriscos indicam diferença estatística em comparação com o grupo DC. * $p < 0,05$.

5.1.2 Efeito da DH sobre parâmetros morfometabólicos nos progenitores machos

(F0)

O peso dos machos F0 foi avaliado semanalmente para monitorar alterações morfometabólicas ao longo do experimento. A Figura 5 ilustra a evolução temporal do peso corporal de cada grupo experimental. A análise estatística dos dados de peso ao longo do tempo, foi realizada por regressão linear, não indicou diferença significativa entre os grupos [F (1, 272) = 0,05430; $p = 0,8159$]. O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi 0,1409 para DC e -0,2668 para DH, indicando a ausência de um efeito significativo (A). No entanto, a análise do peso corporal final dos machos demonstrou que os animais do grupo DH apresentaram um peso significativamente maior em comparação ao grupo controle (DC) (B; $p < 0,01$). Além disso, o consumo da DH resultou em um aumento significativo no comprimento corporal dos animais machos do grupo DH em comparação ao grupo DC (C; $p < 0,01$). Nenhuma diferença foi observada no IMC (D; $p = 0,1443$) ou nos níveis de glicemia em jejum (E; $p = 0,3076$), indicando que a dieta hiperlipídica não alterou esses parâmetros metabólicos.

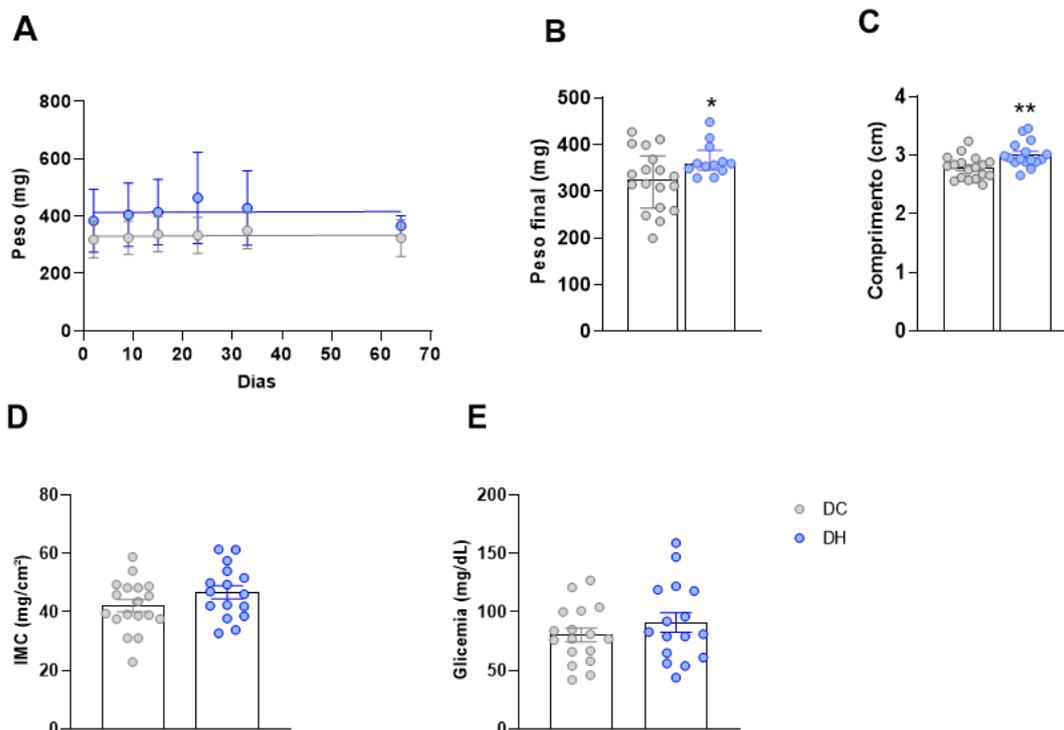


Figura 5: Efeito da DH nos parâmetros morfometabólicos. Os machos F0 foram alimentadas por 66 dias com DC ou DH. (A) Peso corporal ao longo do tempo do protocolo experimental (n = 24-25 por grupo). (B) Peso corporal final no último dia de experimento. (C) Comprimento corporal no último dia de experimento. (D) IMC no último dia de experimento. (E) Glicemia em jejum. Os dados paramétricos são expressos como média ± EPM. Os não paramétricos foram expressos pela mediana ± intervalo interquartil e analisados por meio do teste de Mann-Whitney. Para comparação entre 2 grupos, foi utilizado o teste t de Student (B, C, D, E n = 16-18 por grupo). Os asteriscos indicam diferença estatística em comparação com o grupo DC. ** p<0,01.

5.1.3 Impacto da DH sobre comportamento exploratório e tipo-ansioso em progenitores fêmeas

O teste de tanque novo foi utilizado para avaliar a exploração vertical e o comportamento tipo-ansioso dos animais. Espera-se que, no início do teste, o peixe-zebra permaneça no fundo do aquário e, com o tempo, explore a zona superior (Protocolo experimental, A). Os resultados demonstram que as fêmeas alimentadas com DH apresentaram uma redução significativa na distância total percorrida em comparação ao grupo DC (B; p<0,05). No entanto, não foram observadas diferenças significativas na velocidade máxima (C; p = 0,1299) e no ângulo de giro absoluto (D; p = 0,0863) entre os grupos. Por outro lado, a análise do comportamento exploratório revelou que as fêmeas alimentadas com DH passaram menos tempo na zona superior do tanque (E; p<0,05) e apresentaram um índice de exploração reduzido em comparação ao grupo DC (F; p<0,05). Esses achados indicam que a DH induziu alterações comportamentais associadas a um fenótipo tipo-ansioso nas fêmeas adultas de peixe-zebra (F0).

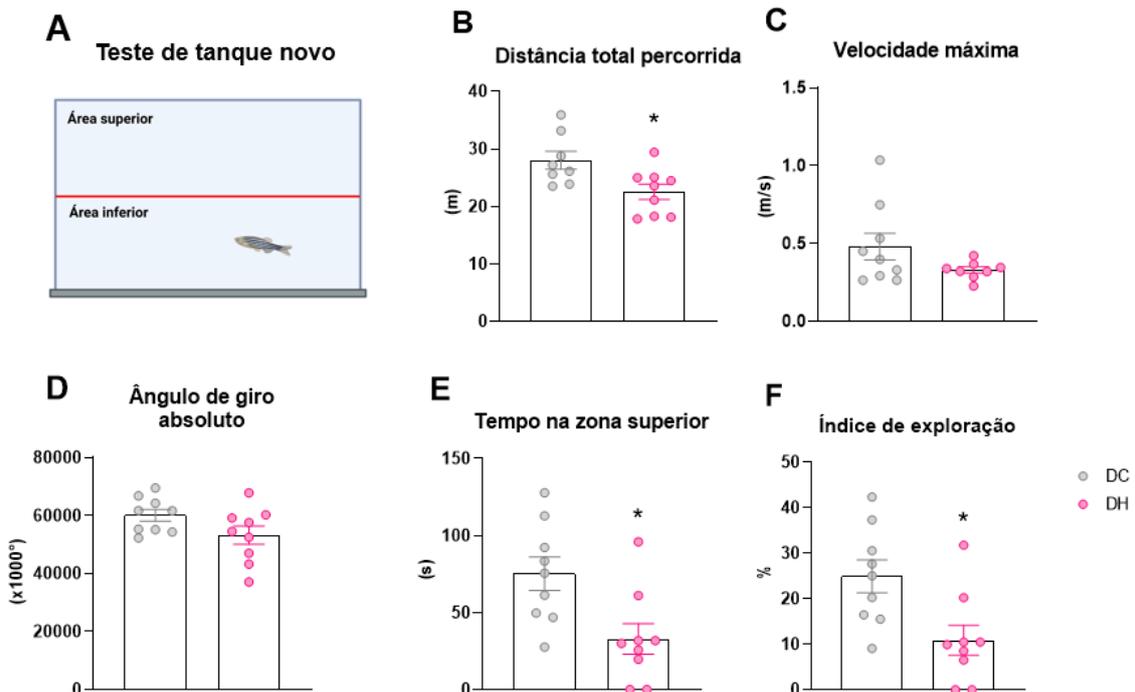


Figura 6: Análise comportamental em adultos. A DH promoveu um efeito significativo no comportamento dos animais. (A) Protocolo experimental. (B) Distância total percorrida. (C) Velocidade máxima. (D) Ângulo de giro absoluto. (E) Tempo na zona superior. (F) Índice de exploração. O índice de exploração é calculado ($IE = ZN / (ZN + ZI) \times 100$, onde ZN e ZI são o tempo na zona superior e inferior, respectivamente). Os dados paramétricos são expressos como média \pm EPM. Para comparação entre 2 grupos, foi utilizado o teste t de Student. n = 9 por grupo. Os asteriscos indicam diferença estatística em comparação com o grupo DC. *p<0,05.

5.1.4 A DH promoveu comportamento tipo-ansioso sem impactar a atividade locomotora em progenitores machos (F0)

O teste de tanque novo foi utilizado para avaliar a capacidade locomotora e o comportamento tipo-ansioso dos animais (Protocolo experimental, A). Os resultados indicam que a DH não afetou a atividade locomotora dos machos, uma vez que não foram observadas diferenças significativas na distância total percorrida (B; p = 0,1184), na velocidade máxima (C; p = 0,4312) e no ângulo de giro absoluto (D; p = 0,6575) entre os grupos. Por outro lado, a DH influenciou o comportamento exploratório dos animais, levando a uma diminuição significativa no tempo passado na zona superior do tanque (E; p<0,05), além de um índice de exploração reduzido no grupo DH em comparação ao DC (F; p<0,05). Esses achados sugerem que a DH induziu um comportamento tipo-ansioso nos machos.

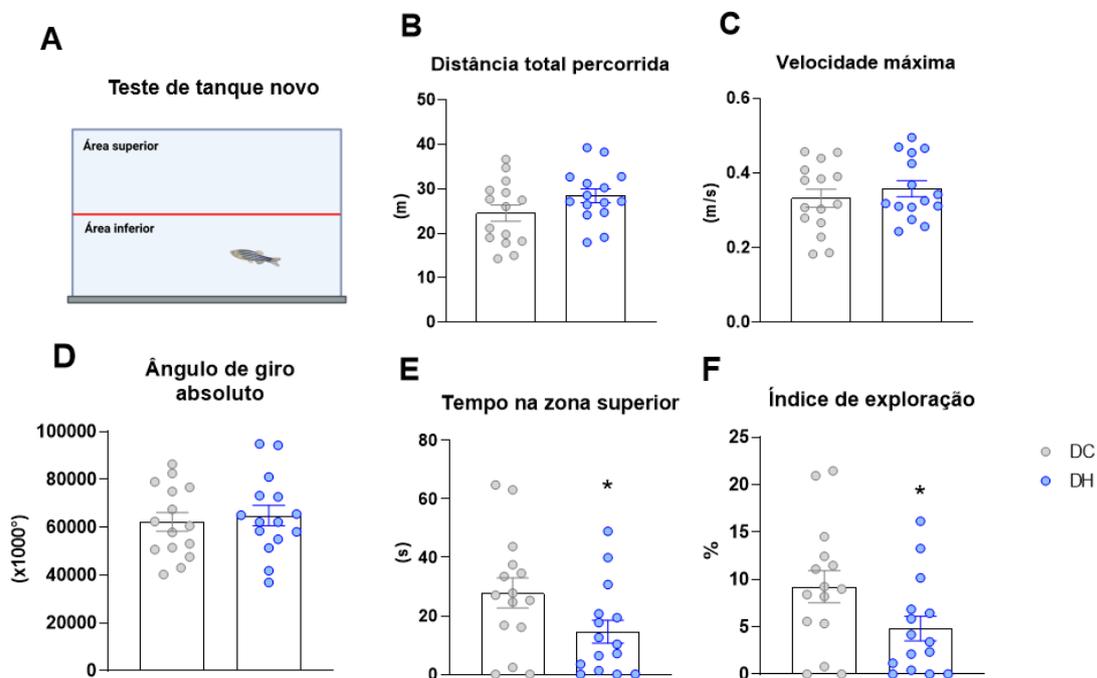


Figura 7: Análise comportamental em adultos. A DH promoveu um efeito significativo no comportamento dos animais. (A) Protocolo experimental. (B) Distância total percorrida. (C) Velocidade máxima. (D) Ângulo de giro absoluto. (E) Tempo na zona superior. (F) Índice de exploração. O índice de exploração é calculado ($IE = ZN / (ZN + ZI) \times 100$, onde ZN e ZI são o tempo na zona superior e inferior, respectivamente). Os dados paramétricos são expressos como média \pm EPM. Para comparação entre 2 grupos, foi utilizado o teste t de Student. n = 9 por grupo. Os asteriscos indicam diferença estatística em comparação com o grupo DC. *p<0,05.

grupos, foi utilizado o teste t de Student. n = 15 por grupo. Os asteriscos indicam diferença estatística em comparação com o grupo DC. *p<0,05.

5.1.5 A DH não promoveu prejuízo na memória de reconhecimento espacial em progenitoras fêmeas (F0)

O teste do labirinto em T foi utilizado para avaliar a performance cognitiva, especificamente a aquisição e consolidação da memória de reconhecimento espacial de curto prazo (1h). Os resultados apresentados na Figura 8 indicam que a exposição à DH por 58 dias não comprometeu a memória dos animais. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos parâmetros de distância total percorrida (B; p = 0,3662), velocidade máxima (C; p = 0,3758) e ângulo de giro absoluto (D; p = 0,1638), sugerindo que a DH não afetou a atividade locomotora durante o teste. Além disso, a análise do tempo no braço novo (E; p = 0,6104) e do índice de exploração (F; p = 0,9419) revelou que os animais tratados com DH não diferiram do grupo controle, indicando que a dieta não impactou a capacidade de reconhecimento espacial.

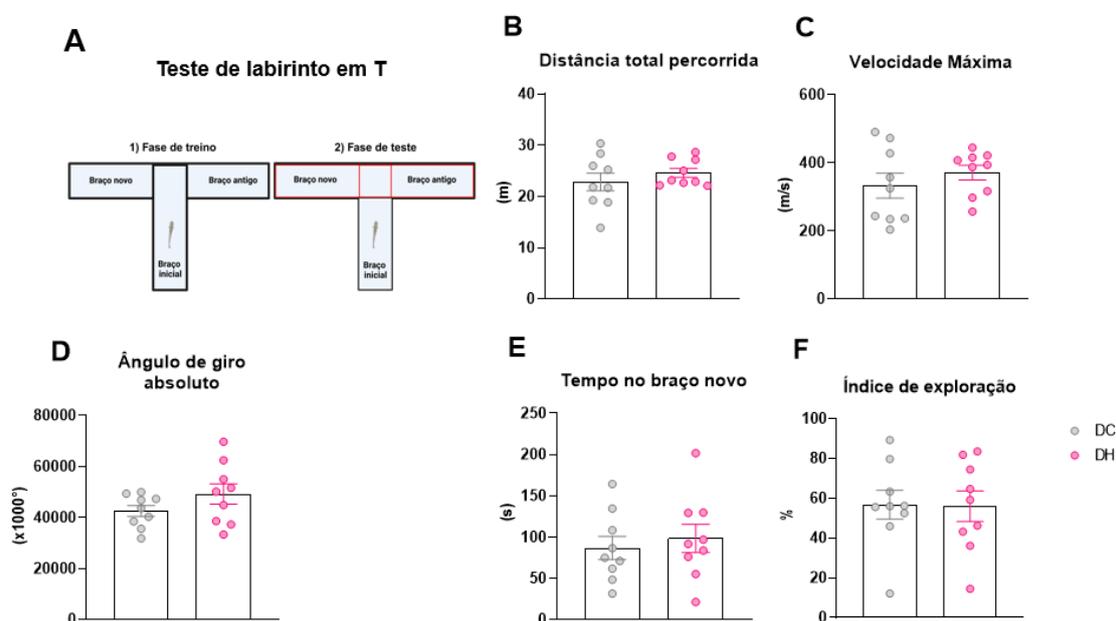


Figura 8: A DH não causou prejuízo cognitivo nos animais. A memória espacial foi avaliada pelo teste do labirinto em T. (A) Prt otocolo experimental. (B) Distância total percorrida. (C) Velocidade máxima. (D) Ângulo de giro absoluto. (E) Tempo no braço novo. (F) Índice de exploração. O índice de exploração é calculado ($IE = ZN / (ZN + ZI) \times 100$, onde ZN e ZI são o tempo na zona superior e inferior, respectivamente). Os dados paramétricos são expressos como média \pm EPM. Para comparação entre 2 grupos, foi utilizado o teste t de Student. n = 9 por grupo. Os asteriscos indicam diferença estatística em comparação com o grupo DC. *p<0,05.

5.1.6 A DH não prejudicou a memória de reconhecimento espacial em progenitoras machos (F0)

O teste do labirinto em T foi utilizado para avaliar a cognição dos animais, especificamente aprendizado e memória de reconhecimento espacial, por meio de pistas visuais. Os resultados indicam que a exposição à DH não comprometeu a atividade locomotora dos machos, uma vez que não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de distância total percorrida (B; $p = 0,2409$), velocidade máxima (C; $p = 0,8552$) e ângulo de giro absoluto (D; $p = 0,4300$). Além disso, durante o teste, esperava-se que os animais passassem mais tempo explorando o braço novo em comparação ao antigo, refletindo a capacidade de reconhecimento espacial. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos no tempo de permanência no braço novo (E; $p = 0,3789$) nem no índice de exploração (F; $p = 0,3789$), sugerindo que a DH não impactou o desempenho cognitivo dos machos progenitores.

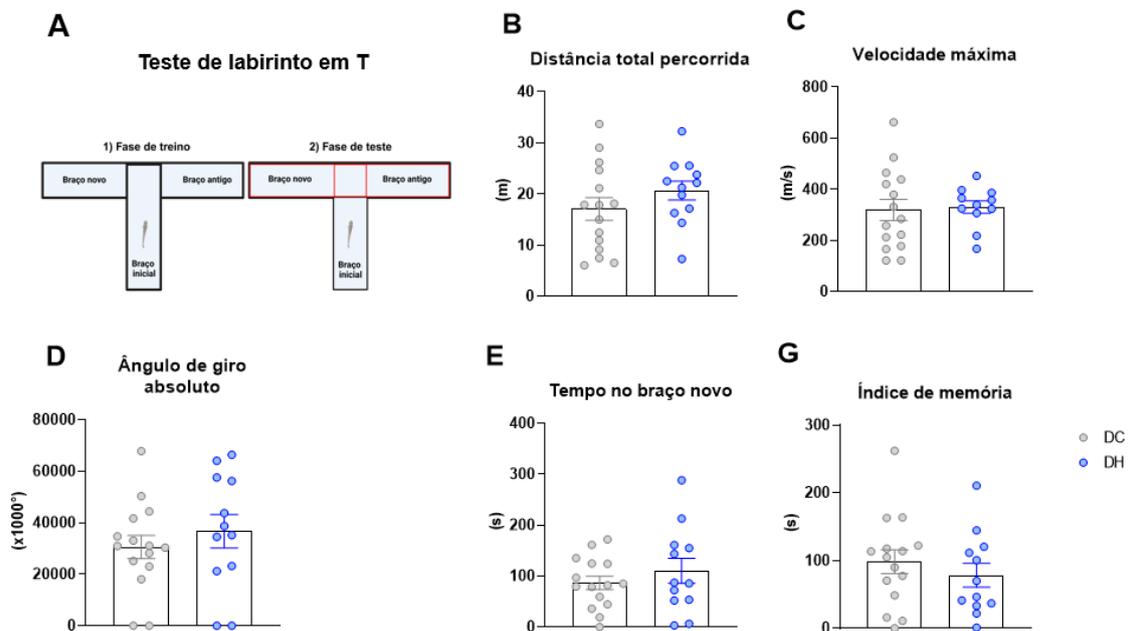


Figura 9: A DH não causou prejuízo cognitivo nos animais. A memória espacial foi avaliada pelo teste do labirinto em T. (A) Protocolo experimental. (B) Distância total percorrida. (C) Velocidade máxima. (D) Ângulo de giro absoluto. (E) Tempo no braço novo. (F) Índice de exploração. O índice de exploração é calculado ($IE = ZN / (ZN + ZI) \times 100$, onde ZN e ZI são o tempo na zona superior e inferior, respectivamente). Os dados paramétricos são expressos como média \pm EPM. Para comparação entre 2 grupos, foi utilizado o teste t de Student. $n = 15$ por grupo. Os asteriscos indicam diferença estatística em comparação com o grupo DC. * $p < 0,05$.

5.1.7 A DH não alterou o consumo de oxigênio mitocondrial no encéfalo de progenitores fêmeas (F0)

A análise do consumo de oxigênio mitocondrial no encéfalo das fêmeas progenitoras não revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 7). A exposição à DH não alterou a taxa respiratória nos diferentes estados mitocondriais avaliados, incluindo o consumo de oxigênio pelo complexo I (A; $p = 0,3972$), complexo I + OXPHOS (B; $p = 0,2321$), complexo I + II + OXPHOS (C; $p = 0,8148$), capacidade respiratória máxima (D; $p = 0,4889$), consumo de oxigênio acoplado à produção de ATP e (ATP-linked. E; $p = 0,2078$). Esses achados indicam que a DH não induziu disfunção mitocondrial significativa no encéfalo das fêmeas progenitoras de peixe-zebra.

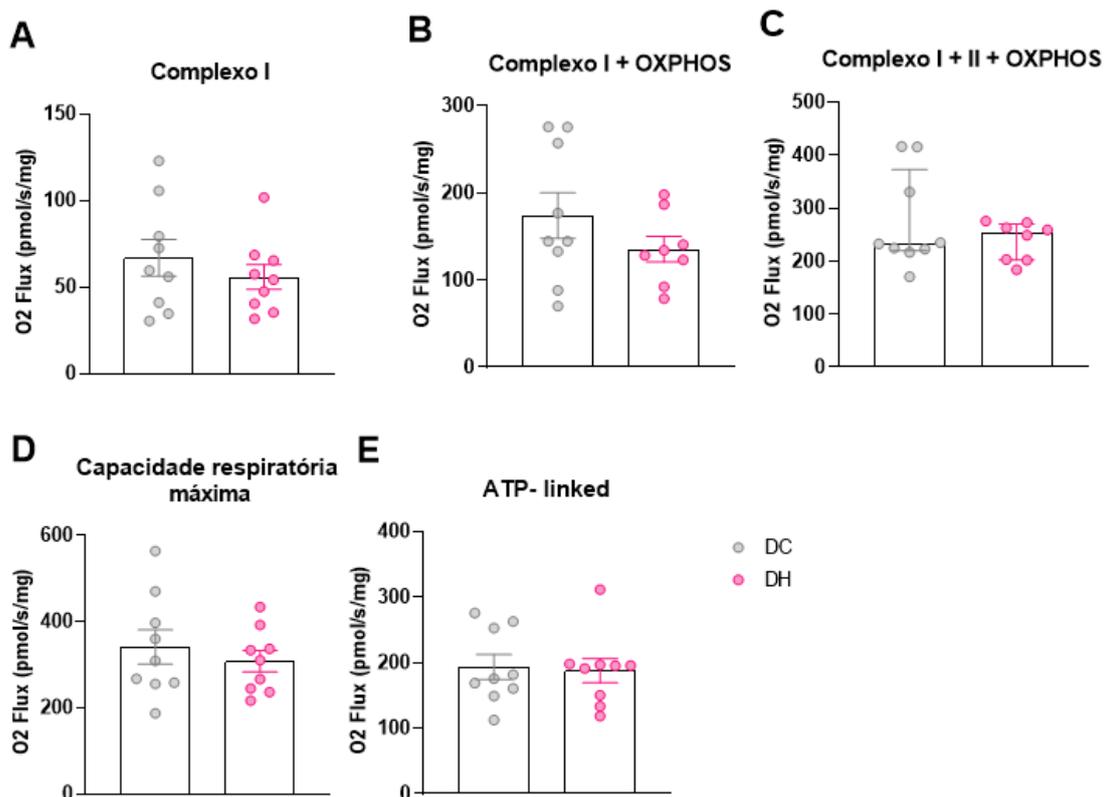


Figura 10: A DH não alterou o metabolismo energético no encéfalo dos animais. A técnica de RAR foi utilizada para avaliar os diferentes estados respiratórios mitocondriais no homogenato de encéfalo do peixe-zebra (fluxo de O₂ (pmol/s) / mg de proteína). (A) adição de substratos relacionados aos complexos I (PM). (B) Após a adição de ADP, Complexos I + OXPHOS (PM+ADP). (C) Complexos I+II+ OXPHOS (PM+ADP+S). (D) Capacidade respiratória máxima, (CCCP). (E) Capacidade respiratória relacionada à ATP-sintase (ATP-linked). Os dados paramétricos são expressos como média ± EPM. Os não paramétricos foram expressos pela mediana ± intervalo interquartil e analisados por meio do teste de Mann-Whitney. Para comparação entre 2 grupos, foi utilizado o teste t de Student. $n = 9$ por grupo. Os asteriscos indicam diferença estatística em comparação com o grupo DC. ** $p < 0,01$.

5.1.8 A DH não alterou o Consumo de oxigênio mitocondrial no encéfalo de progenitores machos (F0)

A avaliação do consumo de oxigênio mitocondrial no encéfalo dos machos progenitores não revelou alterações significativas após 66 dias de exposição à DH (Figura 7). A função mitocondrial foi preservada em todos os estados respiratórios analisados, incluindo o consumo de oxigênio pelo complexo I (A; $p = 0,9993$), complexo I + OXPHOS (B; $p = 0,6749$) e complexo II + OXPHOS (C; $p = 0,9009$). Além disso, a capacidade respiratória máxima estimulada por CCCP (D; $p = 0,1963$) e o consumo de oxigênio acoplado à produção de ATP (ATP-linked. E; $p = 0,7647$) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais. Esses achados indicam que a DH não comprometeu a função mitocondrial no encéfalo dos machos progenitores de peixe-zebra.

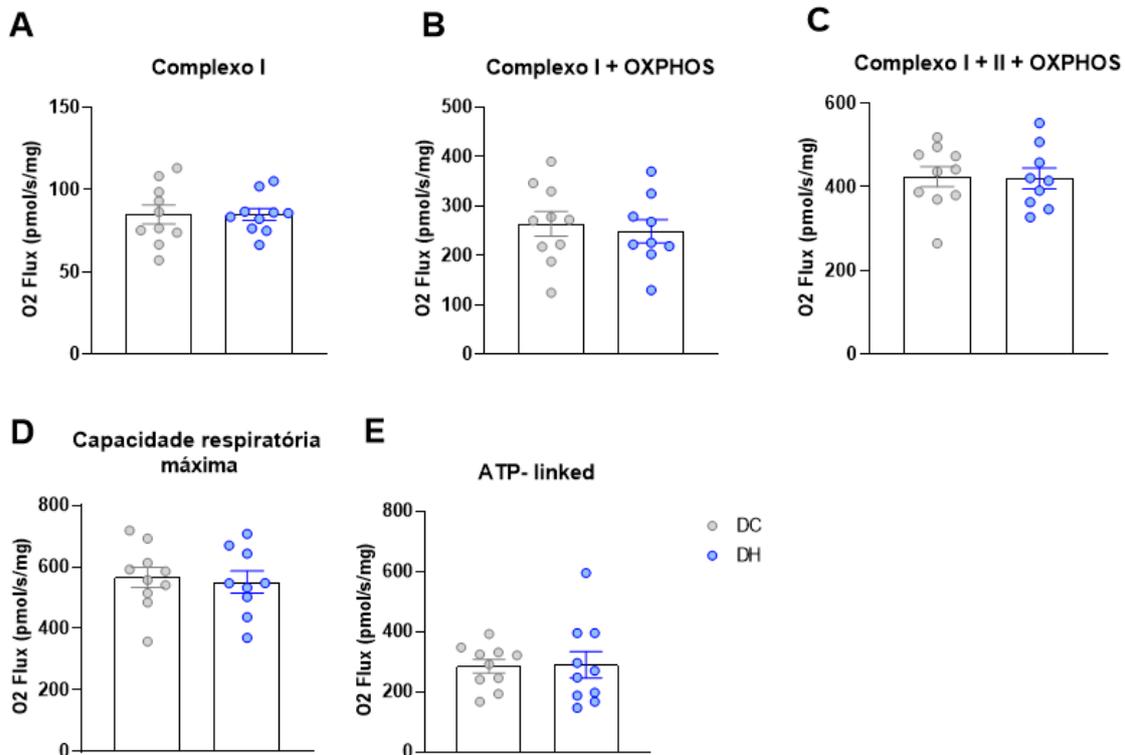


Figura 11: A DH não alterou o metabolismo energético no encéfalo dos animais. A técnica de RAR foi utilizada para avaliar os diferentes estados respiratórios mitocondriais no homogenato de encéfalo do peixe-zebra (fluxo de O₂ (pmol/s) / mg de proteína). (A) adição de substratos relacionados aos complexos I (PM). (B) Após a adição de ADP, Complexos I + OXPHOS (PM+ADP). (C) Complexos I+II+ OXPHOS (PM+ADP+S). (D) Capacidade respiratória máxima, (CCCP). (E) Capacidade respiratória relacionada à

ATP-sintase (ATP-linked). Os dados paramétricos são expressos como média \pm EPM. Para comparação entre 2 grupos, foi utilizado o teste t de Student. $n = 9$ por grupo. Os asteriscos indicam diferença estatística em comparação com o grupo DC. ** $p < 0,01$.

5.2 Efeito da DH sobre a prole

5.2.1 A DH dos progenitores (F0) afetou a viabilidades de ovos e a sobrevivência larval da prole (F1)

Após 36 dias de tratamento experimental dos progenitores F0 com DH ou DC, foram realizados cruzamentos noturnos para a geração da prole F1. No total, quatro cruzamentos foram conduzidos, resultando na obtenção de 3.067 ovos.

A Figura 12A mostra que houve diferença significativa na taxa de viabilidade dos ovos entre os grupos, conforme análise por tabela de contingência ($p < 0,01$). Entre os 1.278 ovos gerados pelos progenitores F0 alimentados com DC, 96,71% foram considerados viáveis e 3,29% não viáveis. Já entre os 1.789 ovos gerados pelos progenitores alimentados com DH, 94,69% foram viáveis e 5,31% não viáveis.

A análise de sobrevivência pelo teste de Mantel-Cox (Log-rank) indicou uma diferença significativa entre as curvas de sobrevivência da prole F1 ao final de 15 dpf. A prole oriunda de progenitores DC apresentou maior taxa de sobrevivência larval ($71,1\% \pm 1,55$) em comparação à prole de progenitores DH ($49,43\% \pm 1,33$) (Fig. 12B; $p < 0,0001$).

Além disso, a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator tempo sobre o comprimento corporal da prole [$F(2, 83) = 21,25$; $p < 0,01$], sem efeito do fator progenitores [$F(1, 83) = 1,510$; $p = 0,2227$] (Fig. 12C; $p = 0,05$).

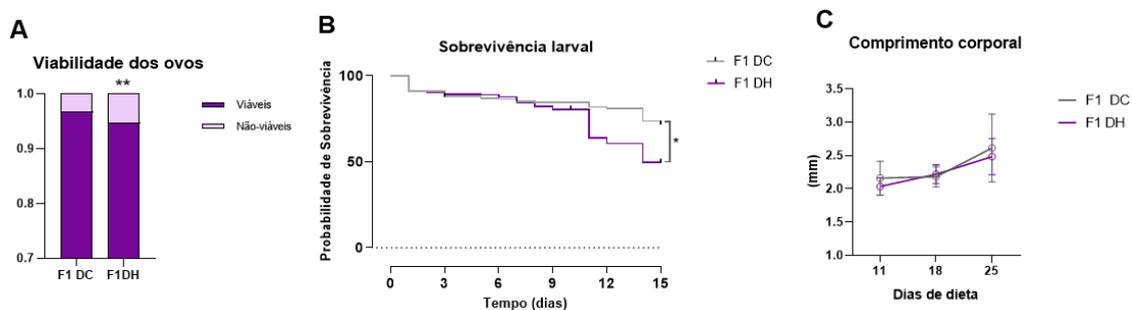


Figura 12: A DH prejudicou a sobrevivência da prole. (A) Viabilidade dos ovos. (B) Curva de sobrevivência larval. (C) Comprimento corporal. Os dados paramétricos são expressos como média \pm EPM. A viabilidade dos ovos foi avaliada pelo teste de Fisher. A curva de sobrevivência pelo teste de Mantel-

Cox. O comprimento corporal foi analisado por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. Os asteriscos indicam diferença estatística em comparação com o grupo DC. n = 15 por grupo no comprimento corporal. ** p<0,01.

5.2.2 Efeito da dieta dos progenitores (F0) sobre o peso corporal da prole (F1)

A prole F1 foi alimentada exclusivamente com a dieta controle (DC) até os 5 meses pós-fertilização (mpf). Após esse período, os animais foram submetidos à dieta experimental (DC ou DH) por 14 a 18 dias para avaliar se a exposição dos progenitores (F0) à dieta hiperlipídica (DH) poderia influenciar a susceptibilidade metabólica da prole.

Os dados da Figura 13 foram analisados por ANOVA de duas vias, que revelou um efeito significativo tanto da dieta [$F(1, 67) = 12,60$; $p < 0,001$] quanto da dieta dos progenitores [$F(1, 67) = 4,769$; $p < 0,05$] sobre o peso corporal da prole. Além disso, houve uma interação significativa entre os fatores [$F(1, 67) = 4,897$; $p < 0,05$]. O pós-teste de Tukey indicou que a prole de progenitores F0-DH apresentou um aumento significativo de peso quando submetida à dieta DH, evidenciando um efeito combinado do impacto intergeracional e da dieta na susceptibilidade ao ganho de peso (A; $p < 0,05$). Em relação ao índice de massa corporal (IMC), foi observado apenas o efeito do fator dieta [$F(1, 70) = 5,344$; $p < 0,05$], sem interação significativa entre dieta e progenitores (C; $p = 0,4660$). Já para o comprimento corporal (B) e a glicemia de jejum (D), não foram detectados efeitos significativos de nenhum dos fatores analisados.

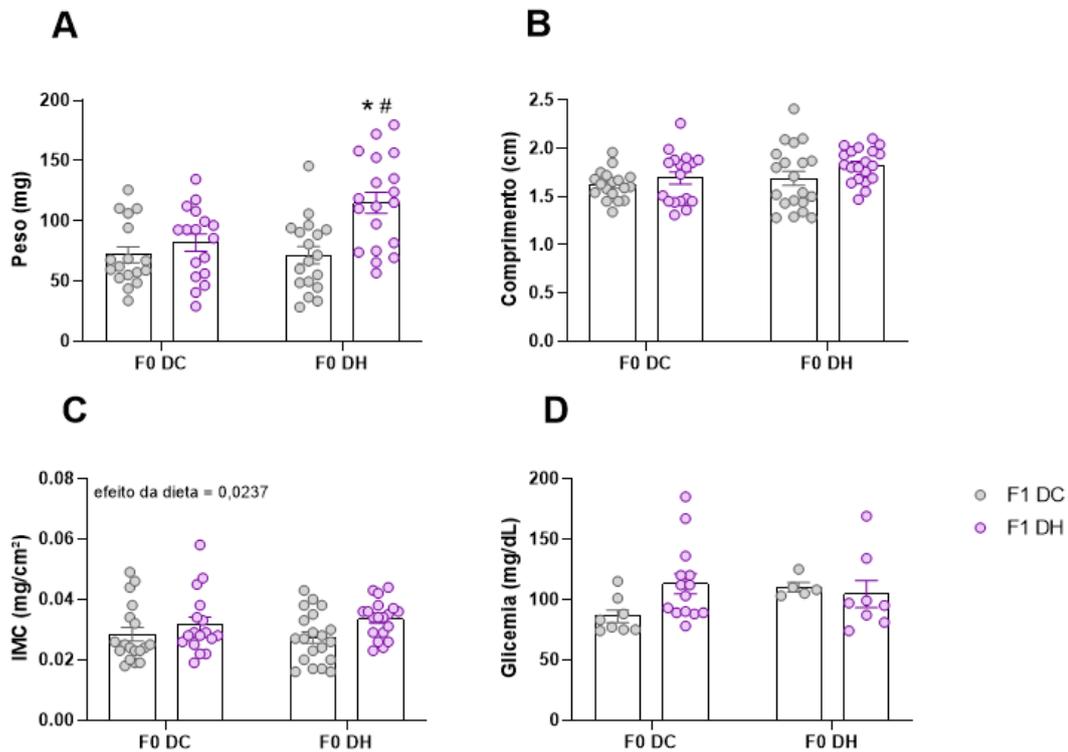


Figura 13: Efeito da DH dos progenitores (F0) na prole (F1). Após 5 mpf, a prole F1 foi submetida à dieta experimental durante 14-18 dias. (A) Peso corporal ao longo do tempo do protocolo experimental. (B) Peso corporal final no último dia de experimento. (C) IMC no último dia de experimento. (D) Comprimento corporal no último dia de experimento. Os dados paramétricos são expressos como média \pm EPM. O comprimento corporal foi analisado por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. $n = 18-20$ por grupo. * $p < 0,05$, efeito das dietas; # $p < 0,05$, efeito dos progenitores.

5.2.3 A ingestão de DH pelos progenitores (F0) não causou alterações comportamentais na prole (F1)

O teste do tanque novo, descrito na Figura 14, foi utilizado para avaliar os parâmetros locomotores e indicativos de comportamento tipo-ansioso nos animais. A análise por ANOVA de duas vias não revelou efeito significativo dos fatores dieta e progenitores sobre os parâmetros locomotores avaliados, incluindo distância total percorrida (B; dieta: $p = 0,9013$, progenitores: $p = 0,5781$, interação: $p = 0,7796$), velocidade máxima (C; dieta: $p = 0,1413$, progenitores: $p = 0,9999$, interação: $p = 0,2675$) e ângulo do giro absoluto (D; dieta: $p = 0,3733$, progenitores: $p = 0,7919$, interação: $p = 0,7919$).

No entanto, a análise do comportamento exploratório indicou um efeito significativo do fator dieta sobre o tempo na zona superior [$F(1, 58) = 6,067$; $p < 0,05$], sem influência do fator progenitores [$F(1, 58) = 0,4352$] e sem interação entre os fatores

(D; $p = 0,8359$). Além disso, foi observado um efeito significativo do fator dieta sobre o índice de exploração [$F(1, 57) = 4,937$; $p < 0,05$], mas sem efeito do fator progenitores [$F(1, 57) = 0,1109$; $p = 0,7403$] ou da interação entre os fatores (E; $p = 0,8832$).

Esses achados sugerem um comportamento do tipo ansioso na prole em resposta à alimentação com DH por 14 a 18 dias, independentemente da dieta dos progenitores.

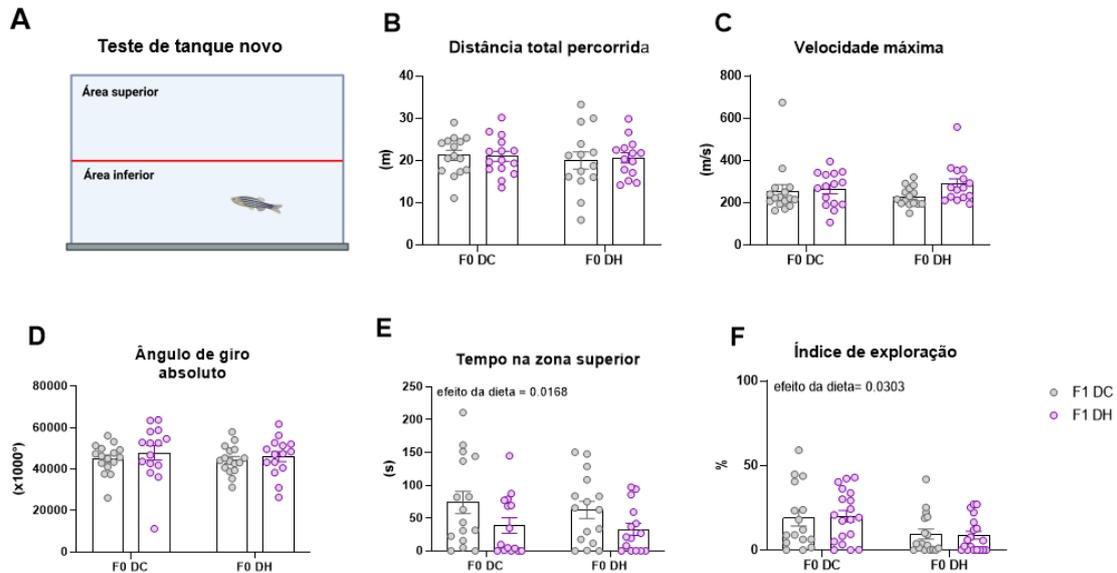


Figura 14: A ingestão de DH pelos progenitores (F0) não causou alterações comportamentais na prole (F1). (A) Protocolo experimental. (B) Distância total percorrida. (C) Velocidade máxima. (D) Ângulo de giro absoluto. (E) Tempo na zona superior. (F) Índice de exploração. O índice de exploração é calculado ($IE = ZN / (ZN + ZI) \times 100$, onde ZN e ZI são o tempo na zona superior e inferior, respectivamente). Os dados paramétricos são expressos como média \pm EPM. Analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. $n = 18-20$ por grupo.

5.2.4 O consumo de DH pelos progenitores (F0) impactou o consumo de oxigênio no encéfalo da prole (F1)

Investigamos o impacto da ingestão de DH pelos progenitores na função mitocondrial do encéfalo da prole de peixe-zebra por meio da respirômetria de alta resolução (RAR). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo dos fatores dieta [$F(1, 28) = 10,75$; $p < 0,01$] e progenitores [$F(1, 28) = 4,614$; $p < 0,05$] sobre o consumo de oxigênio relacionado ao complexo I, além de uma interação significativa entre os fatores [$F(1, 28) = 14,73$; $p = 0,0006$]. O pós-teste de Tukey demonstrou uma redução significativa na respiração mitocondrial do complexo I na prole de progenitores F0-DH

alimentada com DC (Fig. A; $p < 0,05$), indicando que a disfunção mitocondrial foi herdada independentemente da dieta da geração F1.

Por outro lado, não houve efeito significativo dos fatores dieta [$F(1, 29) = 0,4535$; $p = 0,5060$] e progenitores [$F(1, 29) = 0,7121$; $p = 0,4057$], nem interação entre os fatores (Fig. B; $p = 0,2172$) na medida relacionada ao Complexo I-OXPHOS (após a adição de ADP). Observamos uma interação significativa entre dieta e progenitores na atividade do complexo I+II OXPHOS [$F(1, 29) = 4,548$; $p < 0,05$] e na capacidade respiratória máxima após a adição do desacoplador CCCP [$F(1, 29) = 5,701$; $p = 0,0237$]. No entanto, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas nos fatores de forma independente (Fig. C e D). Apesar de uma tendência de efeito, não houve diferenças significativas nos fatores dieta e progenitores para o consumo de oxigênio associado à produção de ATP (Fig. E; dieta $p = 0,3068$, progenitores $p = 0,2609$, interação $p = 0,2362$). Esse padrão de modulação foi consistente em todas as análises, evidenciando um maior consumo de oxigênio no grupo cuja prole e progenitores F0 foram alimentados com DC, em comparação com os demais grupos.

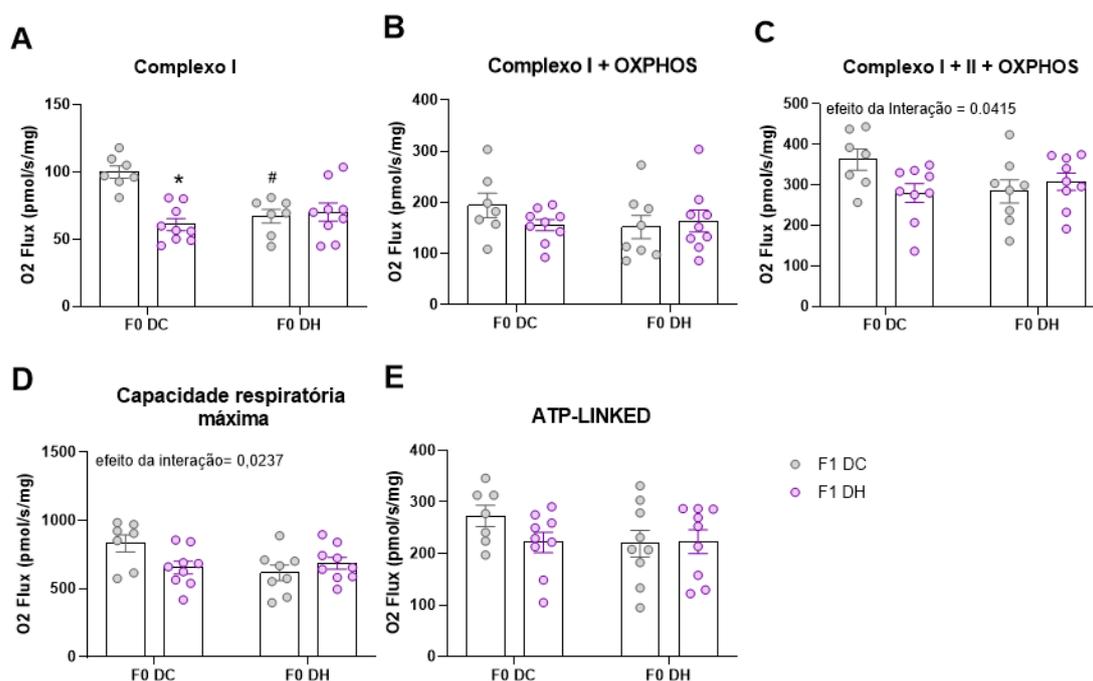


Figura 15: A prole sofreu danos mitocondriais no encéfalo devido ao consumo de DH pelos progenitores. A técnica de RAR foi utilizada para avaliar os diferentes estados respiratórios mitocondriais no homogenato do encéfalo do peixe-zebra (fluxo de O₂ (pmol/s) / mg de proteína). (A) adição de substratos relacionados aos complexos I (PM). (B) Após a adição de ADP, Complexos I + OXPHOS (PM+ADP). (C) Complexos I+II+ OXPHOS (PM+ADP+S). (D) Capacidade respiratória máxima, (CCCP). (E) Capacidade respiratória relacionada à ATP-sintase (ATP-linked). Os dados paramétricos são expressos como média ± EPM. Analisado por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. n = 8-10 por grupo. *p<0,05, na comparação entre as dietas; #p<0,05, na comparação entre os progenitores.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos os efeitos intergeracionais da ingestão de DH sobre a prole do peixe-zebra, com foco em parâmetros morfométricos, metabólicos e no neurodesenvolvimento. Nossos achados demonstram que a exposição dos progenitores à DH resultou em alterações morfométricas e indução de comportamento tipo-ansioso, evidenciando o impacto negativo da dieta obesogênica diretamente nos progenitores. Em relação à progênie, observamos que o consumo de DH pelos progenitores comprometeu a viabilidade dos ovos, reduziu a sobrevivência larval e influenciou o peso corporal dos descendentes. De maneira relevante, a análise da bioenergética cerebral por respirometria de alta resolução (RAR) revelou déficits no metabolismo mitocondrial da prole, sugerindo um efeito herdado da dieta parental. Além disso, a exposição dos descendentes aos 14-18 dias de DH também provocou sinais típicos de comportamento tipo ansioso, reforçando a hipótese de que a DH pode causar alterações metabólicas e predispor a mudanças comportamentais independentemente da dieta dos progenitores.

A OMS estima que, em 2022, uma em cada oito pessoas no mundo era considerada obesa (SAÚDE, 2024). O peixe-zebra é um modelo translacional amplamente utilizado em pesquisas biomédicas, especialmente nas áreas de neurobiologia e comportamento, com ênfase em estudos de doenças humanas (SPENCE et al., 2008; WATTS; D'ABRAMO, 2021). Protocolos em peixe-zebra induzem a obesidade nos animais por meio do consumo de dietas ricas em gordura ou pela supernutrição, e como resultado ocorrem modificações multifatoriais complexas, semelhantes às observadas no fenótipo obeso, como a desregulação metabólica (BENCHOULA et al., 2019; SU et al., 2021). A gema de ovo seca é um dos principais componentes utilizados para a indução de obesidade em peixe-zebra, sendo responsável por provocar aumento do peso corporal, lipídios, comprimento corporal e IMC (LI et al., 2023; SMOLIŃSKA et al., 2024; SU et al., 2021).

No que se refere aos progenitores, verificamos que os dados para parâmetros metabólicos se assemelham em parte a estudos recentes da literatura. Em trabalhos com a superalimentação e a ingestão de HFD por fêmeas do peixe-zebra durante 4 semanas, levou ao sobrepeso dos animais, semelhante ao que também foi observado em nosso estudo (BENCHOULA et al., 2024; GHADDAR et al., 2021). No entanto, em nosso estudo, não observamos alterações significativas no IMC e na glicemia em jejum entre os

grupos, parâmetros que, por outro lado, apresentaram alterações significativas nos estudos citados. Em relação aos machos, no nosso trabalho vimos aumento do peso corporal final e do comprimento corporal, conforme o que foi observado em outros estudos de superalimentação. Houve um aumento não significativo no BMI e na glicemia em jejum (Figura 8) (NEWMAN et al., 2016; SU et al., 2021).

É importante ressaltar que os animais utilizados em nosso trabalho são animais de cativeiro, apresentando uma grande heterogeneidade. No início do experimento, buscamos randomizar ao máximo os animais, porém o protocolo experimental exigia uma grande quantidade de indivíduos. Como consequência, alguns animais estariam em fases de vida diferentes (juvenil e adulta), o que implicou em um requerimento nutricional distinto. A fase juvenil exige uma alta necessidade de proteínas devido ao seu rápido crescimento enquanto a fase adulta prioriza a função reprodutiva com uma maior utilização de lipídios (DAMMSKI et al., [s.d.]; WATTS; D'ABRAMO, 2021).

Curiosamente, os nossos dados são consistentes com outros autores. Em um estudo de superalimentação de peixes-zebra machos e fêmeas com artemia e ração comercial, verificou-se que a dieta não influenciou significativamente os níveis de glicose em jejum nos animais (ANWER et al., 2022a). Outro estudo, com peixe-zebra machos alimentados com DH por 7 semanas, demonstrou que o tratamento dietético impactou a curva glicêmica dos animais, sem afetar a glicemia basal (CARNOVALI et al., 2018). Talvez a glicemia em jejum não seja o melhor método para avaliar o metabolismo da glicose neste modelo.

O peixe-zebra tem se destacado como um modelo com um grande potencial translacional, sendo cada vez mais utilizado em estudos de neurociências e neurobiologia do comportamento. Esse modelo já apresenta repertório comportamental bem caracterizado, exibindo na sua fase adulta comportamento semelhante à ansiedade, agressão, comportamento social e realiza atividades que exigem aprendizado e memória (RESENDE; SOCCOL, 2015). No nosso trabalho, realizamos testes comportamentais de tanque novo e de labirinto em T. O teste de tanque novo foi empregado para avaliar a atividade motora e o comportamento tipo ansioso dos animais (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009; FONTANA et al., 2019; PICCOLO et al., 2021), enquanto o teste de labirinto em T foi utilizado para investigar a memória espacial e aprendizado dos peixes (MOREIRA; LUCHIARI, 2022).

Embora alguns estudos demonstrem a influência do dimorfismo sexual em diferentes domínios comportamentais do peixe-zebra, como agressividade, medo, interação social e ansiedade em um novo ambiente (FONTANA; CLEAL; PARKER, 2020; GENARIO et al., 2020; XIANG et al., 2023), nossos dados não indicaram um efeito do dimorfismo sexual no comportamento dos progenitores adultos em relação ao consumo de DH. Tanto machos quanto fêmeas da geração F0 expostos à DH apresentaram alterações neurocomportamentais no teste de tanque novo. Os progenitores F0 alimentados com DH passaram menos tempo na zona superior do tanque e apresentaram um menor índice de exploração. Além disso, especificamente nas fêmeas, observamos uma redução na locomoção, evidenciada pela menor distância total percorrida. Esses achados são consistentes com estudos anteriores do nosso laboratório, que demonstraram um efeito ansiogênico da DH no peixe-zebra (PICOLO et al., 2021). No entanto, diferentemente de estudos prévios, não identificamos impacto da DH sobre aprendizado e memória no teste do labirinto em T. Além disso, nossos resultados corroboram evidências da literatura indicando que o consumo de DH por peixe-zebra adulto pode comprometer a função cerebral. Azbazar et al. (2023) demonstraram que a exposição prolongada à DH (um ou dois meses) resulta no aumento da expressão de marcadores pró-inflamatórios e apoptóticos, além da redução de marcadores anti-inflamatórios no cérebro. O estudo também revelou um aumento na expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), um marcador de ativação astrocitária frequentemente associado à lesão cerebral traumática (AZBAZDAR et al., 2023).

Além disso, já foi relatado que a ingestão calórica excessiva pelo peixe-zebra pode comprometer a integridade da barreira hematoencefálica (BHE), favorecendo o desenvolvimento de neuroinflamação (GHADDAR et al., 2020). O consumo excessivo de calorias pode comprometer a função reprodutiva e aumentar consequentemente a probabilidade do desenvolvimento de infertilidade. O aumento da adiposidade em homens pode estar associado a modificações na qualidade dos espermatozoides (LAINEZ; COSS, 2019; STEPHENSON et al., 2018). No peixe-zebra, já foi demonstrado que o consumo de HFD pode causar prejuízos na reprodução, modificando a qualidade do esperma e afetando a fertilidade dos animais (SU et al., 2021). A ingestão calórica excessiva em mulheres pode provocar distúrbios na menstruação, disfunção ovulatória, prejuízos no endométrio e infertilidade (ŁAKOMA; KUKHARUK; ŚLIŻ, 2023). Ainda pouco se sabe na literatura sobre o consumo de DH por fêmeas de peixe-zebra e

complicações reprodutivas. No entanto, nossos resultados mostraram que o consumo dietético dos progenitores pode afetar a viabilidade e a sobrevivência da prole. Resultados semelhantes já foram descritos em outros estudos com peixe-zebra, exemplificando a relação negativa entre a ingestão hipercalórica dos progenitores e a diminuição na taxa de viabilidade e aumento na taxa de mortalidade da prole (ADATTO et al., 2022; DO CARMO RODRIGUES VIROTE et al., 2020).

A obesidade durante o período gestacional exerce um impacto negativo na saúde materna e induz condições nutricionais adversas no início da vida dos descendentes, possivelmente por meio de mecanismos epigenéticos, promovendo modificações metabólicas que podem resultar em desfechos como a predisposição à obesidade nas gerações subsequentes (HARMANCIOĞLU; KABARAN, 2023). Além disso, a obesidade antes da concepção pode comprometer a fertilidade, dificultar a gestação, aumentar o risco de complicações no parto e induzir alterações metabólicas que impactam e persistem nas próximas gerações (STEPHENSON et al., 2018).

No presente estudo, a prole F1 foi alimentada exclusivamente com dieta controle (DC) até os 5 (mpf). Após esse período, os animais foram expostos por 14 dias à dieta experimental (DC ou DH) para avaliar se a exposição dos progenitores à DH influenciaria a suscetibilidade dos descendentes a alterações metabólicas. De fato, observamos que a dieta dos progenitores F0 impactou o peso dos descendentes F1. Especificamente, a prole de progenitores que consumiram DH apresentou maior susceptibilidade ao ganho de peso quando exposta à DH na fase juvenil. Esse achado é consistente com estudos em mamíferos, como demonstrado por Harasymowicz et al. (2020), que relataram um aumento significativo no peso e na adiposidade da prole F1 de camundongos expostos a uma DH em comparação com aqueles alimentados com dieta padrão. No entanto, em contraste com nossos resultados, estudos anteriores em peixe-zebra não encontraram diferenças significativas no peso da prole em resposta ao consumo de DH pelos progenitores ou relataram uma alta taxa de mortalidade nesses modelos (ANWER et al., 2022b; DO CARMO RODRIGUES VIROTE et al., 2020; HARASYMOWICZ et al., 2020). Esses achados destacam possíveis variações interespecies nos mecanismos de transmissão dos efeitos metabólicos induzidos por dietas obesogênicas e reforçam a necessidade de mais investigações sobre os impactos intergeracionais da DH no peixe-zebra.

As mitocôndrias desempenham um papel importante no metabolismo energético, produzindo energia na forma de ATP, a partir de substratos alimentares. Sendo o cérebro um órgão metabolicamente ativo, utilizando até 20% de toda a energia corporal. As mitocôndrias são essenciais para o seu bom funcionamento cerebral e variam conforme as exigências metabólicas de cada tecido ou órgão. O cérebro tem um metabolismo energético altamente complexo, que envolve os processos metabólicos dos neurônios e das células gliais. Desordens metabólicas, como a sobrecarga de nutrientes, podem levar à disfunção mitocondrial, comprometendo o fornecimento de energia (DE MELLO et al., 2018; DIAS et al., 2018; RAE et al., 2024; VALENTI; VACCA, 2023). Além disso, as mitocôndrias cerebrais podem apresentar produção excessiva de ROS, prejuízos no potencial de membrana, abertura de poros, aumento do volume e alteração nas cristas (SONG; BAI; SONG, 2025).

O complexo I mitocondrial é o primeiro e maior complexo da cadeia transportadora de elétrons (ETC) e desempenha um papel crucial na fosforilação oxidativa (OXPHOS). Ele catalisa a oxidação do NADH, transferindo elétrons para a ubiquinona, que é reduzida a ubiquinol, enquanto bombeia quatro prótons através da membrana mitocondrial interna (MII), gerando um gradiente eletroquímico. Esse gradiente fornece a força motriz necessária para a síntese de ATP pelo Complexo V. Além disso, o Complexo I está envolvido na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem contribuir para o estresse oxidativo e danos celulares (GUERRERO-CASTILLO et al., 2017; JANSSEN et al., 2006; LENAZ et al., 2006). No presente estudo, observamos que a exposição parental à DH afetou a função mitocondrial da prole, evidenciada por uma redução no consumo de oxigênio no encéfalo associado ao Complexo I. O consumo de uma DH compromete a biogênese mitocondrial e, quando a exposição é prolongada, afeta a disponibilidade de substratos essenciais para a geração de ATP. Como consequência, as mitocôndrias precisam ajustar sua homeostase metabólica para manter a produção eficiente de ATP. Esse desequilíbrio afeta particularmente tecidos com alta demanda energética, como o cérebro (KYRIAZIS et al., 2022). Nossos achados contrastam com os de Chausse et al. (2019), que, em um estudo com *Drosophila melanogaster* exposta à HFD, observaram um aumento do consumo de oxigênio mitocondrial no tórax dos animais. Esse aumento foi especialmente evidente nas taxas de respiração mitocondrial associadas ao Complexo I, mesmo após apenas dois dias de exposição à dieta (CORMIER et al., 2019).

Além disso, dados recentes do nosso grupo demonstraram que a combinação de HFD e estreptozotocina (STZ) induziu distúrbios metabólicos em camundongos juvenis, resultando em alterações bioenergéticas no hipocampo e comprometendo a respiração mitocondrial associada à produção de ATP (VILELA et al., 2023). De forma semelhante, um estudo recente em camundongos *Swiss* expostos à HFD por 35 dias evidenciou o impacto da dieta sobre o metabolismo mitocondrial no córtex frontal, com redução na produção de ATP e aumento na geração de ROS (MACHADO et al., 2024). Nossos dados sugerem que a dieta dos progenitores exerce um efeito duradouro sobre a bioenergética mitocondrial da prole, reduzindo o consumo de oxigênio mitocondrial em praticamente todos os estados respiratórios, independentemente da dieta recebida pelos descendentes. Esse achado reforça a hipótese de que alterações metabólicas induzidas pela DH podem ser transmitidas intergeracionalmente, impactando o funcionamento mitocondrial do sistema nervoso central na prole.

Em relação aos testes comportamentais da prole, observamos um padrão semelhante ao detectado nos progenitores, em que a DH impactou o comportamento dos peixes. No presente estudo, independentemente da dieta dos progenitores, os animais que consumiram DH apresentaram um menor tempo na zona superior e um menor índice de exploração, sugerindo um comportamento tipo-ansioso na prole F1 alimentada com DH. Em contraste, Anwer et al. (2022) observaram que o consumo hipercalórico pelos progenitores não afetou o comportamento da prole.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, foi possível estabelecer com êxito um protocolo para avaliar os efeitos intergeracionais do consumo de DH sobre a prole do peixe-zebra. Nos progenitores F0, independente do sexo dos animais, observamos complicações multifatoriais associadas à ingestão de DH, como aumento do ganho de peso e alteração no comportamento relativo ao índice de exploração.

Em relação à prole, o consumo de DH pelos progenitores F0 resultou em maior suscetibilidade à obesidade na prole, menor viabilidade dos ovos, menor sobrevivência larval e prejuízo no metabolismo mitocondrial no encéfalo. Por fim, a modulação comportamental dos progenitores foi reproduzida na prole, com a DH reduzindo o índice de exploração no teste do tanque novo. Assim, é possível concluir que a DH foi capaz de causar disfunções metabólicas e comportamentais no peixe-zebra, semelhantes ao que já é estabelecido em roedores, e ainda propagar esses efeitos intergeracionalmente. Dessa forma, o peixe-zebra se mostra um modelo inovador e promissor para estudar o impacto de dietas desequilibradas no neurodesenvolvimento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADATTO, I. et al. The effects of intensive feeding on reproductive performance in laboratory zebrafish (*Danio rerio*). **PLoS ONE**, v. 17, n. 11 November, 2022.

ANWER, H. et al. Intergenerational effects of overfeeding on aversive learning in zebrafish (*Danio rerio*). **Ecology and Evolution**, v. 12, n. 10, 2022a.

ANWER, H. et al. The effects of an obesogenic diet on behavior and cognition in zebrafish (*Danio rerio*): Trait average, variability, repeatability, and behavioral syndromes. **Ecology and Evolution**, v. 12, n. 11, 2022b.

AZBAZDAR, Y. et al. High-fat diet feeding triggers a regenerative response in the adult zebrafish brain. **Molecular Neurobiology**, v. 60, n. 5, 2023.

BALASUBRAMANIAN, S.; RAGHUNATH, A.; PERUMAL, E. **Role of epigenetics in zebrafish development**. **Gene**, 2019.

BANERJEE, R.; PURHONEN, J.; KALLIJÄRVI, J. **The mitochondrial coenzyme Q junction and complex III: biochemistry and pathophysiology**. **FEBS Journal**, 2022.

BARKER, D. J. P. Fetal origins of coronary heart disease. **BMJ**, v. 311, n. 6998, 1995.

BARROS, L. F. et al. **Metabolic Recruitment in Brain Tissue**. **Annual Review of Physiology**, 2023.

BASATEMUR, E. et al. Maternal prepregnancy BMI aNd Child Cognition: A longitudinal cohort study. **Pediatrics**, v. 131, n. 1, 2013.

BAYM, C. L. et al. Dietary lipids are differentially associated with hippocampal-dependent relational memory in prepubescent children. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, n. 5, 2014.

BÉLANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. J. **Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation**. **Cell Metabolism**, 2011.

BELENGUER, P. et al. Mitochondria and the Brain: Bioenergetics and Beyond. **Neurotoxicity Research**, v. 36, n. 2, 2019.

BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E. D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, n. 1, 2009.

BENCHOULA, K. et al. **The promise of zebrafish as a model of metabolic syndrome. Experimental Animals**, 2019.

BENCHOULA, K. et al. ¹H NMR metabolomics insights into comparative diabetes in male and female zebrafish and the antidiabetic activity of DL-limonene. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 2024.

BERRINO, F. **Western diet and Alzheimer's disease. Epidemiologia e prevenzione**, 2002.

BONVENTO, G.; BOLAÑOS, J. P. **Astrocyte-neuron metabolic cooperation shapes brain activity. Cell Metabolism**, 2021.

BORDELEAU, M. et al. Maternal high-fat diet in mice induces cerebrovascular, microglial and long-term behavioural alterations in offspring. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, 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, 1976.

BRANJE, S. et al. **Intergenerational transmission: Theoretical and methodological issues and an introduction to four Dutch cohorts. Developmental Cognitive Neuroscience**, 2020.

CAMANDOLA, S.; MATTSON, M. P. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 11, 2017.

CAMMARANO, A. et al. Obesity as a social phenomenon: A narrative review. **Epidemiologia e Prevenzione**, v. 46, n. 3, 2022.

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

CHEN, W.; ZHAO, H.; LI, Y. **Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets. Signal Transduction and Targeted Therapy**, 2023.

CHUNG, A. et al. The commercial determinants of unhealthy diets. **Public Health Research and Practice**, v. 32, n. 3, 2022.

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

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 and Metabolism**, v. 12, n. 1, 2015.

DAMMSKI, A. P. et al. **Zebrafish Manual de Criação em Biotério**. [s.l.: s.n.].

DE BEM, A. F. et al. **Animal Models of Metabolic Disorders in the Study of Neurodegenerative Diseases: An Overview. Frontiers in Neuroscience**, 2021.

DE CASTRO BARBOSA, T. et al. High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 3, 2016.

DE MELLO, A. H. et al. **Mitochondrial dysfunction in obesity. Life Sciences**, 2018.

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, 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, 2019.

DEN BROEDER, M. J. 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, 2017a.

DEN BROEDER, M. J. 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, 2017b.

DIAS, C. et al. Analysis of respiratory capacity in brain tissue preparations: high-resolution respirometry for intact hippocampal slices. **Analytical Biochemistry**, v. 551, 2018.

DING, Q. et al. Propionate induces intestinal oxidative stress via Sod2 propionylation in zebrafish. **iScience**, v. 24, n. 6, 2021.

DJAFARZADEH, S.; JAKOB, S. M. High-resolution respirometry to assess mitochondrial function in permeabilized and intact cells. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2017, n. 120, 2017.

DO CARMO RODRIGUES VIROTE, B. et al. Obesity induction in adult zebrafish leads to negative reproduction and offspring effects. **Reproduction**, v. 160, n. 6, 2020.

ESKELINEN, M. H. et al. Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: A population-based CAIDE study. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 23, n. 7, 2008.

FABIANOVÁ, K. et al. Maternal High-Energy Diet during Pregnancy and Lactation Impairs Neurogenesis and Alters the Behavior of Adult Offspring in a Phenotype-Dependent Manner. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, 2022.

FAILLACI, F. et al. **Obese zebrafish: A small fish for a major human health condition.** **Animal Models and Experimental Medicine**, 2018.

FANZO, J.; DAVIS, C. **Can Diets Be Healthy, Sustainable, and Equitable? Current obesity reports**, 2019.

FONTANA, B. D. et al. Zebrafish (*Danio rerio*) behavioral laterality predicts increased short-term avoidance memory but not stress-reactivity responses. **Animal Cognition**, v. 22, n. 6, 2019.

FONTANA, B. D.; CLEAL, M.; PARKER, M. O. Female adult zebrafish (*Danio rerio*) show higher levels of anxiety-like behavior than males, but do not differ in learning and memory capacity. **European Journal of Neuroscience**, v. 52, n. 1, 2020.

FUENTES, E. et al. High-carbohydrate and fat diet consumption causes metabolic deterioration, neuronal damage, and loss of recognition memory in rats. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 129, 2023.

GARCÍA-GARCÍA, F. J. et al. **Nutrition, bioenergetics, and metabolic syndrome. Nutrients**, 2020.

GARDENER, S. L. et al. Dietary patterns and cognitive decline in an Australian study of ageing. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 7, 2015.

GENARIO, R. et al. **Sex differences in behavior and neuropharmacology of zebrafish. European Journal of Neuroscience**, 2020.

GERLAI, R. Learning and memory in zebrafish (*Danio rerio*). **Methods in Cell Biology**, v. 134, 2016.

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, 2020.

GHADDAR, B. et al. Deleterious Effects of Overfeeding on Brain Homeostasis and Plasticity in Adult Zebrafish. **Zebrafish**, v. 18, n. 3, 2021.

GHADDAR, B.; DIOTEL, N. **Zebrafish: A New Promise to Study the Impact of Metabolic Disorders on the Brain. International Journal of Molecular Sciences**, 2022.

GNAIGER, E. **Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis**. [s.l.] Bioenerg Commun, 2020.

GODFREY, K. M. et al. **Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. The Lancet Diabetes and Endocrinology**, 2017.

GOETZMAN, E. et al. **Complex II Biology in Aging, Health, and Disease. Antioxidants**, 2023.

GOMES GONÇALVES, N. et al. Association between Consumption of Ultraprocessed Foods and Cognitive Decline. **JAMA Neurology**, v. 80, n. 2, 2023.

GUERRERO-CASTILLO, S. et al. The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 1, 2017.

GUPTA, T.; MULLINS, M. C. Dissection of organs from the adult zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, n. 37, 2010.

GUT, P. et al. Little fish, big data: Zebrafish as a model for cardiovascular and metabolic disease. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 3, 2017.

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, 2021.

HARASYMOWICZ, N. S. et al. Intergenerational Transmission of Diet-Induced Obesity, Metabolic Imbalance, and Osteoarthritis in Mice. **Arthritis and Rheumatology**, v. 72, n. 4, 2020.

HARMANCIOĞLU, B.; KABARAN, S. **Maternal high fat diets: impacts on offspring obesity and epigenetic hypothalamic programming. Frontiers in Genetics**, 2023.

HEIJMANS, B. T. et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 44, 2008.

HEINDEL, J. J. et al. **Developmental origins of health and disease: Integrating environmental influences. Endocrinology (United States)**, 2015.

HEINDEL, J. J. et al. Review of developmental origins of health and disease publications in environmental epidemiology. **Reproductive Toxicology**, v. 68, 2017.

HEMMINGSSON, E. et al. **The social origins of obesity within and across generations.** *Obesity Reviews*, 2023.

HIRST, J. **Mitochondrial complex i.** *Annual Review of Biochemistry*, jun. 2013.

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

INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES. **Gulf War and Health: Volume 11: Generational Health Effects of Serving in the Gulf War.** [s.l: s.n.]. v. 11

INZANI, I.; OZANNE, S. E. **Programming by maternal obesity: a pathway to poor cardiometabolic health in the offspring.** *The Proceedings of the Nutrition Society*, 2022.

JAEGER, K.; SABEN, J. L.; MOLEY, K. H. **Transmission of metabolic dysfunction across generations.** *Physiology*, 2017.

JANSSEN, R. J. R. J. et al. **Mitochondrial complex I: Structure, function and pathology.** *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2006.

JIANG, Z. et al. Parental mutations influence wild-type offspring via transcriptional adaptation. *Science Advances*, v. 8, n. 47, 2022.

JURDAK, N.; LICHTENSTEIN, A. H.; KANAREK, R. B. Diet-induced obesity and spatial cognition in young male rats. *Nutritional Neuroscience*, v. 11, n. 2, 2008.

KALMIJN, M. Intergenerational transmission of health behaviors in a changing demographic context: The case of smoking and alcohol consumption. *Social Science and Medicine*, v. 296, 2022.

KAPOGIANNIS, D. **Energy metabolism and the brain: A bidirectional relationship.** *Ageing Research Reviews*, 2015.

KONTOCHRISTOPOULOU, A. M. et al. Parental practices and children's lifestyle correlates of childhood overweight/obesity in Europe: The Feel4Diabetes study. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 37, n. 1, 2024.

KYRIAZIS, I. D. et al. **The impact of diet upon mitochondrial physiology (Review)**. **International Journal of Molecular Medicine**, 2022.

LAINIZ, N. M.; COSS, D. **Obesity, Neuroinflammation, and Reproductive Function**. **Endocrinology (United States)**, 2019.

ŁAKOMA, K.; KUKHARUK, O.; ŚLIŹ, D. **The Influence of Metabolic Factors and Diet on Fertility**. **Nutrients**, 2023.

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, 2017.

LANGLEY, M. R. et al. High fat diet consumption results in mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and oligodendrocyte loss in the central nervous system. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 3, 2020.

LAWRENCE, C. et al. The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquaculture**, v. 368–369, 2012.

LENAZ, G. et al. **Mitochondrial Complex I: Structural and functional aspects**. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, 2006.

LEVIN, E. D.; BENCAN, Z.; CERUTTI, D. T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiology and Behavior**, v. 90, n. 1, 2007.

LI, X. et al. Effects of Nutritionally Induced Obesity on Metabolic Pathways of Zebrafish. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, 2023.

LICITRA, R. et al. **Zebrafish Feed Intake: A Systematic Review for Standardizing Feeding Management in Laboratory Conditions**. **Biology** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 abr. 2024.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. **Animal models of human disease: Zebrafish swim into view.** *Nature Reviews Genetics*, 2007.

LIN, C. et al. Maternal High-Fat Diet Multigenerationally Impairs Hippocampal Synaptic Plasticity and Memory in Male Rat Offspring. *Endocrinology (United States)*, v. 162, n. 1, 2021.

MA, J. et al. A Comprehensive Study of High Cholesterol Diet-Induced Larval Zebrafish Model: A Short-Time In Vivo Screening Method for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Drugs. *International Journal of Biological Sciences*, v. 15, n. 5, 2019.

MACHADO, A. E. et al. Short-term high-fat diet alters behavior, peripheral metabolism, and brain mitochondrial function in Swiss mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, v. 96, p. e20240880, 2024.

MAGISTRETTI, P. J.; ALLAMAN, I. **A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging.** *Neuron*, 2015.

MARTÍNEZ-VILLANUEVA, J. et al. Parental obesity is associated with the severity of childhood obesity and its comorbidities. *Anales de Pediatría*, v. 90, n. 4, 2019.

MEGURO, S.; HASUMURA, T.; HASE, T. Body fat accumulation in zebrafish is induced by a diet rich in fat and reduced by supplementation with green tea extract. *PLoS ONE*, v. 10, n. 3, 2015.

MIMAKI, M. et al. **Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease.** *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 2012.

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

MORENO-FERNÁNDEZ, S. et al. High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model. *Nutrients*, v. 10, n. 10, 2018.

NASIADKA, A.; CLARK, M. D. Zebrafish breeding in the laboratory environment. *ILAR Journal*, v. 53, n. 2, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª Edição ed. São Paulo: [s.n.].

NEWMAN, T. et al. Dietary intake influences adult fertility and offspring fitness in zebrafish. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, 2016.

NINKOVIC, J. et al. Genetic identification of AChE as a positive modulator of addiction to the psychostimulant D-amphetamine in zebrafish. **Journal of Neurobiology**, v. 66, n. 5, 2006.

NOLFI-DONEGAN, D.; BRAGANZA, A.; SHIVA, S. **Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement**. **Redox Biology**, 2020.

NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. **Mitochondria: In sickness and in health**. **Cell**, 2012.

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

PASINETTI, G. M.; EBERSTEIN, J. A. **Metabolic syndrome and the role of dietary lifestyles in Alzheimer's disease**. **Journal of Neurochemistry**, 2008.

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. **Metabolic Programming: Long-Term Consequences of High-carbohydrate Feeding in the Immediate Postnatal Period**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://neoreviews.aappublications.org/>>.

PATTI, M. E. **Intergenerational programming of metabolic disease: Evidence from human populations and experimental animal models**. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2013.

PEDROSO, G. L. et al. Blood collection for biochemical analysis in adult zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, 2012.

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, 2021.

PRASUN, P. **Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome.** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 2020.

RAE, C. D. et al. Brain energy metabolism: A roadmap for future research. *Journal of Neurochemistry*, v. 168, n. 5, 2024.

RAI, V. **High-Fat Diet, Epigenetics, and Atherosclerosis: A Narrative Review.** *Nutrients* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 jan. 2025.

RAIMAN, L. et al. The role of physical activity in obesity: let's actively manage obesity. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, v. 23, n. 4, 2023.

RAO, W. W. et al. **Obesity increases the risk of depression in children and adolescents: Results from a systematic review and meta-analysis.** *Journal of Affective Disorders*, 2020.

RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações.** São Paulo: [s.n.]. v. 1

SANTILLI, F.; BOSKOVIC, A. **Mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance: lessons from animal model organisms.** *Current Opinion in Genetics and Development*, 2023.

SAÚDE. **Noncommunicable diseases.** Disponível em: <<https://www.emro.who.int/noncommunicable-diseases/causes/unhealthy-diets.html>>. Acesso em: 16 dez. 2024.

SAÚDE. **Obesity and overweight.** Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 5 fev. 2025.

SMOLIŃSKA, K. et al. Innovative high fat diet establishes a novel zebrafish model for the study of visceral obesity. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, 2024.

SOENGAS, J. L.; ALDEGUNDE, M. **Energy metabolism of fish brain.** *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 2002.

SONG, M.; BAI, Y.; SONG, F. High-fat diet and neuroinflammation: The role of mitochondria. **Pharmacological Research**, v. 212, p. 107615, fev. 2025.

SPENCE, R. et al. **The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio***. **Biological Reviews**, 2008.

STEELE, S. L.; PRYKHOZHII, S. V.; BERMAN, J. N. **Zebrafish as a model system for mitochondrial biology and diseases**. **Translational Research**, 2014.

STEPHENSON, J. et al. **Before the beginning: nutrition and lifestyle in the preconception period and its importance for future health**. **The Lancet**, 2018.

SU, L.; PATTI, M. E. **Paternal Nongenetic Intergenerational Transmission of Metabolic Disease Risk**. **Current Diabetes Reports**, 2019.

SU, Y. et al. Obesity Causes Abrupt Changes in the Testicular Microbiota and Sperm Motility of Zebrafish. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

THOMPSON, W. A. et al. Excess feeding increases adipogenesis but lowers leptin transcript abundance in zebrafish larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 276, 2024.

TIAN, S. et al. Intergenerational reproductive toxicity of parental exposure to prothioconazole and its metabolite on offspring and epigenetic regulation associated with DNA methylation in zebrafish. **Environment International**, v. 173, 2023.

TÜRKOĞLU, M. et al. The potential effect mechanism of high-fat and high-carbohydrate diet-induced obesity on anxiety and offspring of zebrafish. **Eating and Weight Disorders**, v. 27, n. 1, 2022.

VALENTI, D.; VACCA, R. A. **Brain Mitochondrial Bioenergetics in Genetic Neurodevelopmental Disorders: Focus on Down, Rett and Fragile X Syndromes**. **International Journal of Molecular Sciences**, 2023.

VALLES, S. et al. Exposure to low doses of inorganic arsenic induces transgenerational changes on behavioral and epigenetic markers in zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 396, 2020.

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

WATTS, S. A.; D'ABRAMO, L. R. **Standardized Reference Diets for Zebrafish: Addressing Nutritional Control in Experimental Methodology. Annual Review of Nutrition**, 2021.

WORLD OBESITY. **Atlas Mundial da Obesidade 2024**. Disponível em: <https://www.worldobesityday.org/assets/downloads/WOF_Obesity_Atlas_2024.pdf>. Acesso em: 2 mar. 2025.

XIANG, J. et al. Brain metabolite profiles provide insight into mechanisms for behavior sexual dimorphisms in zebrafish (*Danio rerio*). **Physiology and Behavior**, v. 263, 2023.

YASSINE, H. N. et al. **Nutritional metabolism and cerebral bioenergetics in Alzheimer's disease and related dementias. Alzheimer's and Dementia**, 2023.

ZANG, L.; MADDISON, L. A.; CHEN, W. **Zebrafish as a model for obesity and diabetes. Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 2018.

ZHAO, W. et al. **The uses of zebrafish (*Danio rerio*) as an in vivo model for toxicological studies: A review based on bibliometrics. Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2024.

ZHU, Z.; CAO, F.; LI, X. **Epigenetic Programming and Fetal Metabolic Programming. Frontiers in Endocrinology**, 2019.

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, 2022.

ZOU, Y. Y. et al. A High-Fat Diet Induces Muscle Mitochondrial Dysfunction and Impairs Swimming Capacity in Zebrafish: A New Model of Sarcopenic Obesity. **Nutrients**, v. 14, n. 9, 2022.