

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

***Zebrafish (Danio rerio)* como modelo de obesidade
induzida por dieta e possíveis alterações relacionadas
ao exercício físico forçado**

GABRIELA PACHECO MENDES

DOCTORADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA-DF

JUNHO/2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

***Zebrafish (Danio rerio)* como modelo de obesidade
induzida por dieta e possíveis alterações relacionadas
ao exercício físico forçado**

GABRIELA PACHECO MENDES

DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA-DF

JUNHO/2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

***Zebrafish (Danio rerio) como modelo de obesidade
induzida por dieta e possíveis alterações relacionadas
ao exercício físico forçado***

GABRIELA PACHECO MENDES

ORIENTADOR: EDUARDO MAURÍCIO MENDES DE LIMA

DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 21/2022

BRASÍLIA/DF

JUNHO/2022

Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo de obesidade induzida por dieta e possíveis alterações relacionadas ao exercício físico forçado

GABRIELA PACHECO MENDES

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM SAÚDE ANIMAL

APROVADA POR:



**EDUARDO MAURÍCIO MENDES DE LIMA, Doutor (Universidade de Brasília)
(ORIENTADOR)**



**MARCELO ISMAR SILVA SANTANA, Doutor (Universidade de Brasília)
(EXAMINADOR INTERNO)**



**ANDRÉ RODRIGUES DA CUNHA BARRETO VIANNA, Doutor (universidade Federal do Paraná)
(EXAMINADOR EXTERNO)**



**HILDEBRANDO GOMES BENEDICTO, Doutor (Universidade Federal Fluminense)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 14 DE JUNHO DE 2022

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MENDES, G. P. **Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo de obesidade induzida por dieta e possíveis alterações relacionadas ao exercício físico forçado**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2022, 76 p. Tese de doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

PM538z	Pacheco Mendes, Gabriela Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) como modelo de obesidade induzida por dieta e possíveis alterações relacionadas ao exercício físico forçado / Gabriela Pacheco Mendes; orientador Eduardo MAURÍCIO MENDES DE LIMA . -- Brasília, 2022. 77 p. Tese (Doutorado - Doutorado em Saúde Animal) -- Universidade de Brasília, 2022. 1. Dieta. 2. Zebrafish. 3. cardiomiócitos. 4. hepatócitos. 5. exercício físico. I. MAURÍCIO MENDES DE LIMA , Eduardo , orient. II. Título.
--------	---

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e minha irmã pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas e em todas as etapas que precisei passar para chegar até aqui.

A minha família por serem tão amorosos e presentes em minha vida.

Aos meus amigos pelo amor, companheirismo e por estarem ao meu lado na caminhada da vida.

Ao meu orientador Prof. Eduardo Maurício Mendes de Lima, pelo acolhimento, pelos ensinamentos e pela dedicação. Foram fundamentais para os melhores resultados.

Sumário

INTRODUÇÃO.....	9
REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPITULO 1	18
INTRODUÇÃO	20
MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO	28
CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS.....	32
CAPITULO 2	35
INTRODUÇÃO	37
MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
RESULTADOS	44
DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS.....	51
CAPITULO 3	55
INTRODUÇÃO	56
MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
RESULTADOS	64

DISCUSSÃO	68
CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS.....	72

RESUMO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, estima-se que 310 milhões de pessoas sejam obesas. Os experimentos envolvendo roedores foram importantíssimos para o conhecimento patofisiológico da obesidade, porém estes exigem estruturas relativamente caras e complexas. Com isso, surgiu a demanda de modelos mais simples e baratos para complementar as pesquisas que empregam roedores. A consolidação do Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo experimental para doenças metabólicas, como obesidade, é de suma importância. Neste estudo, os animais foram divididos em 4 grupos, diferentes na oferta de dieta hipercalórica e na submissão do exercício físico. Ao longo de todo experimento, foi aferido semanalmente a massa corporal e o comprimento corporal. Ao final da décima terceira semana, foi feita a eutanásia dos animais, e os peixes processados para análise histológica, onde foi avaliada a morfometria dos cardiomiócitos e dos hepatócitos. Para análise estatística, foi avaliada a normalidade das amostras, seguida pelos testes paramétricos ou não paramétricos.

Palavras-chave: Dieta, Zebrafish, cardiomiócitos, hepatócitos, exercício físico.

ABSTRACT

According to the World Health Organization, 310 million people are obese. This estimate is worrying, given the high correlation between obesity and several other diseases, such as atherosclerosis, hypertension and type 2 diabetes. Experiments involving rodents were very important for the pathophysiological knowledge of obesity, but these require relatively expensive and complex structures. As a result, the demand for simpler and cheaper models to complement rodent research has emerged. The consolidation of Zebrafish (*Danio rerio*) as an experimental model for metabolic diseases, such as obesity,

is of extreme importance. There are several advantages to using the Zebrafish model (*Danio rerio*) of obesity induced by diet. The many experiments that emerged were important for the pathophysiological knowledge of obesity require relatively expensive and complex structures. As a result, a demand for simpler and cheaper models arose to complement research that employs rodents. The consolidation of Zebrafish (*Danio rerio*) as an experimental model for metabolic diseases, such as obesity, is of paramount importance. In this study, the animals were divided into 4 groups, different in the offer of a hypercaloric diet and physical exercise. Throughout the experiment, body mass and body length were measured weekly. At the end of the thirteenth week, the animals were euthanized and the fish processed for histological analysis, where the morphometry of cardiomyocytes and hepatocytes was evaluated. For statistical analysis, the normality of the samples was evaluated, followed by parametric or non-parametric tests.

Keywords: Dieta, Zebrafish, cardiomyocytes, hepatocytes, physical exercise.

INTRODUÇÃO

O interesse gerado a partir da obtenção dos resultados da presente proposta levam em consideração que a obesidade é uma epidemia mundial, sendo que é notória e de grande relevância a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos ao longo do seu desencadeamento e diferentes consequências para os tecidos orgânicos. É de suma importância o entendimento no tocante as relações moleculares e celulares que ocorrem nos diferentes tecidos constituintes dos sistemas orgânicos, especialmente em Zebrafish (BARRETO-VIANNA *et al.*, 2016).

Ao longo das últimas décadas foram realizadas investigações massivas em modelos de obesidade, principalmente utilizando roedores. De outra forma, o Zebrafish pode ser considerado um modelo biológico consolidado em diversas áreas, principalmente na neurociência e na organogênese, e nessa última década vem se estabelecendo como um promissor modelo para o estudo da obesidade e suas comorbidades relacionadas. No entanto deve ser entendido e ressaltado ainda que existem lacunas e perguntas a serem respondidas ao longo da linha de pesquisa já estabelecida (OKA *et al.*, 2010).

Portanto, a busca efetiva de conhecimentos relacionados com a obesidade e ainda a imposição de esforço o Zebrafish revela-se de notória importância. Em especial, ao fato dos resultados e objetivos a serem alcançados apresentarem como base a estrutura central de núcleos e centros de pesquisa. Sendo assim entende-se que é possível o esclarecimento das prováveis modificações metabólicas sistêmicas, decorrentes da obesidade e quais os efeitos diretos ou indiretos, bem como, quais as alterações e prováveis danos que irão comprometer a integridade da saúde do animal.

O trabalho teve como objetivo avaliar, em peixes Zebrafish (*Danio rerio*) adultos, com sobrepeso induzido por dieta e submetidos a exercício físico, indicadores de lesão e inflamação cardíaca e hepática. Para isso, os animais foram induzidos ao sobrepeso, submetidos ao treinamento de natação forçada e avaliados a massa corporal, adiposidade, lesão no tecido cardíaco e esteatose hepática.

REFERENCIAL TEÓRICO

A síndrome metabólica, que representa um conjunto de condições, incluindo hipertensão arterial, níveis elevados de açúcar no sangue, excesso de gordura ao redor da cintura e níveis anormais de colesterol, está se tornando mais comum como resultado da crescente prevalência de obesidade. Portanto, a obesidade é considerada um importante fator de risco para doenças cardiovasculares, diabetes, distúrbios musculoesqueléticos e alguns tipos de câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Nas últimas décadas, a obesidade tornou-se epidemia mundial, principalmente devido a um estilo de vida pouco saudável, caracterizado por uma ingestão excessiva de calorias e ausência de atividade física. Esta condição leva a um aumento no tecido adiposo, resistência à hormônios anorexigênicos, como insulina e leptina, e alteração no balanço energético a nível central, caracterizado pela diminuição do gasto energético e aumento do consumo alimentar (BARRETO-VIANNA *et al.*, 2016).

Muitas comorbidades estão associadas à obesidade, como cardiopatias, diversos tipos de câncer, hipertensão arterial sistêmica, diabetes melittus tipo 2, intolerância à glicose, dislipidemias, hipergliceridemia, hipercolesterolemia, doença hepática gordurosa não alcoólica e esteatohepatite não alcoólica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Embora as pesquisas no campo das doenças metabólicas, como obesidade, tenham evoluído consideravelmente a partir dos resultados obtidos em experimentos com roedores, estes modelos exigem estruturas relativamente caras e mais complexas. Com isso, surgiu a demanda de modelos de obesidade em animais, que sejam mais simples e

de baixo custo e ainda venham complementar os modelos de roedores atualmente utilizados. Estudos recentes sobre a homeostase energética em vermes, moscas e Zebrafish mostraram que esses organismos inferiores podem ser usados para desvendar os processos metabólicos subjacentes à obesidade (CHIANG e MACDOUGALD, 2003; SCHLEGEL e STAINIER, 2007).

Dentre estes o Zebrafish (*Danio rerio*) é considerado um bom modelo de vertebrado simples e de fácil manuseio (D'ANGELO *et al.*, 2016), além de possuir sua organização tecidual muito similar com a dos mamíferos (WANG *et al.*, 2010; HARPER e LAWRENCE, 2016). O emprego do Zebrafish (*Danio rerio*) em pesquisas envolvendo parâmetros metabólicos como aumento de massa corporal, adiposidade e gasto energético é relativamente atual em comparação com as pesquisas que utilizam como modelo os roedores (FLYNN *et al.*, 2009; ANDERSON *et al.*, 2011). Contextualizando, foi publicado um importante trabalho que empregou o Zebrafish (*Danio rerio*) em modelo de obesidade induzida por dieta (OKA *et al.*, 2010). O Zebrafish (*Danio rerio*) obeso expressou aumento da massa corporal, hipertrigliceridemia e esteatose hepática, os autores viram ainda através da análise do transcriptoma no tecido adiposo, ao instante que a fisiopatologia da obesidade no Zebrafish (*Danio rerio*) assemelha-se muito aquela evidenciada nos mamíferos, sugerindo que o modelo de Zebrafish (*Danio rerio*) obeso induzido por dieta pode ser usado para identificar alvos farmacológicos e testar ainda novos fármacos para o tratamento da obesidade humana (OKA *et al.*, 2010).

Existem várias vantagens em se utilizar o modelo de Zebrafish (*Danio rerio*) obeso induzido por dieta. Um destes aspectos, é que alimentação dos peixes pode ter como base artêmias, que são pequenos crustáceos da ordem Anostraca, sendo que sua criação é muito simples e baixo custo, além de fácil acesso em todos continentes. A ingestão de artêmias seguindo a dieta preconizada foi capaz de desenvolver obesidade em

quase todos animais.

De outra forma, existem diversas linhagens de camundongos, dentre estas a linhagem utilizada para estudos relativos a obesidade é a C57BL/6, esta linhagem desenvolve obesidade quando é alimentada de dietas hipercalóricas, porém com distintas variações entre os indivíduos, refletindo em grande variabilidade na adiposidade dos animais, além do fato de que cerca de metade dos animais serem resistentes à obesidade induzida pela dieta, o mesmo também é visto em ratos Sprague-Dawley. Sobretudo essa característica de resistência a obesidade ainda não foi identificada no modelo de Zebrafish (*Danio rerio*) (OKA *et al.*, 2010).

As respostas relativamente homogêneas do Zebrafish (*Danio rerio*) à sobrealimentação com artêmias sugerem que esses peixes representem uma excelente espécie de modelo alternativo para pesquisas experimentais sobre obesidade. Além disso, o protocolo dietético para induzir a obesidade em Zebrafish (*Danio rerio*) é simples e pode ser aplicado a outras linhagens dessa espécie (OKA *et al.*, 2010).

No modelo de Zebrafish (*Danio rerio*) alimentado com dieta hiperlipídica por curto espaço de tempo, 8 semanas, Landgraf *et al.* (2017) observaram aumento dos níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol e esteatose hepática. No entanto, a diferença na glicemia sanguínea entre o grupo que recebeu dieta hiperlipídica e o que recebeu dieta controle, foi modesta, provavelmente devido a curta duração do estudo, sugerindo que a consolidação da obesidade, assim como o estabelecimento das comorbidades associadas a ela, seja um processo mais longo, necessitando de um protocolo maior que 8 semanas. Neste estudo, visualizaram ainda aumento dos genes relacionados ao metabolismo lipídico e inflamação, tal qual alterações no número e tamanho dos adipócitos do tecido subcutâneo e visceral.

Como citado anteriormente, a obesidade altera a homeostase, podendo ser observado resistência à insulina, diabetes e dislipidemia, patologias estas, que em conjunto são parte da síndrome metabólica. No fígado, a síndrome metabólica é manifestada como doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) (FORN-CUNI *et al.*, 2015).

A NAFLD compreende um amplo espectro de lesões hepáticas progressivas, incluindo esteatose de grau leve a moderado, hepatite, necrose de hepatócitos, podendo cronicamente apresentar fibrose hepática, que também é denominada esteatohepatite não alcoólica (NASH), que é considerado a principal causa de cirrose criptogênica (YU *et al.*, 2013; DUAN *et al.*, 2014; FORN-CUNI *et al.*, 2015).

Em Zebrafish (*Danio rerio*) obeso induzido por dieta, Forn-Cuni *et al.* (2015) estudaram como a síndrome metabólica modula a resposta imune no fígado doente e verificaram que a NAFLD induzida pela obesidade exibiu expressão ligeiramente maior de marcadores pró-inflamatórios. Além disso, verificaram que, após um estímulo inflamatório forte, o equilíbrio apoptótico no Zebrafish (*Danio rerio*) obeso foi fortemente estimulado em relação aos estímulos de proliferação celular, enquanto havia equilíbrio entre os agentes pró e anti-apoptóticos na resposta saudável. Essas diferenças em relação ao modo como o fígado doente responde à inflamação aguda, sugere as distintas possibilidades que podem ajudar na compreensão da associação entre NAFLD e o aumento da incidência de hepatocarcinoma.

Oka *et al.* (2010) ao consolidarem o modelo de obesidade pela alta ingestão de artêmias, observaram que não houve diminuição da atividade física no Zebrafish (*Danio rerio*) obeso, indicando que o desenvolvimento da obesidade foi devido ao aumento da ingestão de dieta rica em gordura e não devido a diminuição da atividade física.

Os peixes são animais que estão na maior parte do tempo se movimentando, e a natação pode ser estimulada ao serem colocados num ambiente com corrente de água. Por ser uma prática relativamente simples e barata, os peixes caracterizam-se como bons modelos para o estudo sobre os efeitos do exercício forçado por longos períodos, estabelecendo assim o enduro. Muitas variáveis podem mudar após o treinamento. Algumas mudanças, como melhora na taxa de crescimento, são estruturais ou morfológicas, expressas em diferentes sistemas orgânicos, e se relacionam ao regime de exercícios, incluindo as espécies utilizadas, a velocidade de treinamento e sobretudo a dieta fornecida (DAVISON, 1989, 1997).

Especificamente, o exercício físico em peixes culmina com alterações centrais e periféricas semelhantes às observadas em mamíferos. O coração se adapta a nova demanda vascular, o mesmo também é verificado no sistema muscular estriado esquelético, revelando um aumento nos níveis de tiroxina, caracteristicamente os níveis dos hormônios relacionados ao estresse, como catecolaminas e cortisol (FARRELL *et al.*, 1991; BUTLER e DAY, 1993; DAVISON, 1997).

Apesar da prática de exercitar peixes no sistema de correnteza ter sido utilizada desde a década de 90 (HAMMER, 1995; DAVISON, 1997; KIEFFER, 2000), seus efeitos em animais obesos ainda não foram avaliados, nem mesmo dinamizados a nível reprodutível. Com a consolidação dos modelos de obesidade induzida por dieta utilizando Zebrafish (*Danio rerio*), é de extrema importância ter como conhecimento como esses animais respondem, principalmente no que tangem as alterações metabólicas e celulares, em decorrência do aumento do gasto energético induzido pelo exercício físico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J.L.; CARTEN, J.D.; FARBER, S.A. Zebrafish lipid metabolism: from mediating early patterning to the metabolism of dietary fat and cholesterol. *Methods Cell Biol*; 101:111-141, 2011.

BARRETO-VIANNA, A.R.; AGUILA, M.B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Effects of liraglutide in hypothalamic arcuate nucleus of obese mice. *Obesity (Silver Spring)*; 24:626-633, 2016.

BUTLER, P.; DAY, N. The relationship between intracellular pH and swimming performance of brown trout exposed to neutral and sublethal pH. *Journal of experimental biology*; 176:271-284, 1993.

CHIANG, S.H., MACDOUGALD, O.A. Will fatty worms help cure human obesity? *Trends Genet* 2003; 19:523-525, 2016.

D'ANGELO, L.; CASTALDO, L.; DE GIROLAMO, P.; LUCINI, C.; PAOLUCCI, M.; PELAGALLI, A.; VARRICCHIO, E.; ARCAMONE, N. Orexins and receptor OX2R in the gastroenteric apparatus of two teleostean species: *Dicentrarchus labrax* and *Carassius auratus*. *Anat Rec (Hoboken)*; 299:1121-1129, 2016.

DAVISON, W. Training and its effects on teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*; 94:1-10, 1989.

DAVISON, W. The effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*; 117:67-75, 1997.

DUAN, X.Y.; ZHANG, L.; FAN, J.G.; QIAO, L. NAFLD leads to liver cancer: do we have sufficient evidence? *Cancer Lett*; 345:230-234, 2014.

FARRELL, A.; JOHANSEN, J.; SUAREZ, R. Effects of exercise-training on cardiac performance and muscle enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry*; 9:303-312, 1991.

FLYNN, E.J.3RD.; TRENT, C.M.; RAWLS, J.F. Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *J Lipid Res*; 50:1641-1652, 2009.

FORN-CUNI, G.; VARELA, M.; FERNANDEZ-RODRIGUEZ, C.M.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. Liver immune responses to inflammatory stimuli in a diet-induced obesity model of zebrafish. *J Endocrinol*; 224:159-170, 2015.

HAMMER, C. Fatigue and exercise tests with fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*; 112:1-20, 1995.

HARPER, C.; LAWRENCE, C. *The laboratory zebrafish*: **Crc Press**, 2016.

KIEFFER, J.D. Limits to exhaustive exercise in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*; 126:161-179, 2000.

SCHLEGEL, A.; STAINIER, D.Y. Lessons from "lower" organisms: what worms, flies, and zebrafish can teach us about human energy metabolism. *PLoS Genet*; 3:e199, 2007.

WANG, Z.; DU, J.; LAM, S.H.; MATHAVAN, S.; MATSUDAIRA, P.; GONG, Z. Morphological and molecular evidence for functional organization along the rostrocaudal axis of the adult zebrafish intestine. *BMC Genomics*; 11:392, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION W.*Global report on obesity*: **World Health Organization**, 2016.

YU, J.; SHEN, J.; SUN, T.T.; ZHANG, X.; WONG, N. Obesity, insulin resistance, NASH and hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol*; 23:483-491, 2013.

LANDGRAF, K.; SCHUSTER, S.; MEUSEL, A.; GARTEN, A.; RIEMER, T.; SCHLEINITZ, D.; KIESS, W.; KÖRNER, A. Short-term overfeeding of zebrafish with normal or high-fat diet as a model for the development of metabolically healthy versus unhealthy obesity. **BMC physiology**, v.17, n.1, p. 4-26, 2017.

OKA, T.; NISHIMURA, Y.; ZANG, L.; HIRANO, M.; SHIMADA, Y.; WANG, Z.; UMEMOTO, N.; KUROYANAGI, J.; NISHIMURA, N.; TANAKA, T. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. **BMC physiology**, v.10, p.21-52, 2010.

CAPITULO 1

OS EFEITOS DE DIETA HIPERCALÓRICA E DO EXERCÍCIO FÍSICO EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

RESUMO

A busca pelo entendimento dos parâmetros metabólicos relacionados com o aumento da massa corporal, adiposidade e gasto energético revela-se de vital importância para o entendimento das demandas metabólicas nos vertebrados. Neste estudo foi avaliado a resposta do Zebrafish, submetido ou não ao exercício físico, diante da oferta de uma dieta hipercalórica. Os animais foram divididos em 4 grupos, diferentes na oferta de dieta hipercalórica e na submissão do exercício físico. Os resultados revelaram, pela aplicação

da análise de variância, ANOVA one way, ($P \leq 0,05$), que para o grupo GMex, em relação a massa corporal, houve diferença estatística entre os animais na primeira semana ($0,30g \pm 0,10$), revelando uma diminuição de 30,83% para os da segunda semana; 33,59% para os da quarta semana e de 40,01% para os da sexta semana. Para o grupo GH a análise de variância revelou diferenças estatísticas, entre a massa corporal (gramas), da primeira semana ($0,32g \pm 0,07$), quando comparados com os dados obtidos da sexta até a décima terceira semana. Para grupo GHex, houve diferenças estatísticas da primeira semana ($0,27g \pm 0,08$) em relação as massas corporais da sexta até a décima terceira semana. Em relação ao comprimento (cm) dos animais, da nona ($3,29cm \pm 0,33$) até a décima terceira semana ($3,61cm \pm 0,33$). A dieta hipercalórica produziu aumento da massa corporal e quando associada ao exercício físico houve também aumento do comprimento dos animais.

Palavras-chave: Dieta, ganho de massa corporal, Zebrafish, exercício físico.

ABSTRACT

Zebrafish are emerging as an acceptable model for the study of obesity and its related disorders. The search for understanding the metabolic parameters related to the increase in body mass, adiposity and energy expenditure proves to be a vital importance for the understanding of the metabolic demands in vertebrates. In this study, we evaluated the Zebrafish submitted or not to physical exercise, when offered a hypercaloric diet. The animals have characteristics divided into 4 groups, different in the offer of a hypercaloric diet and physical exercise. The results revealed, by applying the analysis of variance, one-way ANOVA, ($P \leq 0.05$), that for the GMex group, in relation to body mass, there was a statistical difference between the animals in the first week ($0.30g \pm 0.10$), revealing a

decrease 30.83% for the second week; 33.59% for those in the fourth week and 40.01% for those in the sixth week. For the GH group, the analysis of variance revealed statistical differences between body mass (grams) from the first week ($0.32\text{g}\pm 0.07$), when compared with the data obtained from the sixth to the thirteenth week. For the GHex group, there were statistical differences from the first week ($0.27\text{g}\pm 0.08$) in relation to body masses from the sixth to the thirteenth week. and in relation to the length (cm) of the animals, from the ninth ($3.29\text{cm}\pm 0.33$) to the thirteenth week ($3.61\text{cm}\pm 0.33$). The hypercaloric diet produced an increase in body mass and when associated with physical exercise there was also an increase in the length of the animals. The proposed model was able to produce metabolic effects.

Keywords: Diet, body mass gain, Zebrafish, physical exercise.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o Zebrafish tem sido aceito e usado como um modelo multidisciplinar, sendo explorado nas áreas da genética, reprodução, fisiologia, envelhecimento e doença. São animais que possuem similaridade com os humanos e outros mamíferos, no que diz respeito aos órgãos digestivos, tecido adiposo, músculo esquelético, bem como, suas funções bioquímicas e cognição (MESHALKINA et al., 2017).

Visando a replicação e adoção de um modelo aceitável para o estudo da obesidade e os distúrbios relacionados a obesidade, os Zebrafish estão emergindo como um sistema similar com os seres humanos. Estes peixes revelaram de forma sistemática a preservação da regulação do apetite e insulina, do armazenamento de lipídios, e respondem bem à modificação da dieta (FAILLACI et al., 2018).

A busca pelo entendimento dos parâmetros metabólicos relacionados com o aumento da massa corporal, adiposidade e gasto energético revela-se de vital importância para o entendimento das demandas metabólicas nos vertebrados. Para tanto, os Zebrafish apontam evidências similares a mamíferos quanto os aspectos moleculares e morfológicos dos adipócitos na capacidade de armazenar lipídios com a função de disponibilizar nutrientes (FAILLACI et al., 2018). Estas características podem possibilitar a replicação e o aprofundamento de estudos referentes a mobilização energética em vertebrados, através do estabelecimento do aumento da massa corporal, da indução da obesidade e estabelecimento da hipertriglicemia e hepatoesteatose (OKA et al., 2010).

A compreensão da obesidade e suas afecções associado ao exercício físico é de suma importância. Em mamíferos, o exercício possibilita a melhora de inúmeros parâmetros metabólicos, tais como, resistência à insulina e à leptina; garantindo a diminuição da adiposidade associada a incidência de hepatopatias, cardiopatias, nefropatias e doenças neurodegenerativas (ZHANG e BANHIDY, 2017).

Visando a ampliação do entendimento da influência de dietas relacionadas com os diferentes aportes calóricos frente ao exercício físico o presente trabalho avaliou os efeitos promovidos pela oferta de uma dieta hipercalórica em Zebrafish, submetido ou não ao exercício físico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Quarenta e oito peixes da espécie *Danio rerio*, de ambos os sexos, adultos, com

aproximadamente 10-18 meses de idade, foram empregados no experimento. Foram submetidos a aclimatização e quarentena, ao longo de 15 dias, divididos em dois grupos, em um aquário com quatro divisões de 19 litros.

Durante os períodos de aclimatização e quarentena do experimento, os animais foram submetidos a um ciclo de 14 horas luz e 10 horas de escuro. Foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial em flocos (Alcon Basic®) (5% de gordura, 45% de proteína, 5% de material fibroso e 15% de material mineral) e criados em aquários com sistema de circulação fechada, à temperatura constante de 26 +/- 2°C controlada por um termostato (Atman®), aferida com auxílio de termômetro (Aquadene®). Os aquários tiveram sua água submetida a circulação, por meio de bomba submersa para oxigenação (HBO-300) e filtração empregando-se filtro externo (Alife 500). Cada um dos aquários foi submetido a troca semanal de 10% do seu volume da água total, bem como, limpeza dos aquários e filtros manualmente.

Ainda, ao longo deste período, a qualidade da água foi avaliada, sendo que: a cada dia, pH = 6,8-7,0 (pH Tropical, LabconTest), semanalmente amônia = 0 ppm (Amônia Tóxica, LabconTest) e mensalmente oxigênio dissolvido = 6-8 mg/L (Oxigênio dissolvido, LabconTest). Quando necessário, os parâmetros foram corrigidos utilizando o corretivo de pH Discus Buffer (Seachem) e o removedor de amônia Am Guard (Seachem).

Dietas e exercício físico

Mantendo as mesmas condições da quarentena e aclimatação os animais foram submetidos a uma modificação gradual na dieta, por duas semanas, recebendo artêmias congeladas (AquaSmart - 22% de lipídios, 16% de carboidrato e 44% de proteínas), até atingirem a seguinte quantidade, conforme tabela 1:

- Manutenção (GM): Dieta manutenção (5 mg cistos de artêmias/peixe/dia, uma vez ao dia), (n=24). Durante treze semanas;
- Dieta hipercalórica (GH): Dieta hipercalórica (60mg cistos de artêmias/peixe/dia, duas vezes ao dia), (n=24). Durante treze semanas.

Tabela 1 - Dados absolutos das diferentes dietas disponibilizadas aos *Danio rerio*, ao longo de treze semanas. Conforme protocolo proposto por Oka et al. (2010). Dieta manutenção (GM); Dieta manutenção + exercício físico (GMex); Dieta hipercalórica (GH); Dieta hipercalórica + exercício físico (GHex).

Dieta (Artêmias)	GM e GMex	GH GHex
Ingestão energética (Kcal/dia por animal)	20	240

Visando a indução do sobrepeso, adotou-se o protocolo de Oka et al. (2010). A partir de então, cada grupo foi novamente dividido em dois novos grupos n=12, visando a implementação dos protocolos de exercício físico. Os aquários foram mantidos nas mesmas condições expostas anteriormente. Sendo que, os grupos receberam correspondentemente dieta manutenção (GM e GMex) e hipercalórica (GH e GHex), submetidos ou não ao exercício físico. Estes grupos foram mantidos por treze semanas e daí submetidos a eutanásia por imersão em água gelada, 4 graus Celsius, por 15 minutos, conforme protocolo modificado de acordo com Gupta e Mullins (2010).

- GM: Dieta manutenção (n=12);
- GMex: Dieta manutenção + exercício físico (n=12);
- GH: Dieta hipercalórica (n=12);
- GHex: Dieta hipercalórica + exercício físico (n=12).

O protocolo modificado de exercício físico foi realizado com base no trabalho de Van Der Meulen et al. (2006), para os animais: GMex: Dieta manutenção + exercício físico (n=12) e GHex: Dieta hipercalórica + exercício físico (n=12). Estes animais foram submetidos a seis horas de exercício físico forçado, através de fluxo de água controlado na velocidade de cinco centímetros (cm) por segundo (5 cm/seg), durante treze semanas em aquário com um tubo para natação. Para diminuir o estresse e otimizar o protocolo imposto, todos os dias o fluxo de água foi aumentado gradualmente até atingir a velocidade esperada em cerca de 5 minutos, tabela 2.

Tabela 2 - Protocolo de adaptação do exercício físico dos animais ao longo das semanas para os animais GMex: dieta manutenção + exercício físico e GHex: dieta hipercalórica + exercício físico (n=12).

Dia/Semana	Tempo (h/dia)	Velocidade (cm/s)
1º Dia	1	5
2º Dia	2	5
3º Dia	3	5
4º Dia	4	5
5º Dia	5	5
6º Dia	6	5
2ª a 13ª semana	6	5

Ao longo de todo o período do experimento, cada um dos animais foi semanalmente submetido a pesagem, quando foram retirados e colocados em um béquer de vidro 100ml (Nalgon). Os pesos obtidos em gramas, em balança de precisão (Marte AD 1000), foram compilados e apresentados para cada um dos grupos na Figura 1.

Da mesma forma, todos os animais, de cada um dos grupos, ao longo das 13 semanas, foram mensurados em relação ao seu comprimento longitudinal, empregando

para tanto, a medida em centímetros, da distância obtida desde a cabeça até a cauda. Empregando para tanto paquímetro universal (Starret). Sendo os dados expressos na Figura 2.

Análise estatística

Os dados, massa corporal e comprimento, foram testados quanto a normalidade a partir da aplicação do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, apresentados como média±desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram testadas pela análise de variância one-way (ANOVA), seguida pelo pós-teste de múltipla comparação de Tukey's, considerando o valor $P \leq 0,05$, como estatisticamente significativo. A estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism (Prism versão 6.0c para Mac, GraphPad Software, La Jolla, CA).

RESULTADOS

GM - Grupo dieta de manutenção

Para os animais do GM (figura 1), foi observado que ao longo das 13 semanas, a massa corporal (gramas), manteve-se constante, sem a ocorrência de diferença estatística entre as semanas ($P \leq 0,05$). Os dados obtidos em relação ao comprimento longitudinal dos animais, em centímetros (cm), demonstraram também a manutenção do comprimento ao longo do período, figura 2. Sem a ocorrência de diferença estatística ($P \leq 0,05$).

GMex - Grupo dieta de manutenção e exercício físico

Conforme a figura 1, para o grupo GMex, em relação a massa corporal (gramas), foi observada diferença estatística entre os animais na primeira semana ($0,30g \pm 0,10$),

quando da aplicação ANOVA one way, pós-teste de múltipla comparação de Dunnett's ($P \leq 0,05$), revelando uma diminuição: de 30,83% para os da segunda semana; 33,59% para os da quarta semana e de 40,01% para os da sexta semana. Em relação ao comprimento longitudinal (cm) dos animais deste grupo, não foi observada diferença estatística ao longo do período avaliado, figura 2.

GH - Grupo dieta hipercalórica

Foi observado que a dieta hipercalórica promoveu aumento da massa corporal (gramas) nos animais, ao longo das semanas. A análise de variância revelou diferenças estatísticas, entre a massa corporal (gramas), da primeira semana ($0,32g \pm 0,07$), quando comparados com os dados obtidos da sexta até a décima terceira semana, conforme a figura 1. Revelando incremento relativo de: 45,68% para os animais da sexta semana, 53,27% para os da sétima semana, 40,08% para os da oitava semana, 47,59% para os da nona semana, 63,94% para os da décima semana, 49,80% para os da décima primeira semana, 43,13% para os da décima segunda semana e de 28,89% para os da décima terceira semana. Não foi observada diferença estatística em relação ao comprimento dos animais (cm), ao longo das semanas ($P \leq 0,05$), figura 2.

GHex – Grupo dieta hipercalórica e exercício físico

Foram observadas diferenças estatísticas das massas corporais (gramas) dos animais do grupo GHex, da primeira semana ($0,27g \pm 0,08$) em relação as massas corporais da sexta até a décima terceira semana. Isto, comprovado a partir da aplicação da análise de variância, ANOVA one way, pós-teste de múltipla comparação de Dunnet's ($P \leq 0,05$). Os valores sofreram um incremento de 45,75% para os animais da sexta semana, 65,66% para os animais da sétima semana, 85,98% para os animais da oitava semana, 96,88% para os animais da nona semana, 104,48% para os animais da décima semana, 94,59%

para os animais da décima primeira semana, 87,16% para os animais da décima segunda semana e de 79,69% para os animais da décima terceira semana, conforme figura 1. Foi observada diferença estatística em relação ao comprimento (cm) dos animais, da nona (3,29cm±0,33) até a décima terceira semana (3,61cm±0,33). A partir da aplicação do mesmo teste utilizado para avaliação da massa corporal ($P \leq 0,05$), figura 2.

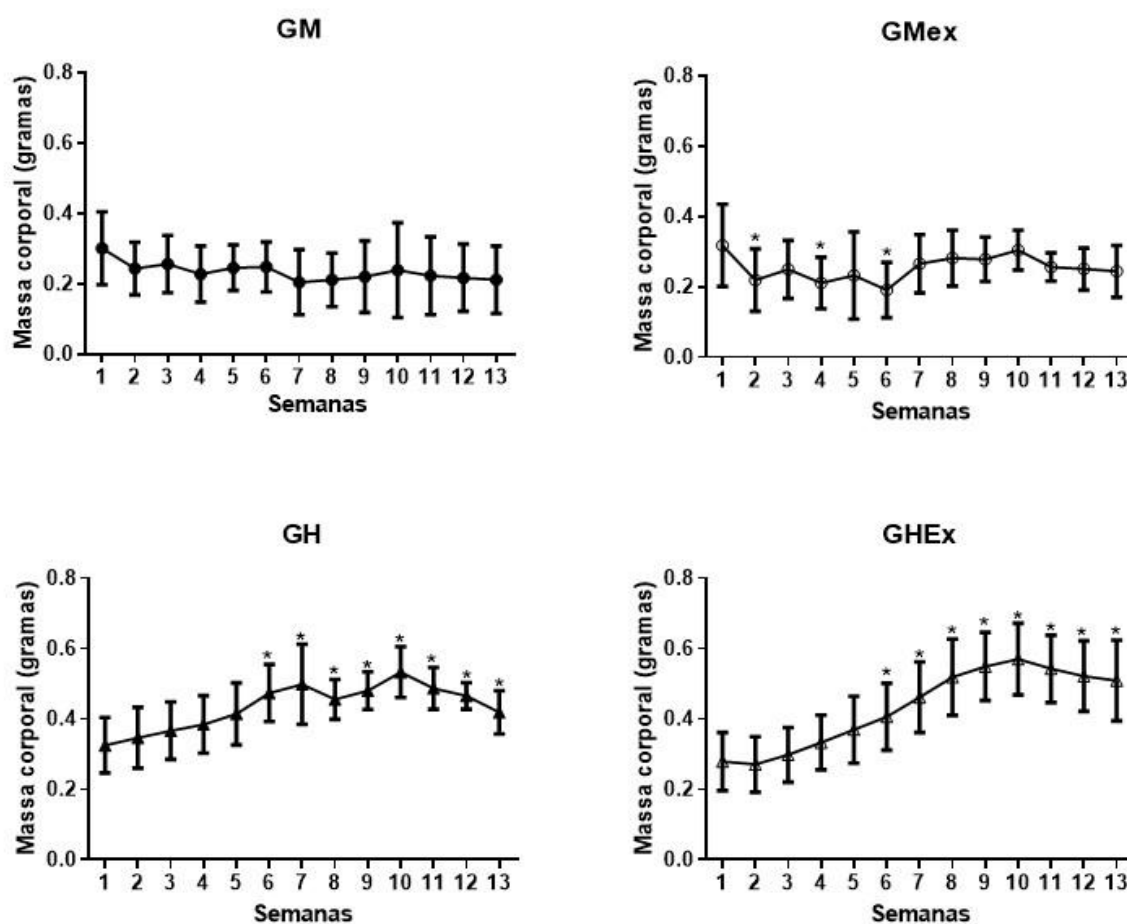


Figura 1. – Avaliação do ganho de peso corporal. Evolução da massa corporal, em gramas (g), de Zebrafish submetidos a dieta manutenção (GM); dieta manutenção e exercício físico (Gmex); dieta hipercalórica (GH) e dieta hipercalórica e exercício físico (GHEx), ao longo de 13 semanas. Todos os valores são média±desvio padrão, asteriscos (*) representam a ocorrência de diferença estatística em relação a primeira semana, ANOVA one way, pós-teste de Tukey's ($P \leq 0,05$).

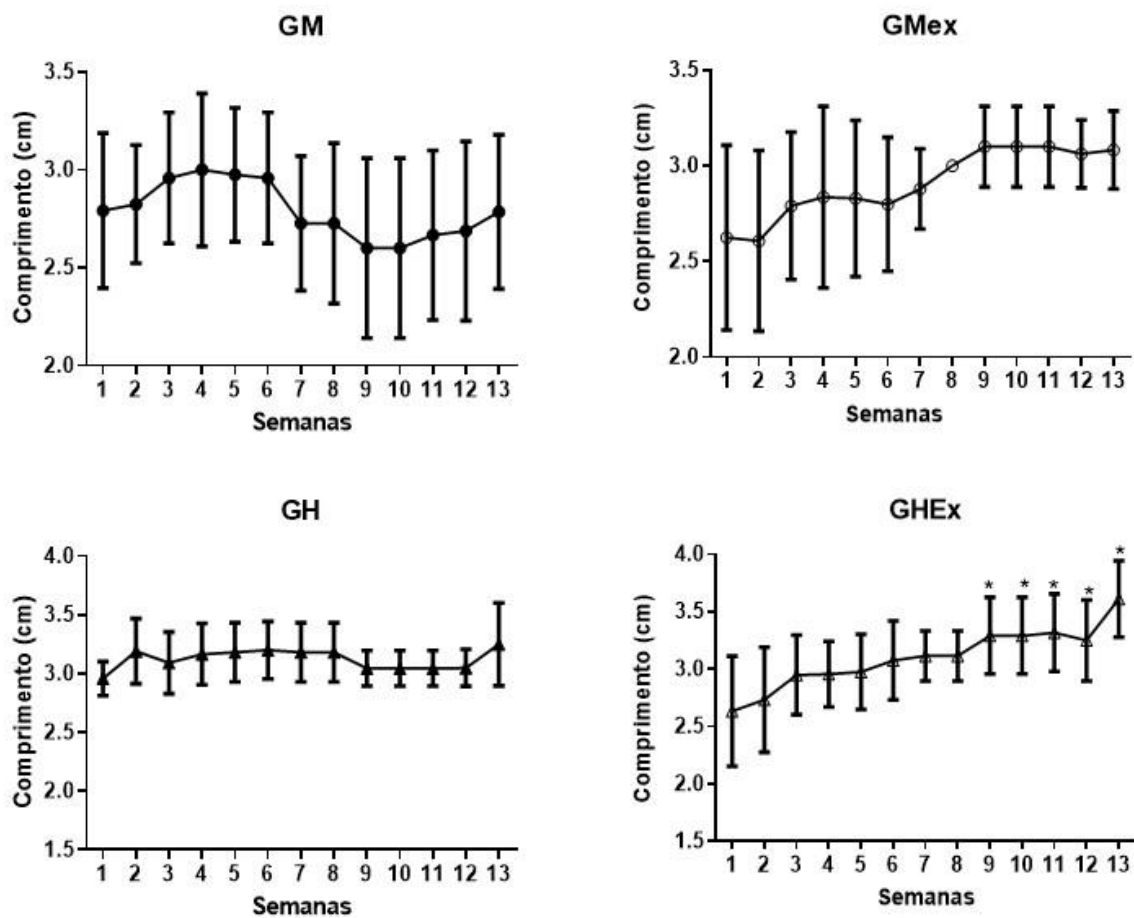


Figura 2. – Avaliação do comprimento corporal. Evolução do comprimento corporal, em centímetros (cm), de Zebrafish submetidos a dieta manutenção (GM); dieta manutenção e exercício físico (Gmex); dieta hipercalórica (GH) e dieta hipercalórica e exercício físico (GHEx), ao longo de 13 semanas. Todos os valores são média \pm desvio padrão, asteriscos (*) representam a ocorrência de diferença estatística em relação a primeira semana, ANOVA one way, pós-teste de Tukey's ($P \leq 0,05$).

DISCUSSÃO

Como medida adaptativa foi disponibilizado para todos os animais, nas primeiras duas semanas, uma dieta comercial, constituída: 5% de gordura, 45% de proteína, 5% de

material fibroso e 15% de material mineral. Após o período adaptativo, a dieta foi substituída por artêmias caracterizando-se por conter 22% de gordura, 16% de carboidratos e 44% de proteínas. A padronização da dieta teve como propósito a possibilidade de ser altamente calórica, capaz então de promover o aumento da massa corporal. Para tanto, foram utilizados os dados preconizados por Oka et al. (2010), quando fez uso de uma dieta hiperlipídica para peixes Zebrafish, induzindo obesidade. Coincidindo ainda com Meguro et al. (2015), quando avaliaram o efeito do alto teor de gordura na dieta. Isto é, dieta apresentando 20% de óleo de milho ou banha sobre o acúmulo de gordura corporal em Zebrafish. Ficou claro, nos animais avaliados, o estabelecimento e manutenção de um ganho de peso efetivo. No entanto, diante dos dados gerados não foi possível determinar que eles se tornaram obesos, visto que os resultados avaliados não tiveram a amplitude adequada para afirmar tal condição. Sobretudo a natureza da dieta foi um passo importante, pela adoção da oferta das artêmias, como base da dieta, revelando a possibilidade do incremento da massa corporal mesmo diante da imposição do exercício físico.

A composição da dieta demonstrou-se criticamente importante para apontar saúde ou patologia (STANLEY, 2012). Dieta combinada com alto teor de açúcar e gordura, ofertadas para camundongos, levou ao estabelecimento de hiperglicemia, hipercolesterolemia e níveis elevados de mediadores inflamatórios, bem como, a ocorrência de baixos níveis de células T (MAIOLI et al., 2016). Já Landgraf et al. (2017), aferiram a suplementação de gordura associando 5mg de artêmias com 30mg de pó de gema de ovo (59% de gordura, 32% de proteínas, 2% de carboidratos), em comparação com 60mg de artêmias (22% de gordura). E verificou que ambos grupos obtiveram sobrepeso. Apesar destas citações, foi possível inferir, que a natureza da dieta por si só, não teve a capacidade de promover ganho de peso, visto o observado nos grupos

manutenção (GM e GMex). Ademais, os resultados coletados não permitiram determinar a ocorrência ou não de alterações metabólicas, bem como, a ocorrência da obesidade.

Para Oka et al (2010), Zebrafish alimentados com 60mg de artêmias diariamente, atingiram a obesidade em oito semanas, revelando ainda aumento dos níveis de triglicerídeos no plasma sanguíneo e hepatoesteatose. Já Den Broeder et al. (2017) observou os efeitos nos Zebrafish quando submetidos a dieta rica em gorduras ou carboidratos, desenvolveram síndromes metabólicas, dentre estas a obesidade. Em outras espécies a dieta promoveu de forma ativa um balanço energético positivo capaz de promover desordens metabólicas decorrentes da obesidade, conforme verificado em humanos (FRANKS e MCCARTHY, 2016) e camundongos (LI et al., 2020). Diante dos resultados foi confirmado o efeito promovido pela disponibilidade de artêmias na massa corporal induzindo sobrepeso, em virtude da maior disponibilidade de energia intrínseca, proveniente de uma dieta rica em gordura ou carboidrato. De outra forma, não foi possível afirmar que houve a ocorrência da obesidade, bem como, outras doenças metabólicas.

No GMex, a imposição do exercício físico expressou de maneira significativa ($P \leq 0,05$), de forma que houve diminuição da massa corporal dos animais da segunda, quarta e sexta semanas. Devido a caracterização da dieta, que foi hiperlipidêmica, devido ao fato das artêmias apresentarem 22% de gordura, mas não serem hipercalóricas. Assim, sendo um fator determinante para o entendimento dos resultados obtidos. Visto que uma dieta cetogênica promoveu perda de peso em roedores que eram submetidos ao exercício de resistência, inclusive em animais obesos com dieta hiperlipídica e hipercalórica (MA et al., 2018).

Em relação aos Zebrafish dos grupos GH e GHex, foi positiva a ação determinada pela quantidade de artêmias disponibilizadas por meio da dieta. Caracterizando para

tanto, que estes animais tivessem um incremento de seus pesos a partir da sexta semana, revelando ainda há ocorrência de um período evolutivo, de aproximadamente cinco semanas. Este ganho de peso foi confirmado pela ocorrência de diferença estatística quando comparados os animais da primeira semana, em ambos os grupos ($P \leq 0,05$). Mesmo diante da imposição de exercício houve variação de massa e comprimento dos animais de forma significativa. Coincidindo assim com o observado por PALSTRA et al. (2010), em Zebrafish para modelo de treinamento de exercício, quando verificaram hipertrofia muscular adaptativa e ainda aumento da vascularização por angiogênese, resposta também evidenciada em mamíferos (SCHIAFFINO et al., 2013) e no salmão (DAVISON e HERBERT, 2012). Inclusive uma consequência do treinamento de resistência relatada foi aumento da massa muscular cardíaca (PELSTER et al., 2003).

Em relação ao crescimento longitudinal o grupo GHex apresentou, a partir da sexta semana, diferença estatística quando comparados com a primeira semana ($P \leq 0,05$). Esse resultado corrobora com estudo desenvolvido por Palstra et al., 2010 quando encontraram efeitos estimuladores do crescimento frente a um protocolo de exercício intenso. Fato também observado no nosso estudo, quando a maior oferta de alimento juntamente com o exercício promoveu maior crescimento longitudinal dos animais a partir da sexta semana do experimento. Em contraste, estudos anteriores indicaram que o crescimento estimulado pelo exercício ocorreu apenas no início do desenvolvimento (21-24 dias após a fertilização; (VAN DER MEULEN et al., 2006) e esteve ausente em peixes adultos (MCCLELLAND et al., 2006). Essa ambiguidade pode estar associada a dieta ofertada, e sua constituição, que é responsável por suprir a demanda metabólica e assim permitir o crescimento longitudinal de animais adultos. Mas, em tal processo não pode ser desconsiderado o papel ativo promovido pelo exercício, exercendo um estímulo

possivelmente eficiente no estabelecimento do crescimento, provavelmente devido ao alongamento das fibras musculares estriadas esqueléticas dos peixes em questão.

CONCLUSÃO

Nesse estudo, a dieta hipercalórica foi capaz de produzir aumento da massa corporal e quando associada ao exercício físico houve também aumento do comprimento dos animais. Portanto, no modelo de estudo proposto com Zebrafish, a dieta e o exercício físico foram capazes de provocar efeitos metabólicos que interferiram positivamente na estrutura dos espécimes.

REFERÊNCIAS

DAVISON, W.; HERBERT, N.A. Swimming-Enhanced Growth. In: PALSTRA, A.; PLANAS, J. (eds) **Swimming Physiology of Fish**. Springer, Berlin, Heidelberg, p.177–202, 2012.

DEN BROEDER, M.J.; MOESTER, M.J.B.; KAMSTRA, J.H.; CENIJN, P.H.; DAVIDOIU, V.; KAMMINGA, L.M.; ARIESE, F.; DE BOER, J.F.; LEGLER, J. Altered Adipogenesis in Zebrafish Larvae Following High Fat Diet and Chemical Exposure Is Visualised by Stimulated Raman Scattering Microscopy. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.4, p.894-929, 2017.

FAILLACI, F.; MILOSA, F.; CRITELLI, R.M.; TUROLA, E.; SCHEPIS, F.; VILLA, E. Obese zebrafish: A small fish for a major human health condition. *Animal Models and Experimental Medicine*, v.1, n.4, p.255-265, 2018.

FRANKS, P.W.; MCCARTHY, M.I. Exposing the exposures responsible for type 2 diabetes and obesity. **Science**, v.354, p.69–73, 2016.

GUPTA, T.; MULLINS, M. C. Dissection of Organs from the Adult Zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, v. 37, p. 1717-1727, 2010.

LANDGRAF, K.; SCHUSTER, S.; MEUSEL, A.; GARTEN, A.; RIEMER, T.; SCHLEINITZ, D.; KIESS, W.; KÖRNER, A. Short-term overfeeding of zebrafish with normal or high-fat diet as a model for the development of metabolically healthy versus unhealthy obesity. **BMC physiology**, v.17, n.1, p. 4-26, 2017.

LI, J.; WU, H.; LIU, Y.; YANG, L. High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. **Experimental Animals**, v.69, n.3, p326-335, 2020.

MA, S.; HUANG, Q.; YADA, K.; LIU, C.; SUZUKI, K. An 8-Week Ketogenic Low Carbohydrate, High Fat Diet Enhanced Exhaustive Exercise Capacity in Mice. **Nutrients**, v.10, n.6, p.673-698, 2018.

MAIOLI, T.U.; GONÇALVES, J.L.; MIRANDA, M.C.; MARTINS, V.D.; HORTA, L.S.; MOREIRA, T.G.; GODARD, A.L.; SANTIAGO, A.F.; FARIA, A.M. High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. **Inflammation Research**, v.65, n.2, p.169-178, 2016.

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, e0120142, 2015.

MESHALKINA, D.A.; KIZLYK, M.N.; KYSIL, E.V.; COLLIER, A.D.; ECHEVARRIA, D.J.; ABREU, M.S.; BARCELLOS, L.J.G.; SONG, C.; KALUEFF, A.V. Understanding zebrafish cognition. **Behavioural Processes**, v.141, p.229-241, 2017.

MCCLELLAND, G.B.; CRAIG, P.M.; DHEKNEY, K.; DIPARDO S. Temperature- and exercise-induced gene expression and metabolic enzyme changes in skeletal muscle of adult zebrafish (*Danio rerio*). **The Journal of Physiology**, v.577, p.739–751, 2006.

OKA, T.; NISHIMURA, Y.; ZANG, L.; HIRANO, M.; SHIMADA, Y.; WANG, Z.; UMEMOTO, N.; KUROYANAGI, J.; NISHIMURA, N.; TANAKA, T. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. **BMC physiology**, v.10, p.21-52, 2010.

PALSTRA, A.P.; TUDORACHE, C.; ROVIRA, M.; BRITTIJN, S.A.; BURGERHOUT, E.; VAN DEN THILLART, G.E.; SPAINK, H.P.; PLANAS, J.V. Establishing zebrafish as a novel exercise model: swimming economy, swimming-enhanced growth and muscle growth marker gene expression. **PLoS One**, v.5, n.12, e14483, 2010.

PELSTER, B.; SÄNGER, A.M.; SIEGELE, M.; SCHWERTE, T. Influence of swim training on cardiac activity, tissue capillarization, and mitochondrial density in muscle tissue of zebrafish larvae. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.285, n.2, p.339-47, 2003.

SCHIAFFINO, S.; DYAR, K.A.; CICILLOT, S.; BLAAUW, B.; SANDRI, M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **The FEBS Journal**, v.280, p.4294–4314, 2013.

STANLEY, W.C.; DABKOWSKI, E.R.; RIBEIRO, R.F.JR.; O'CONNELL, K.A. Dietary fat and heart failure: moving from lipotoxicity to lipoprotection. *Circulation Research*, v.110, n.5, p.764-76, 2012.

VAN DER MEULEN, T.; SCHIPPER, H.; VAN DEN BOOGAART, J.G.; HUISING, M.O.; KRANENBARG, S.; VAN LEEUWEN, J.L. Endurance exercise differentially stimulates heart and axial muscle development in zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v.291, p.1040-1048, 2006.

ZHANG, D.; BANHIDY, N.F. Effects of early physical exercise on later health. *Lancet*, v.389, p.801, 2017.

CAPITULO 2

RESPOSTA MORFOLÓGICA DO CORAÇÃO DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*) DECORRENTES DE DIETA HIPERCALÓRICA E EXERCÍCIO FÍSICO

RESUMO

A obesidade e a sua relação com as doenças cardiovasculares e o infarto do miocárdio representam os maiores problemas de saúde no mundo. O Zebrafish (*Danio rerio*) é um modelo de sistema majoritário para desenvolvimento cardiovascular e genético. Neste estudo buscou-se estudar e correlacionar alterações de cardiomiócitos, núcleos de cardiomiócitos e fibras colágenas cardíacas em Zebrafish submetidos a dieta hipercalórica e exercício físico. Os animais foram divididos em 4 grupos, possuindo divergências em

presença de dieta hipercalórica e exercício físico. Os dados encontrados revelaram que o grupo que não foi submetido a dietas hipercalórica e exercício físico obteve maior porcentagem de densidade das estruturas observadas. Densidade de cardiomiócitos ($54,71\% \pm 5,42$) no GM, ($44,31\% \pm 6,21$) no GMex, ($62,71\% \pm 7,4$) no GH e ($65,21\% \pm 2,29$) no GHex. Densidade de núcleos de cardiomiócitos: ($18,29\% \pm 5,28$) no GM, ($16,71\% \pm 1,25$) no GMex, ($16,14\% \pm 5,69$) no GH e ($14,14\% \pm 1,21$) no GHex. Densidade de fibras colágenas: ($7\% \pm 0,86$) no GM, ($4,89\% \pm 2,14$) no GMex, ($4\% \pm 1,73$) no GH e ($3,33\% \pm 2,23$) no GHex. A partir das comparações realizadas no método de análise de estatística utilizado, houve diferença significativa na comparação de porcentagem de núcleos de cardiomiócitos entre o GM e o GHex. Conclui-se que a estrutura cardíaca sofreu hipertrofia das células musculares e ainda a modificação da quantidade de tecido conjuntivo presente no tecido cardíaco, demonstrando assim a efetividade do modelo utilizado e protocolo imposto.

Palavras-chave: Cardiomiócitos, Zebrafish, coração, dieta, exercício físico.

ABSTRACT

Obesity and its relationship with cardiovascular disease and myocardial infarction is the biggest health problem in the world. Zebrafish (*Danio rerio*) is a major system model for cardiovascular and genetic development. In this study, we aimed to study and correlate dietary changes in cardiomyocyte, cardiomyocyte nuclei and cardiac collagen fibers in Zebrafish submitted to hypercaloric diet and physical exercise. The animals were divided into 4 groups, submitted to hypercaloric diet and physical exercise. The findings revealed that the group that did not been submitted to hyperlipidic diet and physical exercise showed a higher density of observed data. Cardiomyocyte density ($54,71\% \pm 5,42$) in GM, ($44,31\% \pm 6,21$) in GMex, ($62,71\% \pm 7,4$) in GH and ($65,21\% \pm 2,29$) in GHex.

Density of cardiomyocyte nuclei: (18,29% ± 5,28) in GM, (16,71% ± 1,25) in GMex, (16,14% ± 5,69) in GH and (14,14% ± 1,21) in GHex. Density of collagen fibers: (7% ± 0,86) in GM, (4,89% ± 2,14) in GMex, (4% ± 1,73) in GH and (3,33% ± 2,23) in GHex. From comparisons performed by the analysis method used, it was possible to test that there was a significant difference in the comparison of Cardiomyocyte nuclei between GM and GHex. It is concluded that the cardiac structure suffered hypertrophy of muscle cells and also the modification of the amount of connective tissue present in the cardiac tissue, demonstrating the effectiveness of the model used and protocol imposed.

Keywords: Cardiomyocytes, Zebrafish, heart, diet, physical exercise.

INTRODUÇÃO

A obesidade é evidenciada como aumento excessivo de gordura subcutânea e visceral tendo como uma das causas para a instauração da doença uma dieta desbalanceada juntamente de uma ingestão excessiva de calorias e diminuição da energia gasta. Nas circunstâncias de tais fatores também são associadas outras doenças e anormalidades metabólicas, que inquerem alta morbidade e mortalidade, incluindo: hiperinsulinemia, resistência à insulina, diabetes tipo 2, dislipidemia, doenças vesiculares e certos tipos de câncer. O índice elevado de massa corporal está também associado aos prejuízos da estrutura e função do coração (REN et al, 2021). As doenças cardiovasculares e o infarto do miocárdio representam o maior problema de saúde no mundo e a sua relação com a epidemia de obesidade e os hábitos não saudáveis sugerem que a prevalência só aumentará com o passar do tempo (BRAUNWALD, 2015).

A prática disciplinada de exercício físico protege o coração de doenças, de maneira semelhante quanto ao uso de medicamentos (NACI e IOANNIDIS, 2013) ainda que os

mecanismos que garantem esses benefícios são incompreendidos na sua totalidade. Há uma melhora da função cardíaca e aumento da massa miocárdica com a prática de exercícios que é atribuído ao aumento do tamanho dos cardiomiócitos (LERCHENMÜLLER e ROSENZWEIG, 2014).

O Zebrafish (*Danio rerio*) é um modelo de sistema majoritário para desenvolvimento cardiovascular e genético. Apresenta um coração prototípico de vertebrados com apenas um átrio e um ventrículo (HU et al., 2000), ambos constituídos de cardiomiócitos e tecido conjuntivo, auxiliando na distensão do músculo cardíaco, transmissão de força durante a contração, relaxamento e resistência a deformações patológicas. Na regeneração do coração do Zebrafish, quando o tecido ventricular é perdido, os reguladores significativos para o processo regenerativo são ativados nos primeiros dias pós lesão e parte do tecido é regenerado por cardiomiócitos majoritariamente pré-existentes (NUNES et al., 2022).

Outro componente importante é o colágeno intersticial, um dos componentes do miocárdio, desempenhando a função de apoiar os miócitos contornando-os e os mantendo alinhados. Os principais tipos de colágeno presentes no miocárdio são os de Tipo I, III e V, sendo o de Tipo I o mais comum. (DEBESSA et al., 2001).

Neste estudo buscou-se quantificar estruturas presentes no coração do Zebrafish, a fim de observar quais as modificações estruturais decorrentes da disponibilidade de uma dieta hipercalórica e da imposição de exercício físico. Foram avaliadas as densidades dos cardiomiócitos, dos núcleos dos cardiomiócitos e ainda das fibras de colágeno dos diferentes grupos avaliados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Quarenta e oito peixes da espécie *Danio rerio*, de ambos os sexos, adultos, com aproximadamente 10-18 meses de idade, foram empregados no experimento. Inicialmente foram submetidos a aclimatização e quarentena, ao longo de 15 dias, divididos em dois grupos, em um aquário com quatro divisões de 19 litros.

Durante os períodos de aclimatização e quarentena do experimento, os animais foram submetidos a um ciclo de 14 horas luz e 10 horas de escuro. Foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial em flocos (Alcon Basic®) (5% de gordura, 45% de proteína, 5% de material fibroso e 15% de material mineral) e criados em aquários com sistema de circulação fechada, à temperatura constante de 26 +/- 2°C controlada por um termostato (Atman®), aferida com auxílio de termômetro (Aquadene®). Os aquários tiveram sua água submetida a circulação, por meio de bomba submersa para oxigenação (HBO-300) e filtração empregando-se filtro externo (Alife 500). Cada um dos aquários foi submetido a troca semanal de 10% do seu volume da água total, bem como, limpeza dos aquários e filtros manualmente.

Ainda, ao longo deste período, a qualidade da água foi avaliada, sendo que: a cada dia, pH = 6,8-7,0 (pH Tropical, LabconTest), semanalmente amônia = 0 ppm (Amônia Tóxica, LabconTest) e mensalmente oxigênio dissolvido = 6-8 mg/L (Oxigênio dissolvido, LabconTest). Quando necessário, os parâmetros foram corrigidos utilizando o corretivo de pH Discus Buffer (Seachem) e o removedor de amônia Am Guard (Seachem).

Administração das dietas e exercício físico

Mantendo as mesmas condições da aclimação e quarentena os animais foram submetidos a uma modificação gradual da sua dieta, por duas semanas, recebendo artêmias congeladas (AquaSmart - 22% de lipídios, 16% de carboidrato e 44% de proteínas), até atingirem a quantidade representada na tabela 1, conforme proposto por Oka et al. (2010).

- a) Dieta Manutenção (GM): 5 mg cistos de artêmias/peixe/dia, uma vez ao dia (n=24). Durante treze semanas;
- b) Dieta Hipercalórica (GH): 60mg cistos de artêmias/peixe/dia, duas vezes ao dia (n=24). Durante treze semanas;

Tabela 1 - Dados absolutos das diferentes dietas disponibilizadas aos *Danio rerio*, ao longo de treze semanas. Conforme protocolo proposto por Oka et al. (2010). Dieta manutenção (GM); Dieta manutenção + exercício físico (GMex); Dieta hipercalórica (GH); Dieta hipercalórica + exercício físico (GHex).

Dieta (Artêmias)	GM e GMex	GH e GHex
Ingestão energética (Kcal/dia por animal)	20	240

Conforme protocolo proposto por Oka et al. (2010), após oito semanas cada grupo foi dividido em dois novos grupos para o estabelecimento do protocolo de imposição de exercício. Foram determinados quatro grupos, sendo compostos de 12 animais cada, para tanto, os aquários foram mantidos nas mesmas condições expostas anteriormente. Sendo que, os grupos receberam dieta de manutenção/hipercalórica, conforme exposto abaixo, porém submetidos ou não ao exercício físico. Estes grupos, foram mantidos por treze

semanas, em seguida foram eutanasiados por imersão em água gelada, 4 graus Celsius, por 15 minutos, conforme protocolo proposto por Gupta e Mullins (2010).

- GM: Dieta manutenção (n=12);
- GMex: Dieta manutenção + exercício físico (n=12);
- GH: Dieta hipercalórica (n=12);
- GHex: Dieta hipercalórica + exercício físico (n=12).

O protocolo de exercício físico foi realizado com base no trabalho de Van Der Meulen *et al.* (2006), para os animais: GMex: Dieta manutenção + exercício físico (n=12) e GHex: Dieta hipercalórica + exercício físico (n=12). Estes animais foram submetidos a seis horas de exercício físico forçado, estimulado através do fluxo de água controlado na velocidade de cinco centímetros por segundo (5 cm/seg), pelo total de treze semanas em aquário com um tubo para natação. Para diminuir o estresse e otimizar o protocolo imposto, todos os dias, o fluxo de água foi aumentado gradualmente até atingir a velocidade esperada em cerca de 5 minutos (Tabela 2).

Tabela 2 - Protocolo de adaptação do exercício físico dos animais ao longo das semanas para os animais GMex: dieta manutenção + exercício físico e GHex: dieta hipercalórica + exercício físico (n=12).

Dia/Semana	Tempo (h/dia)	Velocidade (cm/s)
1º Dia	1	5
2º Dia	2	5
3º Dia	3	5
4º Dia	4	5
5º Dia	5	5
6º Dia	6	5
2ª a 13ª semana	6	5

Ao longo de todo o período do experimento, cada um dos animais foi semanalmente submetido a pesagem, quando foram retirados e colocados em um béquer de vidro 100ml (Nalgon). Os pesos obtidos em gramas, em balança de precisão (Marte AD 1000).

Da mesma forma, todos os animais, de cada um dos grupos, ao longo das 13 semanas, foram mensurados em relação ao seu comprimento longitudinal, empregando para tanto, a medida em centímetros, da distância obtida desde a cabeça até a cauda. Empregando para tanto paquímetro universal (Starret).

Avaliação histomorfométrica

Os peixes inteiros, foram fixados em 10% de formalina em solução aquosa por 24 horas, processados utilizando as técnicas histológicas convencionais e incluídos em blocos de paraplast (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Em seguida, cada bloco foi cortado longitudinalmente, com espessura de 4 μ m, com auxílio do micrótomo manual (Leixa RM 2125RT). As lâminas foram coradas de acordo com as técnicas histológicas de Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Masson.

As imagens digitais foram obtidas por meio de um microscópio óptico (BX51 Olympus®) juntamente com o programa de captura e análise de imagens (ProgRes® Capture Pro 2.5). Em campos aleatórios de cada fragmento, usando como padrão áreas com as fibras cardíacas longitudinais, foi quantificado os cardiomiócitos e o colágeno. Foram desprezadas áreas sem tecido, com hemácias ou células satélites.

Para quantificar a área ocupada pelos cardiomiócitos foi utilizado o software de análise STEPanizer® (<http://stepanizer.com/>), utilizando 100 pontos seguindo o princípio de Delesse em que $V_v = A = P_p/P_t$ %, onde P_p são os pontos que incidem sobre a estrutura

e Pt o número de pontos totais, deste modo foi obtido no final a área média de cada variável avaliada.

Foi quantificado a densidade de núcleos de cardiomiócitos, densidade de miocárdio e a densidade de fibras de colágeno. Ao contar o número de pontos correspondentes aos núcleos e aos cardiomiócitos dispostos ao longo do átrio e ventrículo, sendo que a diferença da área média de miocárdio pela área média de tecido conjuntivo equivale à área média de cardiomiócitos (N° cardiomiócitos = área média do miocárdio – área média do tecido conjuntivo).

Análise estatística

Os dados, massa corporal e comprimento, foram testados quanto a normalidade a partir da aplicação do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, apresentados como média±desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram testadas pela análise de variância one-way (ANOVA), seguida pelo pós-teste de múltipla comparação de Dunnett's Holm-Sidak, considerando o valor $P \leq 0,05$, como estatisticamente significativo. A estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism (Prism versão 6.0c para Mac, GraphPad Software, La Jolla, CA).

Todos os dados, para densidade de núcleos de cardiomiócitos, densidade de miocárdio e a densidade de fibras de colágeno, foram submetidos inicialmente à estatística descritiva. Para avaliar a normalidade dos dados foi aplicado o teste de Kolmogorov–Smirnov (Tabela 3). A massa corporal e o comprimento, foram avaliados pela análise de variância one-way (ANOVA), considerando o valor $P \leq 0,05$, como estatisticamente significativo (Tabela 3). A densidade de núcleos de cardiomiócitos, densidade de miocárdio e a densidade de fibras de colágeno foi avaliada por meio de uma

análise de variância one-way (ANOVA), seguida pelo pós-teste de múltipla comparação de Tukey's. Os dados foram apresentados como média±erro padrão da média. Considerando significativo o valor ($P\leq 0,05$). A estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism (Prism versão 6.0c para Mac, GraphPad Software, La Jolla, CA).

RESULTADOS

Ganho de massa e comprimento na imposição ou não ao exercício

GM - Grupo dieta de manutenção

Para os animais do GM foi observado que ao longo das 13 semanas, a massa corporal (gramas), manteve-se constante, sem a ocorrência de diferença estatística entre as semanas ($P\leq 0,05$). Os dados obtidos em relação ao comprimento longitudinal dos animais, em centímetros (cm), demonstraram também a manutenção do comprimento ao longo do período. Sem a ocorrência de diferença estatística ($P\leq 0,05$).

GMex - Grupo dieta de manutenção e exercício físico

Para o grupo GMex, em relação a massa corporal (gramas), foi observada diferença estatística entre os animais na primeira semana ($0,30g \pm 0,10$), quando da aplicação ANOVA one way, pós-teste de múltipla comparação de Dunnet's ($P\leq 0,05$), revelando uma diminuição: de 30,83% para os da segunda semana; 33,59% para os da quarta semana e de 40,01% para os da sexta semana. Em relação ao comprimento longitudinal (cm) dos animais deste grupo, não foi observada diferença estatística ao longo do período avaliado.

GH - Grupo dieta hipercalórica

Foi observado que a dieta hipercalórica promoveu aumento da massa corporal (gramas) nos animais, ao longo das semanas. A análise de variância revelou diferenças estatísticas, entre a massa corporal (gramas), da primeira semana ($0,32g \pm 0,07$), quando comparados com os dados obtidos da sexta até a décima terceira semana. Revelando incremento relativo de: 45,68% para os animais da sexta semana, 53,27% para os da sétima semana, 40,08% para os da oitava semana, 47,59% para os da nona semana, 63,94% para os da décima semana, 49,80% para os da décima primeira semana, 43,13% para os da décima segunda semana e de 28,89% para os da décima terceira semana. Não foi observada diferença estatística em relação ao comprimento dos animais (cm), ao longo das semanas ($P \leq 0,05$).

GHex – Grupo dieta hipercalórica e exercício físico

Foram observadas diferenças estatísticas das massas corporais (gramas) dos animais do grupo GHex, da primeira semana ($0,27g \pm 0,08$) em relação as massas corporais da sexta até a décima terceira semana. Isto, comprovado a partir da aplicação da análise de variância, ANOVA one way, pós-teste de múltipla comparação de Dunnet's ($P \leq 0,05$). Os valores sofreram um incremento de 45,75% para os animais da sexta semana, 65,66% para os animais da sétima semana, 85,98% para os animais da oitava semana, 96,88% para os animais da nona semana, 104,48% para os animais da décima semana, 94,59% para os animais da décima primeira semana, 87,16% para os animais da décima segunda semana e de 79,69% para os animais da décima terceira semana. Foi observada diferença estatística em relação ao comprimento (cm) dos animais, da nona ($3,29cm \pm 0,33$) até a décima terceira semana ($3,61cm \pm 0,33$). A partir da aplicação do mesmo teste utilizado para avaliação da massa corporal ($P \leq 0,05$).

Avaliação histomorfométrica

O tecido cardíaco dos Zebrafish, dos quatro grupos, se apresentou sendo composto por cardiomiócitos, com alto grau de anastomose entre as fibras e dispostas ao longo de espaços trabeculares formados pelo tecido conjuntivo presente.

Para a quantificação da densidade volumétrica do tecido cardíaco (Tabela 3) foi avaliado a relação existente entre a densidade volumétrica dos cardiomiócitos, do número de núcleos destes cardiomiócitos e de fibras de colágeno presentes no tecido cardíaco.

Foi possível verificar que a densidade volumétrica dos cardiomiócitos ($V_v\%$) sofreu um incremento, sinalizando uma influência, da dieta e ainda do exercício físico, conforme exposto na Tabela 3. Com diferença estatística entre estes $P \leq 0,05$.

No tocante a densidade volumétrica dos núcleos dos cardiomiócitos ($V_v\%$), a Tabela 3, demonstrou que os valores não apresentaram diferença estatística $P \leq 0,05$ em todos os grupos avaliados.

As fibras de colágeno, estiveram dispostas em formato de feixes, de forma desorganizada ao longo dos espaços trabeculares do tecido cardíaco. apresentando no seu interior hemácias. Demonstraram diminuição significativa ($P \leq 0,05$) na deposição das fibras de colágeno no tecido cardíaco nos animais que receberam dieta hipercalórica e foram submetidos ao exercício físico, conforme a tabela 3.

Tabela 3. Média (%) e desvio padrão das densidades volumétricas (Vv) dos cardiomiócitos, núcleos dos cardiomiócitos e fibras de colágeno do tecido cardíaco de Zebrafish. Submetidos a GM: dieta manutenção, GMex: dieta manutenção + exercício físico, GH: dieta hipercalórica, GHex: dieta hipercalórica e exercício físico ao longo de 13 semanas. ANOVA one-way, com aplicação do pós-teste de múltipla comparação de Tukey's, $P \leq 0,05$. Letras iguais, entre as linhas da mesma coluna, indicam diferença estatística.

DENSIDADE VOLUMÉTRICA (Vv)			
GRUPOS	CARDIOMIÓCITOS	NÚCLEO DOS CARDIOMIÓCITOS	FIBRAS DE COLÁGENO
GM	54,71% ± 5,42 ^{AB}	18,29% ± 5,28	7% ± 0,86 ^{AB}
GMex	57,5% ± 5,49 ^{CD}	16,71% ± 1,25	4,89% ± 2,14
GH	62,71% ± 7,45 ^{AC}	16,14% ± 5,69	4% ± 1,73 ^A
GHex	65,21% ± 2,29 ^{BD}	14,14% ± 1,21	3,33% ± 2,23 ^B

DISCUSSÃO

O desempenho dos animais frente a dieta hipercalórica e exercício físico trouxeram como resultados, para os grupos GH e GHex, aumento significativo do ganho de massa corporal determinada pela quantidade de artêmias. Caracterizando que estes animais apresentaram incremento de seus pesos a partir da sexta semana. Este ganho de peso foi confirmado pela ocorrência de diferença estatística quando comparados os animais da primeira semana, em ambos os grupos ($P \leq 0,05$). Em um estudo com Zebrafish alimentados com dieta hiperlipídica, os animais atingiram a obesidade em oito semanas, e tiveram aumento dos níveis de triglicerídeos no plasma sanguíneo e hepatoesteatose

(OKA et al., 2010). Mesmo diante da imposição de exercício, houve variação de massa e comprimento dos animais, de forma significativa.

Em relação ao crescimento longitudinal, foi observado no grupo GHex que diferença estatística quando comparados com a primeira semana ($P \leq 0,05$). Esse resultado corrobora com um estudo que encontraram efeitos estimuladores do crescimento frente a um protocolo de exercício intenso em Zebrafish (PALSTRA et al., 2010).

Para os animais do grupo GMex, houve diminuição da massa corporal da segunda, quarta e sexta semanas em comparação com a primeira semana, devido ao fato das artêmias serem um alimento hiperlipídico mas a oferta não ser hipercalórica. Entendimento que está de acordo com um trabalho que promoveu perda de peso em roedores com uma dieta cetogênica quando também submetidos ao exercício de resistência (MA et al., 2018).

Foi evidenciado em Zebrafish uma grande capacidade de recuperação do tecido cardíaco no decorrer da vida (GUPTA e POSS, 2012). A regeneração do coração do Zebrafish foi desencadeada por cardiomiócitos pré-existentes, com grande capacidade regenerativa (LAI et al., 2017). Apesar das informações acima, a possibilidade regenerativa não foi previamente um objeto de investigação deste estudo. Assim, não foi possível afirmar que as diferentes dietas, ou mesmo, o exercício físico poderia ter esta amplitude frente ao tecido cardíaco. Em um estudo foi evidenciado que a densidade dos cardiomiócitos no tecido atrial e ventricular não difere entre machos e fêmeas, sugerindo que esse tecido não sofre alterações pelos hormônios gonadais (OKIYAMA et al., 2016).

Fatores distintos, especialmente em relação a natureza da dieta, revelaram a capacidade reguladora e inibidora do surgimento de novas células cardíacas no coração. Dentre estas, dados apontaram que as desordens causadas pela dieta com alto teor de

gorduras e calorias foi capaz de promover lesões nos cardiomiócitos ao desencadear apoptose (SLETTEN et al., 2018). Ainda em vertebrados, foi observado que uma dieta hiperlipídica em ratos adolescentes levou a uma supressão fisiológica da maturação do coração (HYNYNEN et al., 2020). Considerando assim que a dieta hiperlipídica respondeu pela capacidade ativa de promover a autofagia no coração de camundongos (TONG et al., 2019). Apesar dos relatos, nos animais investigados, a metodologia empregada permitiu observarmos que a densidade volumétrica dos cardiomiócitos se alterou diante da oferta de uma dieta hipercalórica, sofrendo um incremento. Revelando-se de forma distinta ao observado na literatura consultada, mesmo diante das diferentes metodologias empregadas. Pois, considera-se possível que a dieta hiperlipídica foi responsável por promover aumento nas dimensões dos cardiomiócitos.

Para os animais que foram submetidos ao exercício físico, mesmo diante da distinção entre as dietas (GHex e GMex), houve um incremento da densidade volumétrica dos cardiomiócitos. Garantindo assim que o exercício físico poderia ser considerado um mecanismo de proteção do coração, que promoveu uma melhora da função e aumento da massa miocárdica e do tamanho dos cardiomiócitos (NACI e IOANNIDIS, 2013; LERCHENMÜLLER e ROSENZWEIG, 2014). Com este entendimento, foi também observado em ratos que a dieta hiperlipídica respondeu pelo estabelecimento da hipertrofia do tecido cardíaco (SCIARRETTA et al., 2012). Outro estudo, com exercício físico regular de corrida demonstrou em ratos que houve estimulação no aumento da formação de novos cardiomiócitos, isso reforçou o conceito e o entendimento de que o exercício poderia ativar a capacidade endógena do coração de mamífero adulto, promovendo uma regeneração diante da ocorrência de lesões (VUJIC et al., 2018). Em Zebrafish, o exercício estimulou a proliferação dos cardiomiócitos, sem a ocorrência de

hipertrofia, e essa resposta foi mantida mesmo quando houve lesão cardíaca (ROVIRA et al., 2018).

Diante dos achados, foi possível sugerir que houve sim uma hipertrofia do tecido cardíaco, como proposto por Sciarretta et al. (2012). Isto em decorrência aos valores obtidos para a densidade volumétrica dos cardiomiócitos. Fato que é contrário as informações de Rovira et al. (2018), que mesmo diante da imposição do exercício físico não evidenciaram a hipertrofia dos cardiomiócitos. O entendimento da não alteração dos valores obtidos para a densidade volumétrica do número de núcleos dos cardiomiócitos, frente a dietas hiperlipídicas e ainda em relação ao exercício físico levou a crer que apesar do aumento das dimensões dos cardiomiócitos não houve o surgimento de novas células, diferentemente do observado por Vujic et al. (2018).

Foi reportado em Zebrafish que o exercício físico não levou ao aumento das fibras de colágeno, mesmo quando houve lesão cardíaca (ROVIRA et al., 2018). De outra forma, em um estudo que analisou a recuperação de ferida provocada por cirurgia no tecido cardíaco em Zebrafish evidenciou maior densidade de colágeno na regeneração, que pode atuar como um obstáculo na reposição de tecido cardíaco funcional (BISE et al., 2020). Em outro estudo, a elevação da concentração de ácidos graxos circulantes contribuiu sinergicamente para disfunção endotelial, desencadeando o acúmulo de tecido fibroso (GHOSH et al., 2017). Em ratos obesos, a dieta hiperlipídica causou disfunção cardíaca diastólica e sistólica, anormalidades morfológicas decorrente do acúmulo de lipídios e fibrose intersticial (XU et al., 2022). Ao diferenciar a presença de tecido conjuntivo e colágeno no coração de machos e fêmeas no Zebrafish, um estudo evidenciou maior concentração no ventrículo de machos, o que leva a associação de maior prevalência de doença cardíaca em homens (OKIYAMA et al., 2016). Assim sendo, os resultados obtidos a partir da avaliação da densidade do colágeno no tecido cardíaco

permitiu destacar que o aporte de calorias em excesso foi capaz de promover uma diminuição significativa da deposição deste tecido no coração de Zebrafish, quando comparados com animais submetidos a uma dieta manutenção.

CONCLUSÃO

Frente a disponibilidade de uma dieta hipercalórica e da imposição de exercício físico, foi possível verificar que a estrutura cardíaca sofreu interferência, modificando-se. Sinalizando a ocorrência de hipertrofia das células musculares e ainda a modificação da quantidade de tecido conjuntivo presente no tecido cardíaco, diminuindo sua deposição frente a dieta hipercalórica. Demonstrando assim a efetividade do modelo utilizado e protocolo imposto.

REFERÊNCIAS

BISE, T.; SALLIN, P.; PFEFFERLI, C.; JAŻWIŃSKA, A. Multiple cryoinjuries modulate the efficiency of zebrafish heart regeneration. **Scientific Reports**, v.10, n.1, p.11551-115578, 2020.

BRAUNWALD, E. The war against heart failure: the Lancet lecture. **Lancet**, v.385, n.9970, p.812-824, 2015.

DEBESSA, C.R.G.; MAIFRINO, L.B.M.; SOUZA, R.R. Age related changes of the collagen network of the human heart. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.122, n.10, p.1049-1058, 2001.

GHOSH, A.; GAO, L.; THAKUR, A.; SIU, P.M.; LAI, C.W.K. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. **Journal of Biomedical Science**, v.24, n.1, p.50-102, 2017.

GUPTA, T.; MULLINS, M. C. Dissection of Organs from the Adult Zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, v. 37, p. 1717-1727, 2010.

GUPTA, V.; POSS, K. D. Clonally dominant cardiomyocytes direct heart morphogenesis. **Nature**, v. 484, n. 7395, p. 479-484, 2012.

HU, N.; SEDMERA, D.; YOST, H. J.; CLARK, E. B. Structure and Function of the Developing Zebrafish Heart. **The Anatomical Record**, v. 260, n. 2, p. 148–157, 2000.

HYNYNEN, H.; MUTIKAINEN, M.; NAUMENKO, N.; SHAKIRZYANOVA, A.; TUOMAINEN, T.; TAVI P. Short high-fat diet interferes with the physiological maturation of the late adolescent mouse heart. **Physiological Reports**, v8, n.13. e.14474, 2020.

LAI, S.L.; MARÍN-JUEZ, R.; MOURA, P.L.; KUENNE, C.; LAI, J.K.H.; TSEDEKE, A.T.; GUENTHER, S.; LOOSO, M.; STAINIER, D.Y. Reciprocal analyses in zebrafish and medaka reveal that harnessing the immune response promotes cardiac regeneration. **Elife**, v.20, n.6, e25605, 2017.

LERCHENMÜLLER, C.; ROSENZWEIG, A. Mechanisms of exercise-induced cardiac growth. **Drug Discovery Today**, v.19, n.7, p.1003-9, 2014.

MA, S.; HUANG, Q.; YADA, K.; LIU, C.; SUZUKI, K. An 8-Week Ketogenic Low Carbohydrate, High Fat Diet Enhanced Exhaustive Exercise Capacity in Mice. **Nutrients**, v.10, n.6, p.673-698, 2018.

NACI, H.; IOANNIDIS, J.P. Comparative effectiveness of exercise and drug interventions on mortality outcomes: metaepidemiological study. **BMJ**, v.49, n.21, p.1414-22., 2013.

NUNES, L.S.; DOMINGUES, W.B.; KREMER, F.S.; PINHAL, D.; CAMPOS, V.F. Reconstruction of regulatory network predicts transcription factors driving the dynamics of zebrafish heart regeneration. **Gene**, v.819, 146242, 2022.

OKA, T.; NISHIMURA, Y.; ZANG, L.; HIRANO, M.; SHIMADA, Y.; WANG, Z.; UMEMOTO N.; KUROYANAGI, J.; NISHIMURA N.; TANAKA T. Diet-induced Obesity in Zebrafish Shares Common Pathophysiological Pathways with Mammalian Obesity. **BMC Physiology**, v. 10, p.21-51, 2010.

OKIYAMA, F. T. M. ; LEONARDO, A.S. ; NOGUEIRA, K. ; SANTOS, A. C. ; VIANNA, A. R. C. B. ; LIMA, E. M. M. . Heart Zebrafish (Daniorerio) - quantification of tissue constituents. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 10, p. 148-153, 2016.

PALSTRA, A.P.; TUDORACHE, C.; ROVIRA, M.; BRITTIJN, S.A.; BURGERHOUT, E.; VAN DEN THILLART, G.E.; SPAINK, H.P.; PLANAS, J.V. Establishing zebrafish as a novel exercise model: swimming economy, swimming-enhanced growth and muscle growth marker gene expression. **PLoS One**, v.5, n.12, e14483, 2010.

REN, J.; WU, N.N.; WANG, S.; SOWERS, J.R.; ZHANG, Y. Obesity cardiomyopathy: Evidence, mechanisms, and therapeutic implications. **Physiology**, v.101, p1745–1807, 2021.

ROVIRA, M.; BORRÀS, D.M.; MARQUES, I.J.; PUIG, C.; PLANAS, J.V. Physiological Responses to Swimming-Induced Exercise in the Adult Zebrafish Regenerating Heart. **Frontiers in Physiology**, v.9, p.1362-1396, 2018.

SLETTEN, A.C.; PETERSON, L.R.; SCHAFFER, J.E. Manifestations and mechanisms of myocardial lipotoxicity in obesity. **Journal of Internal Medicine**, v.284, p.478–491, 2018.

SCIARRETTA, S.; ZHAI, P.; SHAO, D.; MAEJIMA, Y.; ROBBINS, J.; VOLPE, M.; CONDORELLI, G.; SADOSHIMA, J. Rheb is a critical regulator of autophagy during myocardial ischemia: pathophysiological implications in obesity and metabolic syndrome. **Circulation**, v.125, n.9, p.1134-1146, 2012.

TONG, M.; SAITO, T.; ZHAI, P.; OKA, S.I.; MIZUSHIMA, W.; NAKAMURA, M.; IKEDA, S.; SHIRAKABE, A.; SADOSHIMA, J. Mitophagy Is Essential for Maintaining Cardiac Function During High Fat Diet-Induced Diabetic Cardiomyopathy. **Circulation Research**, v.124, n.9, p.1360-1371, 2019.

VAN DER MEULEN, T.; SCHIPPER, H.; VAN DEN BOOGAART, J. G. M.; HUISING, M. O.; KRANENBARG, S.; VAN LEEUWEN, J. L. Endurance exercise differentially stimulates heart and axial muscle development in zebrafish (*Danio rerio*). **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 4, p. 1040-1048, 2006.

VUJIC, A.; LERCHENMÜLLER, C.; WU, T.D.; GUILLERMIER, C.; RABOLLI, C.P.; GONZALEZ, E.; SENYO, S.E.; LIU, X.; GUERQUIN-KERN, J.L.; STEINHAUSER M.L.; LEE R.T.; ROSENZWEIG A. Exercise induces new cardiomyocyte generation in the adult mammalian heart. **Nature Communications**, v.9, n.1, p.1659-1682, 2018.

XU, Z.; QIN, Y, L.V.B.; TIAN, Z.; ZHANG, B. Intermittent Fasting Improves High-Fat Diet-Induced Obesity Cardiomyopathy via Alleviating Lipid Deposition and Apoptosis and Decreasing m6A Methylation in the Heart. **Nutrients**, v.14, n.2, p.251-274, 2022.

CAPITULO 3

QUANTIFICAÇÃO DA ESTRUTURA HEPÁTICA DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*) SUBMETIDOS À DIFERENTES DIETAS E EXERCÍCIO FÍSICO

RESUMO

Para estudar o desenvolvimento do fígado de vertebrados, o Zebrafish, nas últimas décadas, tornou-se o modelo primário. Este trabalho avaliou o impacto do exercício físico sobre o desenvolvimento de Zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com dieta padrão e dieta hipercalórica. Os animais que praticaram exercício físico apresentaram maior área de hepatócitos (65.92 ± 1.81 – GMex e 50.75 ± 2.24 GHex) dentre os grupos. Os animais do grupo GH apresentaram a maior área de tecido conjuntivo (15.12 ± 0.72), seguidos do grupo GHex ($13.53 \pm 1,43$). Com relação à esteatose, o grupo GH apresentou a maior quantidade de gordura (27.21 ± 1.36), seguido pelo grupo GHex (21.66 ± 1.110) com áreas de macroesteatose, sendo as diferenças estatisticamente significativas. O GMex apresentou área de gordura de $3,5 \pm 0,76$, enquanto o GM apresentou 5.7 ± 0.5 . O grupo GHex apresentou 20,39% menos gordura que o grupo GH. Os animais do grupo GMex apresentou 72,47% menos gordura do que aqueles que o GM. Conclui-se que a dieta hipercalórica implicou para os grupos GH e GHex maior área de esteatose e de tecido conjuntivo, e menor área ocupada pelos hepatócitos. O exercício físico nos grupos que o praticaram trouxe um padrão hepático com maior área de hepatócitos, menor esteatose hepática e presença de tecido conjuntivo.

Palavras-chave: fígado, Zebrafish, hepatócitos, esteatose, exercício físico.

ABSTRACT

To study the development of the vertebrate liver, Zebrafish, in the last few decades, has become the primary model. This work evaluated the impact of physical exercise on the development of Zebrafish (*Danio rerio*) fed with standard and hypercaloric diet. The animals that practiced physical exercise presented greater area of hepatocyte (65.92 ± 1.81 – GMex and 50.75 ± 2.24 GHex) among the groups. The animals of the GH group presented a larger area of connective tissue (15.12 ± 0.72), followed by the GHex group (13.53 ± 1.43). Regarding steatosis, the GH group presented the highest amount of fat (27.21 ± 1.36), followed by the GHex group (21.66 ± 1.110) with areas of macrosteatosis, with statistically significant differences. The GMex presented a fat area of 3.5 ± 0.76 , while the GM presented 5.7 ± 0.5 . The GHex group had 20.39% less fat than the GH group. The animals in the GMex group had 72.47% less fat than those in the GM. It is concluded that a hypercaloric diet implied for the GH and GHex groups had greater area of steatosis and connective tissue, and a smaller area occupied by hepatocytes. Physical exercise in the groups that practice it brought a hepatic pattern with greater hepatic steatosis and the presence of connective tissue.

Keywords: Liver, Zebrafish, hepatocyte, steatosis, physical exercise.

INTRODUÇÃO

Para estudar o desenvolvimento do fígado de vertebrados, o Zebrafish, nas últimas décadas, tornou-se o modelo primário. O fígado do Zebrafish desempenha similaridade com humanos e roedores no que abrange as funções e a microanatomia, incluindo a capacidade de filtrar, absorver e processar grandes complexos de proteínas dentro dos

sinusóides hepáticos (CHENG et al., 2019). O trilobado fígado desses animais também são similares no processamento de lipídios, vitaminas, proteínas e carboidratos e na síntese de proteínas séricas (MENKE et al., 2011).

A doença do fígado gorduroso não alcóolica (Non-alcoholic fatty liver disease – NAFLD) envolve diversas condições, a exemplo da deposição de gordura com consequente esteatose, que pode ser associada à quadros de hepatite, fibrose, cirrose e até mesmo neoplasias (BENEDICT e ZHANG, 2017). É, atualmente, uma doença comum no mundo estando associada, inclusive, com desordens metabólicas, a exemplo de diabetes do tipo 2, ou mesmo hiperlipidemia, hipertensão arterial e a obesidade (SARWAR et al., 2018).

Em humanos e no Zebrafish há varias similaridades na caracterização da NAFLD, que incluem aumento do hepatócito e acúmulo de triglicerídeos. Por mais que o Zebrafish tem sido útil no estudo da doença, a interação entre o hepatócito e outros tipos de célula, a progressão e severidade da esteatohepatite que envolve inflamação e fibrose precisam ser melhor estudadas (GOESSLING e SADLER, 2015).

Relacionar obesidade com o desenvolvimento da NAFLD se faz por uma vez que a hidrolisação de triacilglicerol acumulado no tecido adiposo leva à liberação de glicerol e ácidos graxos livres, que acabam se direcionando ao fígado para metabolização, onde acabam se acumulando e favorecendo o desenvolvimento da doença (MILIC et al., 2014). Normalmente o fígado não estoca triacilglicerol, mas em condições de desequilíbrio, como a obesidade, ou mesmo alto consumo de carboidratos e gorduras, levam a um metabolismo anômalo dos lipídios, levando ao acúmulo de gordura hepática (NASSIR et al., 2015). A permanência de gordura no fígado leva ao desenvolvimento da esteatose. Frequentemente é considerada uma condição benigna, mas com o passar do tempo, leva à processos inflamatórios com processos de necrose e inflamação, com degeneração dos

hepatócitos e maior risco da progressão fibrótica e para a cirrose, e conseqüentemente, eleva o risco de desenvolvimento de NAFLD (NASSIR et al., 2015; HASHIMOTO et al., 2015).

Na intervenção e tratamento da NAFLD, com o intuito de induzir a lipofagia no fígado, o uso de uma dieta com restrição calórica e a imposição da prática de exercício físico tem mostrado resultados animadores. Até porque o acúmulo de lipídio também provoca exacerbado envelhecimento do fígado (GAO et al., 2020).

O exercício físico desempenha conseqüências benéficas sobre o uso adequado de fontes de energia, a exemplo do tecido adiposo. Durante o processo da utilização de gordura como fonte de energia os adipócitos liberam ácidos graxos livres e triacilglicerol, e estes são direcionados via corrente sanguínea até o local em que são necessários, a exemplo dos músculos (EL-ZAYAT et al., 2019). Para a melhora de parâmetros metabólicos, os estudos com exercício também são promissores, a exemplo da resistência à insulina, leptina e diminuição da adiposidade, bem como as hepatopatias (ZHANG e BANHIDY, 2017). No entanto, poucos são os estudos que avaliam o impacto do exercício em peixes obesos, ou mesmo seu impacto em peixes que desenvolvem NAFLD. Assim, o propósito desse estudo foi avaliar as conseqüências da dieta hipercalórica e do exercício físico no desenvolvimento, frente a diferentes protocolos, em relação a alguns componentes estruturas do fígado, dentre eles, os hepatócitos, o tecido conjuntivo e o tecido adiposo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Quarenta e oito peixes da espécie *Danio rerio*, de ambos os sexos, adultos, com aproximadamente 10-18 meses de idade, foram empregados no experimento. Submetidos a aclimatização e quarentena, ao longo de 15 dias, em seguida alojados em quatro grupos de 12 animais, em um aquário com quatro divisões de 19 Litros de água estabilizada, mantida a temperatura ideal e oxigenada adequadamente.

Durante os períodos de aclimatização, quarentena do experimento, os animais foram submetidos a um ciclo de 14 horas luz e 10 horas escuro e foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial em flocos (Alcon Basic®). Durante o período de aclimatização, quarentena e ao longo do experimento os animais foram mantidos em aquários com sistema de circulação fechada, à temperatura constante de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ controlada por termostato (Atman®) e aferida com auxílio de um termômetro (Aquadene®). Os aquários tiveram sua água submetida a circulação, por meio de bomba submersa para oxigenação (HBO-300) e filtração empregando-se filtro externo (Alife 500). Houve troca semanal de 10% da água, limpeza dos aquários e filtros manualmente, a cada semana.

Durante todo o período, a qualidade da água foi avaliada, sendo que: a cada dia, pH = 6,8-7,0 (pH Tropical, LabconTest), semanalmente amônia = 0 ppm (Amônia Tóxica, LabconTest) e mensalmente oxigênio dissolvido = 6-8 mg/L (O₂ Dissolvido, LabconTest). Quando necessário, os parâmetros foram corrigidos utilizando o corretivo de pH Discus Buffer (Seachem) e o removedor de amônia Am Guard (Seachem).

Administração das dietas e exercício físico

Mantendo as mesmas condições da aclimatização e quarentena os animais foram submetidos a uma modificação gradual da sua dieta, por duas semanas, recebendo artêmias congeladas (AquaSmart - 22% de lipídios, 16% de carboidrato e 44% de

proteínas). Até atingirem a seguinte quantidade, conforme tabela 1, conforme proposto por Oka et al. (2010):

- a) Manutenção (GM): Dieta manutenção (5 mg cistos de artêmias/peixe/dia, uma vez ao dia). (n=24). Durante treze semanas;
- b) Dieta hipercalórica (GH): Dieta hipercalórica (60mg cistos de artêmias/peixe/dia, duas vezes ao dia.) (n=24). Durante treze semanas;

Tabela 1 - Dados absolutos das diferentes dietas disponibilizadas aos *Danio rerio*, ao longo de treze semanas. Conforme protocolo proposto por Oka et al. (2010). Dieta manutenção (GM); Dieta manutenção + exercício físico (GMex); Dieta hipercalórica (GH); Dieta hipercalórica + exercício físico (GHex).

Dieta (Artêmias)	GM e GMex	GH e GHex
Ingestão energética (Kcal/dia por animal)	20	240

Conforme protocolo proposto por Oka et al. (2010), após oito semanas, os animais seriam induzidos ao sobrepeso. Foram determinados quatro grupos, sendo compostos de 12 animais cada, para tanto, os aquários foram mantidos nas mesmas condições expostas anteriormente. Sendo que, os grupos receberam dieta de manutenção e/ou hipercalórica, conforme exposto abaixo, porém acrescidos ou não de exercício físico. Estes grupos, foram mantidos por 13 semanas, em seguida foram eutanasiados por imersão em água gelada, 4 graus Celsius, por 15 minutos, conforme protocolo proposto por Gupta e Mullins (2010).

- GM: Dieta manutenção (n=12);

- GMex: Dieta manutenção + exercício físico (n=12);
- GH: Dieta hipercalórica (n=12);
- GHex: Dieta hipercalórica + exercício físico (n=12).

O protocolo de exercício físico imposto foi realizado com base no trabalho de Van Der Meulen *et al.* (2006), para os animais: GMex: Dieta manutenção + exercício físico (n=12) e GHex: Dieta hipercalórica + exercício físico (n=12). Os animais foram submetidos a seis horas de exercício físico forçado, estimulados através do fluxo de água controlado na velocidade de cinco centímetros (cm) dos animais por segundo (5 cm/seg), pelo total de treze semanas, em aquário com um tubo para natação. Para diminuir o estresse e otimizar o protocolo de exercício físico, todos os dias o fluxo de água foi aumentado gradualmente até atingir a velocidade esperada em cerca de 5 minutos/por dia (Tabela 2).

Tabela 2 - Protocolo de adaptação do exercício físico dos animais ao longo das semanas para os animais GMex- Dieta manutenção + exercício físico e GHex: Dieta hipercalórica + exercício físico (n=12).

Dia/Semana	Tempo (h/dia)	Velocidade (cm/s)
1º Dia	1	5
2º Dia	2	5
3º Dia	3	5
4º Dia	4	5
5º Dia	5	5
6º Dia	6	5
2ª a 13ª semana	6	5

Ao longo de todo o período do experimento, cada um dos animais foi semanalmente

submetido a pesagem, quando foram retirados e colocados em um béquer de vidro 100ml (Nalgon). Os pesos obtidos em gramas, em balança de precisão (Marte AD 1000).

Da mesma forma, todos os animais, de cada um dos grupos, ao longo das 13 semanas, foram mensurados em relação ao seu comprimento longitudinal, empregando para tanto, a medida em centímetros, da distância obtida desde a cabeça até a cauda. Empregando para tanto paquímetro universal (Starret).

Avaliação histomorfométrica

Ao final das 13 semanas no protocolo de imposição de exercício físico, os peixes após eutanásia, foram fixados em 10% de formalina em solução aquosa por 24 horas e processados utilizando as técnicas histológicas convencionais e incluídos em blocos de paraplast (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Foram feitos cortes com espessura de 4 µm ao longo de todo o animal com auxílio do micrótomo manual (Leixa RM 2125RT). As lâminas foram coradas de acordo com as técnicas histológicas de Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Masson.

As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico (Olympus® BX51), em aumentos de 10 a 40x. Foram obtidas fotomicrografias de 10 campos escolhidos aleatoriamente para cada lâmina pelo microscópio óptico acoplado a um software para captura e análise das imagens, o ProgRes® Capture Pro 2.5

O fígado dos animais foi analisado quanto a área ocupada pelos hepatócitos e tecido conjuntivo e adiposo. Para tanto, foi utilizado o software STEPanizer© 1.0. A área ocupada pelos hepatócitos e tecidos conjuntivo e adiposo foram quantificados por meio de um sistema de teste de pontos (CATTÁ-PRETA et al., 2011) em que o cálculo da área total se baseou no princípio de Delesse onde $A = V_v = P_p/P_t$, sendo P_p os pontos que incidem sobre a estrutura analisada e P_t o número total de pontos (36 pontos) e foi

utilizada a Densidade de Volume ($V_v\%$) para apresentação dos resultados, como média \pm desvio padrão da média. Foram avaliados os hepatócitos e os tecidos conjuntivo e adiposo.

Análise estatística

Os dados, massa corporal e comprimento, foram testados quanto a normalidade a partir da aplicação do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram testadas pela análise de variância one-way (ANOVA), seguida pelo pós-teste de múltipla comparação de Dunnett's Holm-Sidak, considerando o valor $P\leq 0,05$, como estatisticamente significativo. A estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism (Prism versão 6.0c para Mac, GraphPad Software, La Jolla, CA).

Os resultados de hepatócitos, e os tecidos conjuntivo e adiposo foram apresentados como média \pm desvio padrão da média. Todo os dados foram submetidos a aplicação do teste Kolmogorov-Smirnov, avaliando-se a distribuição normal. Buscando o entendimento dos dados e sua relação entre os grupos avaliados, frente a oferta de dietas diferentes, bem como, o efeito promovido pela imposição de exercício físico, estes foram avaliados por meio da aplicação do teste Mann Whitney. As análises ocorreram primeiramente entre os grupos de animais que receberam dieta manutenção (GM) e que foram submetidos ao exercício físico (GMex). Da mesma forma, o teste de Mann-Whitney avaliou os animais dos grupos que receberam dieta hipercalórica (GH) e foram submetidos ao exercício físico (GHex). Considerou-se $P\leq 0,05$ como estatisticamente significativo (Figura 1). A análise foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism (Prism versão 6.0c para Mac, GraphPad Software, La Jolla, CA).

RESULTADOS

Massa e comprimento corporal

Para os animais do GM, foi observada que ao longo das 13 semanas, a massa corporal (gramas) manteve-se constante, sem diferença estatística entre as semanas ($P \leq 0,05$). Os dados obtidos, em relação ao comprimento longitudinal dos animais, em centímetros (cm), não apresentaram diferença estatística.

Para o grupo GMex, em relação a massa corporal, houve diferença estatística entre os animais da primeira semana ($0,30g \pm 0,10$), revelando uma diminuição: de 30,83% para os da segunda semana; 33,59% para os da quarta semana e de 40,01% para os da sexta semana. Em relação ao comprimento longitudinal dos animais deste grupo, não foi observada diferença estatística ao longo do período.

A dieta hipercalórica no grupo GH promoveu aumento da massa corporal nos animais ao longo das semanas. Ocorreu diferença estatística, entre a massa corporal dos animais da primeira semana ($0,32g \pm 0,07$), com incremento relativo de: 45,68% para os animais da sexta semana, 53,27% para os da sétima semana, 40,08% para os da oitava semana, 47,59% para os da nona semana, 63,94% para os da décima semana, 49,80% para os da décima primeira semana, 43,13% para os da décima segunda semana e de 28,89% para os da décima terceira semana. Não foi observada diferença estatística em relação ao comprimento dos animais, ao longo das semanas ($P \leq 0,05$).

Foram observadas diferenças estatísticas das massas corporais (gramas) dos animais do grupo GHex, da primeira semana ($0,27g \pm 0,08$), com um incremento de

45,75% para os animais da sexta semana, 65,66% para os animais da sétima semana, 85,98% para os animais da oitava semana, 96,88% para os animais da nona semana, 104,48% para os animais da décima semana, 94,59% para os animais da décima primeira semana, 87,16% para os animais da décima segunda semana e de 79,69% para os animais da décima terceira semana.. Houve diferença estatística em relação ao comprimento dos animais, da nona ($3,29\text{cm}\pm 0,33$) até a décima terceira semana ($3,61\text{cm}\pm 0,33$).

Análise histomorfológica

Inicialmente os dados quantitativos, relativos a densidade volumétrica da área ocupada pelos hepatócitos, dos grupos mantidos sob dieta de manutenção (GM; $57,35\%\pm 2,9$), em comparação aqueles que foram submetidos a exercício físico (GMex; $65,92\%\pm 1,81$), demonstraram um incremento de 14,94% da densidade volumétrica da área destes últimos, sendo $P<0,001$. Já em relação a densidade volumétrica da área dos hepatócitos, entre os animais que receberam uma dieta hipercalórica, isto é, (GH; $47,17\%\pm 1,28$ e GHex; $50,75\%\pm 2,24$), foi observado que a área ocupada pelos animais que praticaram exercício físico (GHex) foi 7,59% maior, do que a área do grupo sem exercício físico (GH), com diferença estatística $P<0,001$ (Figura 1).

Em relação a densidade volumétrica da área ocupada pelo tecido conjuntivo, foi possível afirmar que quando comparados os animais submetidos a dieta de manutenção (GM; $12,16\%\pm 0,81$) com aqueles que praticaram exercício físico (GMex; $13,5\%\pm 0,76$), houve aumento de 11,02% desta área, com diferença estatística $P<0,001$. Para os animais que receberam dieta hipercalórica, a diferença foi de aproximadamente 10,51% a menos, quando comparados os diferentes grupos (GH; $15,12\%\pm 0,72$ e GHex; $13,53\pm 1,43$), sendo $P<0,001$ (Figura 1). Sem a ocorrência de fibrose nos grupos.

Os valores obtidos para a densidade volumétrica da área do tecido adiposo disposto ao longo do parênquima hepático, dos animais que receberam dieta de manutenção e praticaram exercício físico (GMex; $3,5\% \pm 0,76$) foi 72,47% menor, do que aqueles que foram mantidos sob dieta de manutenção (GM; $5,7\% \pm 0,5$), sendo $P < 0,001$. De outra forma, a densidade volumétrica da área de tecido adiposo encontrado nos fígados dos animais submetidos a dieta hipercalórica (GH; $27,21\% \pm 1,36$), quando comparados com os animais que receberam a mesma dieta, sobretudo praticaram exercício físico (GHex; $21,66\% \pm 1,11$) (Tabela 3), diminuiu aproximadamente 20,39%, com $P < 0,001$ (Figura 1).

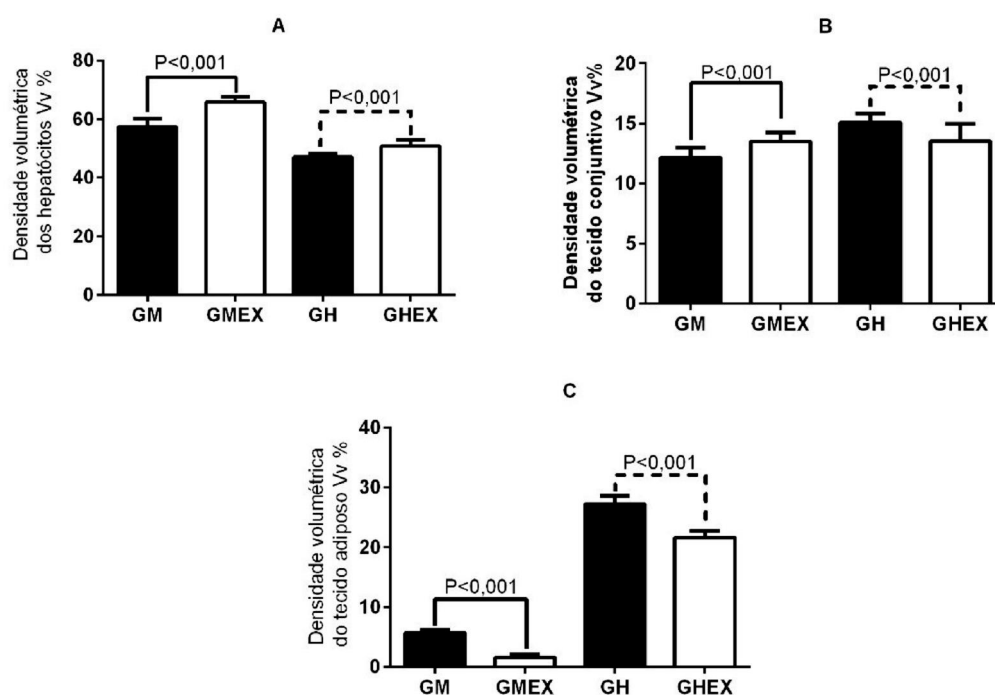


Figura 1 – Avaliação da densidade volumétrica dos hepatócitos (A); tecido conjuntivo (B) e o tecido adiposo (C) de Zebrafish submetidos a dieta manutenção (GM); dieta manutenção e exercício físico (Gmex); dieta hipercalórica (GH) e dieta hipercalórica e exercício físico (GHex), ao longo de 13 semanas. Todos os valores são média \pm desvio

padrão, asteriscos (*) representam a ocorrência de diferença estatística, ANOVA one-way, por meio da aplicação do teste Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

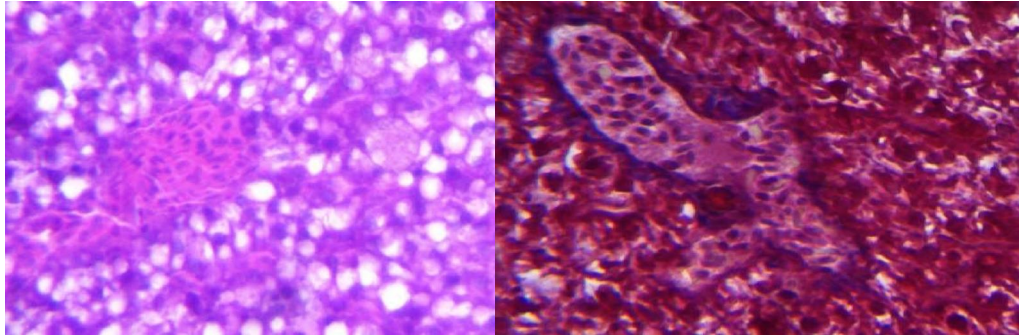


Figura 2 – Parênquima hepático grupo GH, colorações H&E e Tricrômico de masson. Notar áreas de macro e microesteatose. Aumento de 400x

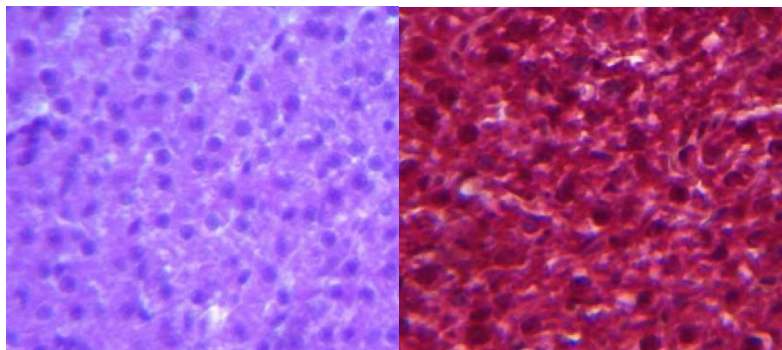


Figura 3 – Parênquima hepático do GMex (esquerda) e GM (direita). GMex apresentou maior densidade de hepatócitos. Colorações H&E e Tricrômico de Masson. Aumento de 400x

DISCUSSÃO

O desempenho dos animais nos grupos GH e GHex evidenciou aumento significativo do ganho de massa corporal determinada pela quantidade de artêmias a partir da sexta semana. Este ganho de peso foi confirmado pela ocorrência de diferença estatística quando comparados os animais da primeira semana, em ambos os grupos ($P \leq 0,05$). Foi evidenciado em Zebrafish alimentados com dieta hiperlipídica, obesidade em oito semanas, aumento dos níveis de triglicerídeos no plasma sanguíneo e hepatosteatose (OKA et al., 2010). Já no grupo GMex, houve diminuição da massa corporal da segunda, quarta e sexta semanas em comparação com a primeira semana, devido ao fato das artêmias serem um alimento hiperlipídico mas a oferta não ser hipercalórica. Corroborando com um trabalho que evidenciou a perda de peso em roedores com uma dieta cetogênica quando também submetidos ao exercício de resistência (MA et al., 2018). Mesmo diante da imposição de exercício, houve variação de massa e comprimento dos animais, de forma significativa.

Em relação ao crescimento longitudinal, foi observado no grupo GHex que diferença estatística quando comparados com a primeira semana ($P \leq 0,05$). Esse resultado corrobora com um estudo que encontraram efeitos estimuladores do crescimento frente a um protocolo de exercício intenso em Zebrafish (PALSTRA et al., 2010).

O Zebrafish mostrou-se consolidado como modelo para exercícios, como em situações de crescimento favorecido, e também implicação em ciências básicas, biomédicas e aplicadas (PALSTRA et al., 2010). A arquitetura e morfologia hepática, em Zebrafish, submetidos a dieta hipercalórica e exercício físico, demonstrou como

consequência, a determinação de uma maior área de esteatose e de tecido conjuntivo, e menor área ocupada pelos hepatócitos.

Em relação aos hepatócitos, foi observado uma diminuição da área ocupada, nos diferentes grupos. Sinalizando que o efeito imposto pela dieta hipercalórica teria desencadeado uma redução da área ocupada na estrutura hepática. Coincidindo, em parte, com o apresentado por Forn-Cuni et al. (2015), que consideraram que dietas com alto teor de gordura, promoveram forte inflamação, com perfil apoptótico e queda da proliferação celular. Em um trabalho com Zebrafish mantidos por treze semanas com dieta comercial não apresentaram variação no volume e na densidade numérica dos hepatócitos, os resultados indicam que os fatores que alteram a densidade volumétrica também alteram a densidade numérica (OLIVEIRA et al., 2016).

A dieta hiperlipídica foi capaz de desequilibrar a homeostase lipídica nos animais, causando acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos, induzindo inflamação, estresse oxidativo e causando lesão do hepatócito, com ou sem fibrose (SHIMPI et al., 2017). Esses efeitos foram incisivos para estabelecer esteatose hepática e possivelmente promoveram a progressão para a doença do fígado gorduroso não alcóolica - NAFLD (BELLENTANI et al., 2010).

De outra forma, a imposição do exercício físico mostrou-se efetiva. Coincidindo com o verificado em humanos obesos, sujeitos ao treinamento intermitente de alta intensidade, que tiveram redução da gordura no fígado (CASSIDY et al., 2016, HOUGHTON et al., 2017). Em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, que adquiriram esteatose hepática e resistência a insulina, que ao realizarem exercício físico aeróbico, demonstraram tal ação, como alternativa não farmacológica no tratamento à deposição de tecido adiposo no fígado (CHO et al., 2014). O exercício provocou ainda a

redução da massa corporal e melhora a sensibilidade a insulina, com mudanças benéficas no fígado (SCHULTZ et al., 2012).

O fígado foi capaz de realizar parte da lipogênese, sob o efeito do exercício físico, fazendo com que a gordura fosse utilizada como fonte de energia para os músculos e com isso diminuindo a estocagem de gordura intra-hepática (EL-ZAYAT et al., 2019). Diante do exercício físico, de intensidade moderada e de longa duração, houve a supressão da deposição de gordura no fígado, em ratos alimentados com dieta hiperlipídica e com NAFLD moderada (ZHENG e CAI, 2019, QIAN et al., 2021). Já em Zebrafish obesos, conforme Zou et al. (2021), foram observadas alterações provenientes da dieta hiperlipídica, tais como, acúmulo de lipídios, hepatoesteatose, inflamação, fibrose e apoptose. Diferentemente do observado em animais que praticaram exercício físico, sugerindo que o exercício poderia mitigar a homeostase dos distúrbios lipídicos causados pela ingestão excessiva de gordura (ZOU et al., 2021). Portanto, o exercício físico e a restrição calórica, foram benéficas para promover a regressão das lesões patológicas, ao instante aumentou o gasto energético, diminuiu a sobrecarga lipídica e também melhorou a homeostase metabólica (ROMERO-GÓMEZ et al., 2017 e GAO et al., 2020).

As alterações quantitativas relacionadas com os tecidos conjuntivo e adiposo, nos animais que receberam dieta hiperlipídica, gerou um processo de esteatohepatite, que poderia progredir para cirrose hepática. De outra forma, nos animais que receberam dieta manutenção, seus fígados poderiam ser considerados como saudáveis (HASHIMOTO et al., 2015; NASSIR et al., 2015), pois, o exercício e a dieta equilibrada, em seu aporte de macronutrientes, atenuou as alterações histopatológicas causadas por dieta hiperlipídica em Zebrafish (ZOU et al., 2021). Assim, a fibrose no fígado, estaria relacionada a progressão da NAFLD, decorrentes de processo inflamatório estimulado pelo dano aos hepatócitos (JIAO et al., 2009; PINHEIRO et al., 2017), principalmente em decorrência

da maior oxidação de proteínas hepáticas, responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios amplificados e produção de citocinas pró-inflamatórias (PELLICORO et al., 2014).

No contexto da variação do tecido conjuntivo hepático, foi verificado que a deposição de matriz extracelular, realizada por miofibroblastos portais e células hepáticas subendoteliais, atuaram como células fibrogênicas no fígado (PARK et al., 2015). Para QIAN et al. (2021) em ratos, foi observado aumento de tecido conjuntivo no fígado, com evidente inflamação e melhora na sensibilidade a insulina disponível. Todas estas alterações secundárias ao processo inflamatório, estimuladas pelo dano aos hepatócitos, que conseqüentemente promoveram fibrose hepática, com deposição de matriz extracelular, caracterizada por uma lesão parenquimatosa de aspecto crônica (JIAO et al., 2009; PINHEIRO et al., 2017).

CONCLUSÃO

A dieta hipercalórica implicou para os grupos GH e GHex maior área de esteatose e de tecido conjuntivo, e menor área ocupada pelos hepatócitos em relação ao controle. O exercício físico nos grupos que o praticaram trouxe um padrão hepático com maior área de hepatócitos, menor esteatose hepática e presença de tecido conjuntivo. O Zebrafish se mostrou um modelo biológico potencial para avaliação da dieta e do exercício físico sobre a arquitetura e morfologia hepática.

REFERÊNCIAS

BELLENTANI, S.; SCAGLIONI, F.; MARINO, M.; BEDOGNI, G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. **Digestive diseases**, v.28, p.155–161, 2010.

BENEDICT M.; ZHANG X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. **World Journal of Gastroenterology**, v.9, n.16, p.715-732, 2017.

CASSIDY, S.; THOMA, C.; HALLSWORTH, K.; PARIKH, J.; HOLLINGSWORTH, K.G.; TAYLOR, R.; JAKOVLJEVIC, D.G.; TRENELL, M.I. High intensity intermittent exercise improves cardiac structure and function and reduces liver fat in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial. **Diabetologia**, v.59, n.1, p.56-66, 2016.

CATTA-PRETA, M.; MENDONCA, L.S.; FRAULOB-AQUINO, J.; AGUILA, M., MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. **Virchows Archiv**, v.459, n.5 p.477–85, 2011.

CHENG, D.; MORSCH, M.; SHAMI, G.J.; CHUNG, R.S.; BRAET, F. Albumin uptake and distribution in the zebrafish liver as observed via correlative imaging. **Experimental Cell Research**, v.374, p.162–171, 2019.

CHO, J.; LEE I.; KIM, D.; KOH, Y.; KONG, J.; LEE, S.; KANG, H. Effect of aerobic exercise training on non-alcoholic fatty liver disease induced by a high fat diet in C57BL/6 mice. **Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry**, v.18, n.4, p.339-46, 2014.

EL-ZAYAT, S. R.; SIBAIL, H.; EL-SHAMY, K. A. Physiological process of fat loss. **Bulletin of the National Research Centre**, v.43, n.1, 2019.

FORN-CUNI, G.; VARELA, M.; FERNANDEZ-RODRIGUEZ C.M.; FIGUERAS A.; NOVOA B. Liver immune responses to inflammatory stimuli in a diet-induced obesity model of zebrafish. **Journal of Endocrinology**, v.224, p.159-170, 2015.

GAO, Y.; ZHANG, W.; ZENG, L.Q.; BAI, H.; LI, J.; ZHOU, J.; ZHOU, G.Y.; FANG, C.W.; WANG, F.; QIN, X.J. Exercise and dietary intervention ameliorate high-fat diet-induced NAFLD and liver aging by inducing lipophagy. **Redox Biology**, v.36, 101635, 2020.

GUPTA, T.; MULLINS, M. C. Dissection of Organs from the Adult Zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, v. 37, p. 1717-1727, 2010.

GOESSLING, W.; SADLER, K.C. Zebrafish: an important tool for liver disease research. **Gastroenterology**, v.149, n.6, p.1361-77, 2015.

HASHIMOTO, E.; KATSUTOSHI, T.; LUDWIG, J. Diagnosis and classification of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: Current concepts and remaining challenges. **Hepatology Research**, v.45, n.1, p20–8, 2015.

HEGARDT, F.G. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. **Biochemical Journal**, v.338, p.569–582, 1999.

HOUGHTON, D.; THOMA, C.; HALLSWORTH, K.; CASSIDY, S.; HARDY, T.; BURT, A.D.; TINIAKOS, D.; HOLLINGSWORTH, K.G.; TAYLOR, R.; DAY, C.P.; MCPHERSON, S.; ANSTEE, Q.M.; TRENELL, M.I. Exercise reduces liver lipids and visceral adiposity in patients with nonalcoholic steatohepatitis in a randomized controlled trial. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, n.15, v.1, p.96-102.e3, 2017.

JIAO, J.; FRIEDMAN, S.L.; ALOMAN, C. Hepatic fibrosis. **Current Opinion Gastroenterology**, v.25, n.3, p.223–29, 2009.

MA, S.; HUANG, Q.; YADA, K.; LIU, C.; SUZUKI, K. An 8-Week Ketogenic Low Carbohydrate, High Fat Diet Enhanced Exhaustive Exercise Capacity in Mice. **Nutrients**, v.10, n.6, p.673-698, 2018.

MENKE, A.L.; SPITSBERGEN, J.M.; WOLTERBEEK, A.P.; WOUTERSEN, R.A. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. **Toxicologic Pathology**, v.39, p.759-75, 2011.

MILIC, S.; LULIC, D.; STIMAC, D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. **World J Gastroenterology**, v.20, p.9330-37, 2014.

NASSIR, F.; RECTOR, R.S.; HAMMOUD, G.M.; IBDAH, J.A. Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. **Gastroenterology Hepatology**, v.11 n.3, p.167-75, 2015.

OLIVEIRA, L. B. ; LEONARDO, A.S. ; LIMA, E.M.M. Macro- and microstructural descriptions of the zebrafish (*Danio rerio*) liver. **Folia Morphologica**, v. 75, p. 382-387, 2016.

OKA, T.; NISHIMURA, Y.; ZANG, L.; HIRANO, M.; SHIMADA, Y.; WANG, Z.; UMEMOTO N.; KUROYANAGI, J.; NISHIMURA N.; TANAKA T. Diet-induced Obesity in Zebrafish Shares Common Pathophysiological Pathways with Mammalian Obesity. **BMC Physiology**, v. 10, p.21-51, 2010.

PALSTRA, A.P.; TUDORACHE, C.; ROVIRA, M.; BRITTIJN, S.A.; BURGERHOUT, E.; VAN DEN THILLART, G.E.; SPAINK, H.P.; PLANAS, J.V. Establishing zebrafish as a novel exercise model: swimming economy, swimming-enhanced growth and muscle growth marker gene expression. **PLoS One**, v.5, n.12, e14483, 2010.

PARK, S.; KIM, J.W.; KIM, J.H.; LIM, C.W.; KIM, B. Differential Roles of Angiogenesis in the Induction of Fibrogenesis and the Resolution of Fibrosis in Liver. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.38, n.7, p.980–985, 2015.

PELLICORO, A.; RAMACHANDRAN, P.; IREDALE, J.P.; FALLOWFIELD, J.A. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. **Nature Reviews Immunology**, v.14, n.3, p.181–194, 2014.

PINHEIRO, D.; LEIRÓS, L.; DÁU, J.B.T.; STUMBO, A.C.; THOLE, A.A.; CORTEZ, E.A.C.; MANDARIM-DE-LACRDA, C.A.; CARVALHO, L.; CARVALHO, S.N. Cytokines, hepatic cell profiling and cell interactions during bone marrow cell therapy for liver fibrosis in cholestatic mice. **PLoS ONE**, v.12, n.11, e0187970, 2017.

QIAN, X.; WANG, T.; GONG, J.; WANG, L.; CHEN, X.; LIN, H.; TU, W.; JIANG, S.; LI, S. Exercise in mice ameliorates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease by lowering HMGCS2. **Aging (Albany NY)**, v.13 ,n.6, p.8960-8974, 2021.

ROMERO-GÓMEZ, M.; ZELBER-SAGI, S.; TRENELL, M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. **Journal of Hepatology**, v.67, n.4. p.829-846, 2017.

SARWAR, R.; PIERCE, N.; KOPPE, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: current perspectives. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity**, v.11, p.533–42, 2018.

SHIMPI, P.C.; MORE, V.R.; PARANJPE, M.; DONEPUDI, A.C.; GOODRICH, J.M.; DOLINOY, D.C.; RUBIN, B.; SLITT, AL. Hepatic Lipid Accumulation and Nrf2 Expression following Perinatal and Peripubertal Exposure to Bisphenol A in a Mouse Model of Nonalcoholic Liver Disease. **Environ Health Perspective**, v.125, n.8, e.087005, 2017.

SCHULTZ, A., MENDONCA, L. S., AGUILA, M. B., MANDARIMDE-LACERDA, C. A. Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. **Experimental and Toxicologic Pathology**, n.64, p.273-282, 2012.

VAN DER MEULEN, T.; SCHIPPER, H.; VAN DEN BOOGAART, J.G.; HUISING, M.O.; KRANENBARG, S.; VAN LEEUWEN, J.L. Endurance exercise differentially stimulates heart and axial muscle development in zebrafish (*Danio rerio*). **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.291, p.1040-1048, 2006.

ZHANG, D.; BANHIDY, N.F. Effects of early physical exercise on later health. **Lancet**, v.389, p.801, 2017.

ZHENG, F.; CAI, Y. Concurrent exercise improves insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease by upregulating PPAR- γ and genes involved in the beta-oxidation of fatty acids in ApoE-KO mice fed a high-fat diet. **Lipids Health Disease**, n.18, v.1, p.6-28, 2019.

ZOU Y.; CHEN Z.; SUN C.; YANG D.; ZHOU Z.; PENG X.; ZHENG L.; TANG C. Exercise Intervention Mitigates Pathological Liver Changes in NAFLD Zebrafish by Activating SIRT1/AMPK/NRF2 Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, n.22, n.20, e.10940, 2021.