



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
CAMPUS GAMA – FGA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

**EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE NA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E COMPORTAMENTO DE
*ZEBRAFISH (DANIO RERIO)***

DANIEL LEAL FAGUNDES

ORIENTADOR: DR. JAIR TRAPÉ GOULART
COORIENTADORA: DRA. ANDREZA FABRO DE BEM



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB

FACULDADE UNB GAMA – FGA



**EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE NA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E
COMPORTAMENTO DE ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

DANIEL LEAL FAGUNDES

ORIENTADOR: DR. JAIR TRAPÉ GOULART

COORIENTADORA: DRA. ANDREZA FABRO DE BEM

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM
ENGENHARIA BIOMÉDICA

PUBLICAÇÃO: 169A/2023

BRASÍLIA/DF, JUNHO DE 2023

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB
FACULDADE UNB GAMA - FGA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

**EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE NA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E
COMPORTAMENTO DE *ZEBRAFISH (DANIO RERIO)***

DANIEL LEAL FAGUNDES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

APROVADA POR:

DR. JAIR TRAPÉ GOULART
(ORIENTADOR)

DRA. VERA REGINA FERNANDES DA SILVA MARÃES
(EXAMINADOR INTERNO)

DR. MAURO EUGÊNIO MEDINA NUNES
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, JUNHO DE 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

LEAL FAGUNDES, DANIEL

Efeitos do Jejum Intermitente na bioenergética mitocondrial e comportamento de *Zebrafish* (*Danio rerio*), Distrito Federal, 2023.

LL435e

Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Faculdade UnB Gama, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

- | | |
|--|---|
| 1. Jejum Intermitente | 2. Bioenergética |
| 3. Comportamento | 4. Zebrafish |
| I. Trapé Goulart, Jair
(orientador) | II. Fabro de Bem, Andreza
(coorientador) |

REFERÊNCIA

Leal Fagundes, Daniel (2023). Efeitos do Jejum Intermitente na bioenergética mitocondrial e comportamento de *Zebrafish* (*Danio rerio*). Dissertação de mestrado em Engenharia Biomédica, Publicação 169A/2023, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Faculdade UnB Gama, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 50p.

CESSÃO DE DIREITOS

Autor: Daniel Leal Fagundes

Título: Efeitos do Jejum Intermitente na bioenergética mitocondrial e comportamento de *Zebrafish* (*Danio rerio*)

Grau: Mestre

Ano: 2023

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender essas cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

200100769@unb.br

BRASÍLIA, DF – BRASIL

Com todo o meu amor, carinho e gratidão, dedico esta dissertação aos meus Pais, Adriana Leal e Olavo Fagundes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela esperança, pela proteção e pela bênção de exercer minha vocação. Tudo vem Dele e tudo é para Ele.

Aos meus orientadores, Dr. Jair Trapé Goulart, por ter me inspirado a ser um pesquisador, pela paciência e compreensão imensos e pelo apoio incondicional ao longo de todo projeto, e Dr^a. Andreza Fabro de Bem, pelos ensinamentos, pela inspiração e por me fazer pensar fora da caixa. A vocês todo o meu respeito, admiração e carinho. Obrigado pela oportunidade de estar no Lab de Bem e pela confiança depositada ao longo de todos esses anos.

À professora Dr^a. Paula Belozzi, que me ensinou os caminhos do dia a dia da pesquisa, me incentivou a ser autônomo e rigoroso com tudo o que é feito dentro do laboratório, sempre com o objetivo de fazer ciência de qualidade. Agradeço por todos os ensinamentos e cafés bons, que me mantiveram acordado durante essa jornada.

Aos colegas do Lab de Bem, sem os quais este projeto não teria sido possível. Agradeço por me acompanharem nessa jornada, por todo o companheirismo e risadas e acima de tudo, pela oportunidade de aprendermos juntos a fazer ciência com qualidade e excelência.

Ao professor Cesar Grisolia e toda a equipe do Laboratório de Genética Toxicológica pela parceria e também por todo o suporte com o modelo *zebrafish*.

À minha mãe, minha melhor amiga e maior apoiadora, por estar sempre comigo mesmo distante, por vibrar com as minhas conquistas e me amparar quando tudo estava ruim. O seu amor, incentivo e suporte foram a base mais importante para que eu alcançasse voos mais altos.

Ao meu pai, minha maior inspiração dentro da pesquisa científica, pelos conselhos, pelo apoio e pelo incentivo a seguir o meu sonho.

À toda a minha família pelo apoio, por todo o amor e carinho e por estarem sempre ao meu lado, torcendo por mim ao longo desse caminho.

Aos meus amigos, por toda a torcida e suporte, pelas noites em claro reclamando da vida, pelos desabafos, pelas visitas tarde da noite e por receberem com paciência a enxurrada de relatos excessivamente detalhados e longos de tudo o que eu aprendi.

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

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se de um conto de fadas se tratassem”

Marie Curie

RESUMO

O estilo de vida e hábitos alimentares da sociedade atual estão associados ao desenvolvimento de obesidade, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares. Existe uma preocupação mundial em combater controlar os processos de desregulação metabólica, e diversas abordagens terapêuticas estão sendo utilizadas para esse fim, incluindo utilização de fármacos e dietas ou regimes alimentares alternativos. Dentro deste último grupo, o jejum intermitente (JI, do inglês *Intermittent Fasting*) é um dos mais populares e vem sendo associado a resultados positivos como perda de peso e diminuição da resistência à insulina. O objetivo deste trabalho foi investigar o impacto do JI sobre a função mitocondrial cardíaca e cerebral e sobre o comportamento em um modelo animal de zebrafish. No estudo, os peixes foram agrupados em três grupos experimentais: i) SD: foi alimentado com uma dieta normal, conforme rotina alimentar do biotério; ii) IF24: JI alternando 24 horas de Jejum com 24 horas de alimentação normal; e iii) IF48: alternando 48 horas de Jejum com 24 horas de alimentação normal. O peso corporal dos animais foi mensurado semanalmente, durante as seis semanas do protocolo experimental. Ao final, os animais foram submetidos aos testes comportamentais para avaliação de comportamento tipo-ansioso no Teste do Tanque Novo (TTN) e de preferência social no Teste de Preferência Social (TPS), e em seguida eutanasiados para realização de medidas morfométricas e dissecação de órgãos para realização da respirometria de alta resolução nos tecidos cardíaco e encefálico. Ao final do protocolo experimental, os peixes do grupo IF24 e IF48 apresentaram diminuição significativa do peso corporal e do índice de massa corporal (BMI, *body mass index*) quando comparados aos peixes do grupo SD. O protocolo IF48 induziu uma diminuição do comprimento abdominal e de diversos parâmetros respiratórios (ETS I, ETS I + II, OXPHOS, respiração *ATP-linked* e capacidade de reserva), enquanto o protocolo IF24 não modificou o consumo de oxigênio de mitocôndrias cardíacas. Não foram observadas alterações no consumo de oxigênio de mitocôndrias cerebrais de peixes submetidos a ambos os protocolos de JI. Nos testes comportamentais, não encontramos diferença significativa em parâmetros de avaliação de comportamento tipo-ansioso e na preferência social dos animais IF48, mas observamos um leve efeito de diminuição no comportamento tipo-ansioso nos animais do grupo IF24, simbolizado por um maior tempo de exploração na parte superior do ambiente no TTN. Em conjunto, nossos achados mostram que o protocolo IF24 (alternando 24 horas de jejum e 24 horas de alimentação) foi capaz de diminuir parâmetros morfométricos sem impactar a função mitocondrial cardíaca e cerebral, enquanto o protocolo mais prolongado de jejum intermitente (IF48) induziu mortalidade e impactou a função mitocondrial cardíaca.

Palavras-chave: Jejum Intermitente, perda de peso, bioenergética mitocondrial, comportamento, zebrafish.

ABSTRACT

The lifestyle and dietary habits of modern society are associated with the development of obesity, type-2 diabetes and cardiovascular diseases. There is a global concern to control metabolic dysregulation processes, and a plethora of therapeutic approaches are being used for this purpose, including the use of drugs and alternative diets or eating regimens. Within this latter group, intermittent fasting (IF) is one of the most popular approaches and has been associated with positive outcomes such as weight loss and decreased insulin resistance. The aim of this study was to investigate the impact of IF on cardiac and brain mitochondrial function and behavior in a zebrafish animal model. In the study, the fish were divided into three experimental groups: i) SD: fed a normal balanced diet; ii) IF24: intermittent fasting with 24 hours of fasting alternated with 24 hours normal feeding (same as the the SD group); and iii) IF48: intermittent fasting with 48 hours of fasting alternated with 24 hours of normal feeding. The body weight of the animals was measured weekly during the six weeks of the experimental protocol. At the end, the animals were subjected to behavioral tests to evaluate anxiety-like behavior in the Novel Tank Test (NTT) and social preference in the Social Preference Test (SPT), following euthanasia for morphometric measurements and organ dissection to perform high-resolution respirometry in cardiac and brain tissues. At the end of the six weeks of experimental protocol, fish in the IF24 and IF48 groups showed a significant decrease in body weight and body mass index (BMI) when compared to the fish in the SD group. The IF48 protocol induced a decrease in abdominal length and several respiratory parameters (ETS I, ETS I + II, OXPHOS, ATP-linked respiration and reserve capacity), while the IF24 protocol did not modify the oxygen consumption of cardiac mitochondria. No changes were observed in the oxygen consumption of brain mitochondria of fish subjected to both IF protocols. In the behavioral tests, we did not find a significant difference in the evaluation parameters of anxious-like behavior and in the social preference of the IF48 animals, but we observed a slight effect of decrease in the anxious-like behavior in the animals of the IF24 group, symbolized by a longer exploration time at the top of the environment in the TTN. Taken together, our findings show that the IF24 protocol (alternating 24 hours of fasting and 24 hours of eating) was able to decrease morphometric parameters without impacting cardiac and brain mitochondrial function, while the longer intermittent fasting protocol (IF48) induced mortality. and impacted cardiac mitochondrial function.

Keywords: Intermittent Fasting, obesity, weight loss, mitochondrial function, behaviour, zebrafish.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Jejum Intermitente: conceito e principais benefícios	1
1.2	Jejum Intermitente em modelos animais	3
1.3	<i>Zebrafish</i> como modelo animal de Jejum Intermitente	6
1.4	Efeitos do Jejum Intermitente no metabolismo e na bioenergética mitocondrial do coração	7
2	OBJETIVOS.....	11
2.1	Objetivo Geral	11
2.2	Objetivos Específicos	11
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1	Animais e protocolo experimental	12
3.2	Análises morfométricas	15
3.3	Coleta de tecidos	15
3.4	Respirometria de alta resolução	16
3.4.1	Respirometria de coração inteiro permeabilizado	17
3.4.2	Respirometria de homogenato de encéfalo.....	17
3.5	Experimentos comportamentais	18
3.5.1	Teste do tanque novo	19
3.5.2	Teste de preferência social.....	19
3.6	Análise estatística	21
4	RESULTADOS.....	22
4.1	Impactos do Jejum Intermitente no peso corporal, comprimento abdominal e índice de massa corporal	22
4.2	Efeitos do Jejum Intermitente na sobrevivência dos sujeitos experimentais	24
4.3	Alterações na bioenergética mitocondrial cardíaca em decorrência do Jejum Intermitente.....	24
4.4	Os protocolos de Jejum Intermitente não causaram alterações na bioenergética mitocondrial do encéfalo	26
4.5	Efeitos do Jejum Intermitente sobre a exploração vertical e comportamento tipo-ansioso.....	27
4.6	Os protocolos de Jejum Intermitente não causaram alterações no comportamento tipo-social.....	30
5	DISCUSSÃO.....	31
6	CONCLUSÃO.....	40
	LISTA DE REFERÊNCIAS.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais protocolos de JI estudados na literatura.....	2
Figura 2: Alterações sistêmicas relacionadas com o Jejum Intermitente.....	5
Figura 3: Fluxograma da multidisciplinaridade da Engenharia Biomédica.....	8
Figura 4: Complexos mitocondriais da cadeia transportadora de elétrons.....	9
Figura 5: Esquema representativo do protocolo experimental.....	14
Figura 6: Resumo dos experimentos comportamentais.....	20
Figura 7: Impacto do Jejum Intermitente sobre o peso e BMI.....	23
Figura 8: Curva de sobrevivência dos grupos experimentais.....	24
Figura 9: Efeitos dos protocolos de Jejum Intermitente sobre o metabolismo mitocondrial do tecido cardíaco.....	26
Figura 10: Efeito dos protocolos de Jejum Intermitente na ETS nas mitocôndrias do encéfalo.....	27
Figura 11: Efeitos do Jejum Intermitente sobre o comportamento tipo-ansioso de zebrafish.....	29
Figura 12: Efeitos dos protocolos de JI sobre a preferência social dos <i>zebrafish</i>.....	30

LISTA DE NOMENCLATURAS E ABREVIACÕES

ADF	<i>Alternate day fasting</i>
ADP	Adenosina difosfato
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i> , fator neurotrófico derivado do cérebro
BMI	<i>Body mass index</i> , índice de massa corporal
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albumina sérica bovina
CCCP	Carbonila 3-clorofenil-hidrazona
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
EIM	Espaço inter-membrana
EODF	<i>Every Other day feeding</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETS	<i>Energy transport system</i> , sistema de transporte de energia
FADH₂	Flavina Adenina Dinucleotídeo
IF24	Jejum intermitente 24 horas, grupo tratamento
IF48	Jejum Intermitente 48 horas, grupo tratamento
JI	Jejum Intermitente
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
OMY	Oligomicina
OXPHOS	Estado fosforilante
PKA	Proteína quinase ativada por AMP cíclico
PM	Piruvato e Malato
RAR	Respirometria de alta-resolução
RC	Restrição calórica
ROT	Rotenona
S	Succinato
SD	<i>Standard diet</i> , grupo controle
SOD	Superóxido dismutase
SUIT	<i>Substrates, Uncouplers and Inhibitors</i>
TPS	Teste de preferência social

TRF *Time-restricted feeding*
TTN Teste do tanque novo

1 INTRODUÇÃO

1.1 JEJUM INTERMITENTE: CONCEITO E PRINCIPAIS BENEFÍCIOS

Atualmente diversas abordagens para o tratamento da obesidade são exploradas por profissionais da saúde e pesquisadores. Estas abordagens incluem fármacos inibidores de apetite como a sibutramina, intervenções cirúrgicas como a cirurgia bariátrica, exercícios físicos e estratégias de restrição calórica (RC) (DA SILVA; DOS SANTOS BATISTA, 2021). A Organização Mundial da Saúde (OMS) define sobrepeso e obesidade como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura no tecido adiposo branco que apresenta perigo para a saúde. A obesidade constitui fator de risco para diversas doenças, como doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, câncer e doenças neurodegenerativas (HARGRAVE et al., 2016; SAÚDE, 2021).

As estratégias de RC são frequentemente a primeira estratégia procurada para o tratamento da obesidade, antes mesmo de o indivíduo buscar auxílio profissional. Esse tipo de estratégia, apesar de ser realmente eficaz, pode levar a um sofrimento muito grande em função da mudança de hábitos ou requerer monitoramento minucioso da alimentação ingerida, o que leva a diminuição da adesão e desistência por parte de muitos indivíduos (CERQUEIRA; KOWALTOWSKI, 2013; MALINOWSKI *et al.*, 2019; VARADY *et al.*, 2021).

Desde o início da década de 2000, o Jejum Intermitente (JI) tem chamado atenção tanto da comunidade científica quanto da população em geral, como alternativa a estratégias tradicionais de RC. A denominação Jejum Intermitente é recente, mas a prática remonta milhares de anos atrás, sendo uma prática corriqueira entre diversos grupos religiosos, com destaque para a religião islâmica, cujos adeptos realizam a prática do jejum do nascer ao pôr do sol durante o período do Ramadã (LONGO; MATTSON, 2014). O JI consiste basicamente em alternar períodos de restrição calórica total e períodos de alimentação *ad libitum*, ou seja, sem nenhum tipo de restrição alimentar ou calórica. Desta forma, a restrição calórica é direcionada para um período específico e não para o conteúdo da alimentação em si. Os períodos de jejum e de alimentação variam conforme o protocolo utilizado. Um resumo dos protocolos mais utilizados e mais utilizados em pesquisa científica está mostrado na figura 1. Esses protocolos são: Jejum em dias alternados (*alternate-day fasting*, ADF, também

conhecido como *every other day fasting*, EODF), que consiste em intercalar 24 horas de jejum (ou restrição calórica severa, consumindo no máximo 500 kcal) e 24 horas de alimentação irrestrita, Dieta 5:2, que consiste em realizar jejum de 24 horas em dois dias não consecutivos de uma semana, mantendo a alimentação normal e sem restrições durante os outros dias, e Alimentação tempo-restrita (*time-restricted feeding*, TRF) que consistem em intercalar, dentro de um mesmo dia, 16 a 20 horas de Jejum e 8 a 4 horas de alimentação normal (TINSLEY; LA BOUNTY, 2015; ANTON et al., 2018; DE CABO; MATTSON, 2019; VARADY et al., 2022).

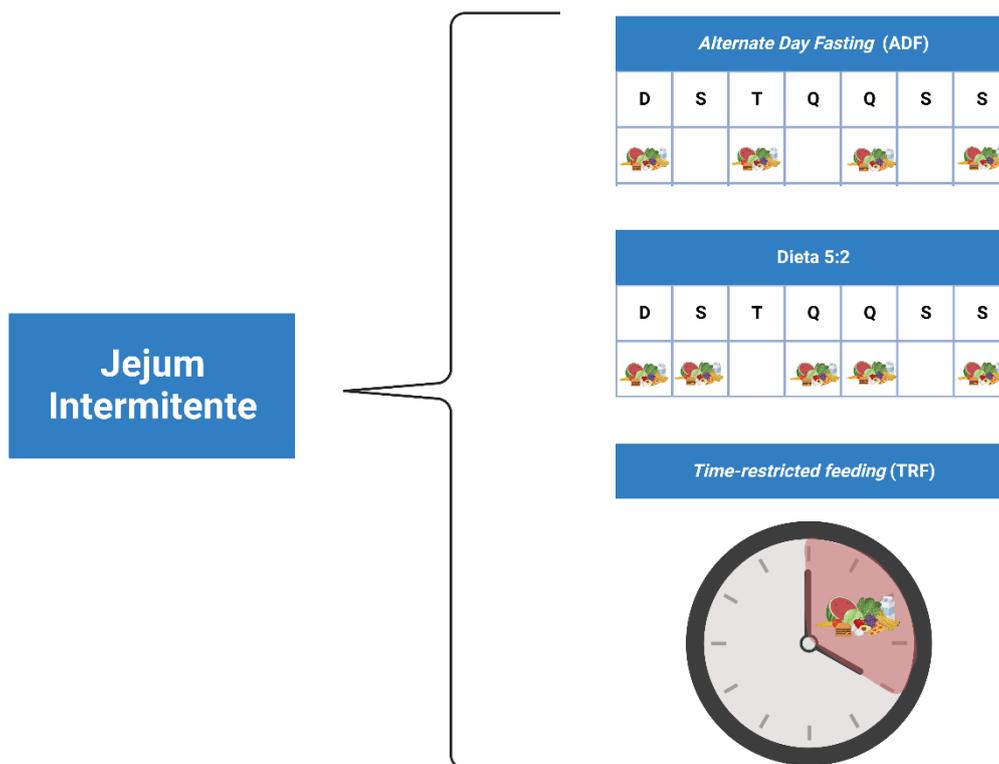


Figura 1: Principais protocolos de JI estudados na literatura. O JI ADF consistem em intercalar dias alternados de alimentação normal e irrestrita com dias e restrição calórica total. A Dieta 5:2 consiste em intercalar, dentro de uma semana, dois dias não consecutivos de restrição calórica total. O JI TRF consiste em ter uma Janela diária de alimentação, seguido por um período de restrição calórica total.

Os efeitos do JI no peso e na composição corporal são extensamente documentados na literatura tanto em humanos (NOWOSAD; SUJKA, 2021; SUTTON *et al.*, 2018) quanto em modelos animais (CHAUSSE *et al.*, 2015; VARADY *et al.*, 2022), e são os efeitos mais procurados pelas pessoas que buscam a intervenção. O JI, particularmente os protocolos ADF e 5:2, está associado com perda de peso maior que 5%, diminuição do índice de massa

corporal (*body mass index*, BMI) e efeitos positivos em diversos parâmetros metabólicos básicos, como diminuição da glicose em jejum, da gordura visceral, triacilgliceróis, e lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoprotein*, LDL) (CHAUSSE et al., 2014; TINSLEY; LA BOUNTY, 2015).

1.2 JEJUM INTERMITENTE EM MODELOS ANIMAIS

A utilização de modelos animais é muito comum em investigações pré-clínicas, a fim de se obter informações que podem ser relacionadas e extrapoladas para os seres humanos. Para realizar a escolha adequada do modelo animal, é importante considerar uma série de fatores como: facilidade para obtenção e manutenção em biotério, características genéticas bem definidas e semelhança fisiológica ou funcional entre a estrutura de interesse no animal e no ser humano (EMINI VESELI *et al.*, 2017). Na literatura atual, os modelos animais mais utilizados para JI e Jejum de uma forma geral são camundongos, em virtude de sua reprodução rápida, fácil manipulação genética, grande variedade de técnicas padronizadas e extenso escopo literário disponível, mas também são utilizados ratos (ELESAWY *et al.*, 2021), coelhos (HARDIANY et al., 2022) e peixes (ARSLAN-ERGUL *et al.*, 2016).

A aplicação de protocolos de JI em modelos animais permitiu a verificação de diversos outros efeitos da intervenção para além do peso e da composição corporal. Um desses efeitos é o aumento da expectativa de vida, que foi relacionado a protocolos de JI em diversos modelos desde a década de 2010, como *Drosophila melanogaster* (CATTERSON *et al.*, 2018), nematódeos (UNO *et al.*, 2013) e murinos (LONGO; MATTSON, 2014; HWANGBO et al., 2020). O JI também está relacionado ao aumento de marcadores de neurogênese, diminuição do estresse oxidativo e de marcadores de inflamação sistêmica (FANN et al., 2014; ELESAWY et al., 2021; WANG et al., 2017).

De forma geral, os benefícios relacionados ao JI estão relacionados sobretudo a dois eixos: Diminuição do estresse oxidativo, através da menor oferta de energia nos períodos de jejum, o que diminui a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que ocorrem durante o metabolismo e do *switch* metabólico para o estado cetogênico, que promove a utilização de ácidos graxos do tecido adiposo e promove a produção e utilização de corpos cetônicos, que são utilizados tanto como fonte de energia como quanto sinalizadores, que estimulam mecanismos de autofagia, de neurogênese e proteção contra estresse oxidativo (DONG *et al.*,

2020; GUDDEN; ARIAS VASQUEZ; BLOEMENDAAL, 2021; MCCARTHY *et al.*, 2021).
A figura 2, adaptada de Longo e Mattson (2014) mostra um resumo de algumas alterações sistêmicas associadas ao JI estudadas com o auxílio de modelos animais, sobretudo murinos.

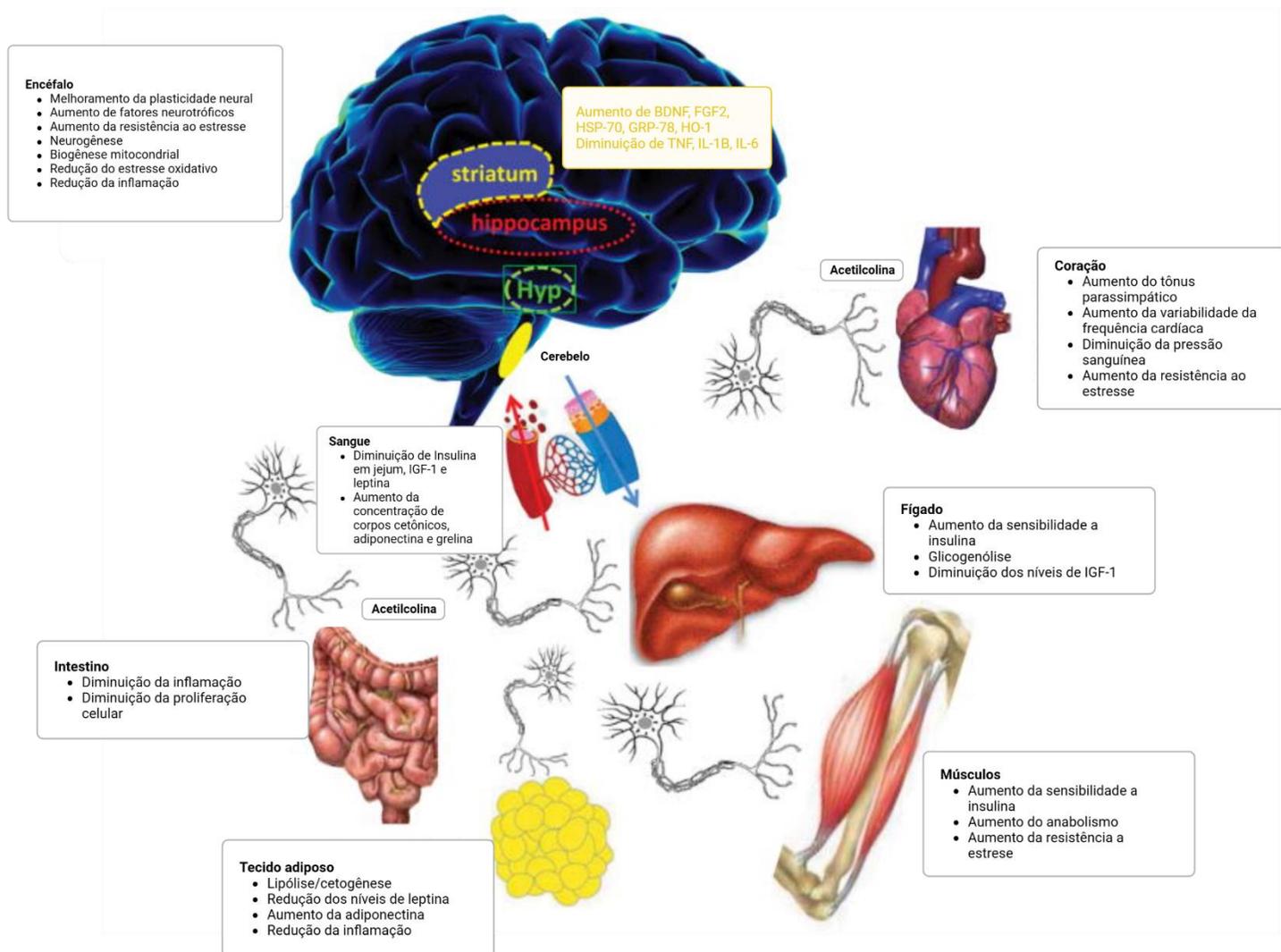


Figura 2: Alterações sistêmicas relacionadas com o Jejum Intermitente. Para além da perda de peso, o JI é capaz de modular o metabolismo sobretudo através da indução ao estado cetogênico, aumentando a lipólise, a glicogenólise e a síntese de corpos cetônicos no fígado. O JI também promove a utilização das reservas de energia nos adipócitos, a diminuição sistêmica de marcadores de inflamação, como TNF e IL-1 β e a diminuição da geração de EROs. Adaptada de Longo e Mattson (2014) com licença de reprodução nº 5566530153477.

1.3 ZEBRAFISH COMO MODELO ANIMAL DE JEJUM INTERMITENTE

O *Zebrafish* (*Danio rerio*) é um peixe de água doce originário do Sudeste Asiático, de pequeno porte, podendo crescer até 5 cm e viver até 5 anos em cativeiro. Sua popularidade como peixe ornamental e seu uso como modelo animal em pesquisa, sobretudo a partir da década de 90 tornaram a espécie popular no mundo todo (STAINIER; FISHMAN, 1994; CHICO; INGHAM; CROSSMAN, 2008). É um modelo animal que apresenta diversas vantagens que o tornam uma excelente alternativa a modelos mais “tradicionais”, como os camundongos. Algumas dessas vantagens são o baixo custo de obtenção de espécimes adultos, baixo custo de manutenção do biotério (em comparação ao custo de manutenção de murinos), reprodução rápida e de alto rendimento (um casal pode produzir até 200 ovos em uma única reprodução), facilidade de manipulação genética e alta homologia com o ser humano (CHICO; INGHAM; CROSSMAN, 2008; GIARDOGLOU; BEIS, 2019).

Nos últimos anos, o *zebrafish* tem se destacado como um modelo para o estudo da obesidade e outras desordens metabólicas, pois este modelo mantém características metabólicas conservadas como o metabolismo de lipídeos e açúcares, fatores regulatórios, fisiologia do trato gastrointestinal e composição da microbiota (FAILLACI *et al.*, 2018; OKA *et al.*, 2010). Em conjunto com as características citadas anteriormente, o *zebrafish* constitui um excelente modelo para análises de alto rendimento e para a busca de potenciais alvos moleculares para o tratamento de obesidade (LI *et al.*, 2023). Em um estudo anterior, nosso grupo de pesquisa foi capaz de estabelecer com sucesso um modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em *zebrafish*, gerando a possibilidade de estudos mais aprofundados sobre a obesidade em nosso laboratório (PICOLO *et al.*, 2021). Ademais, o *zebrafish* também tem se mostrado um modelo promissor para o estudo de intervenções contra a obesidade, sobretudo abordagens não-farmacológicas (SEEBACHER; JAMES, 2019) e intervenções com produtos naturais (MONTALBANO *et al.*, 2021; ZANG *et al.*, 2021).

Apesar de os modelos animais murinos serem a escolha mais comum para o estudo de protocolos de JI e outras formas de RC existem poucos estudos na literatura sobre este tipo de intervenção em *zebrafish*. Lawrence *et al.* (2012) realizou a padronização de um protocolo com o objetivo de estudá-lo como protocolo de alimentação em aquacultura, observando diminuição de peso e do número de ovos viáveis em um grupo EODF em comparação a animais alimentados diariamente uma, três ou cinco vezes. Recentemente, uma série de

trabalhos de um mesmo grupo de pesquisa investigou efeitos mais específicos do JI. Arslan-Egul *et al.* (2016) encontrou uma diminuição significativa de peso após um protocolo de JI tanto em animais novos (8 meses) quanto velhos (26 meses) sem diferenças significativas na proliferação celular no telencéfalo, mas com uma diminuição no comprimento dos telômeros dos animais submetidos a JI ADF. Celebi-Birand *et al.* (2020) observou uma diminuição da glicose corporal após seis semanas de JI ADF, além de um aumento na expressão do fator de transcrição FOXO3m, um marcador de neurogênese. Recentemente, Erbaba *et al.*, (2023) foi capaz de encontrar uma diminuição da expressão do fator de transcrição SOX2, um marcador de crescimento celular relacionado ao desenvolvimento de câncer em células-tronco (MAURO-LIZCANO; SOTGIA; LISANTI, 2022), após 12 semanas utilizando o mesmo protocolo experimental. Todos os resultados apontam para a reprodução dos efeitos de emagrecimento observado em outros modelos, com possíveis efeitos no tempo de vida e na resistência contra o envelhecimento nesses animais, encorajando estudos mais detalhados em outros aspectos metabólicos desses animais em resposta ao JI, de forma a entender melhor os mecanismos subjacentes a essa intervenção.

1.4 EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE NO METABOLISMO E NA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL DO CORAÇÃO

A bioenergética é uma área de estudo que se concentra na produção e conversão de energia nos seres vivos, sendo campo de estudo tanto da bioquímica quanto da Engenharia Biomédica (Figura 3). É um campo de estudos multidisciplinar de grande interesse para a bioengenharia e biotecnologia, uma vez que a compreensão dos modelos mecanísticos bioenergéticos é fundamental para extrapolar o conhecimento sobre o metabolismo dos seres vivos nessas áreas (WEBSTER, 1989).

As mitocôndrias são as organelas responsáveis pelos principais processos bioenergéticos dos organismos eucariotos, onde ocorre a oxidação de substratos provenientes da via glicolítica, e em última análise de nossa alimentação, para a geração de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) através da fosforilação oxidativa (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014; BROWN *et al.*, 2017). Além deste papel fundamental, as mitocôndrias também estão envolvidas em uma miríade de processos metabólicos como a biossíntese de aminoácidos, β -oxidação de ácidos graxos, cetogênese no tecido hepático, termogênese no tecido adiposo

marrom, homeostase de cálcio (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014; KENNEDY; LEHNINGER, 1949; NGUYEN *et al.*, 2019).

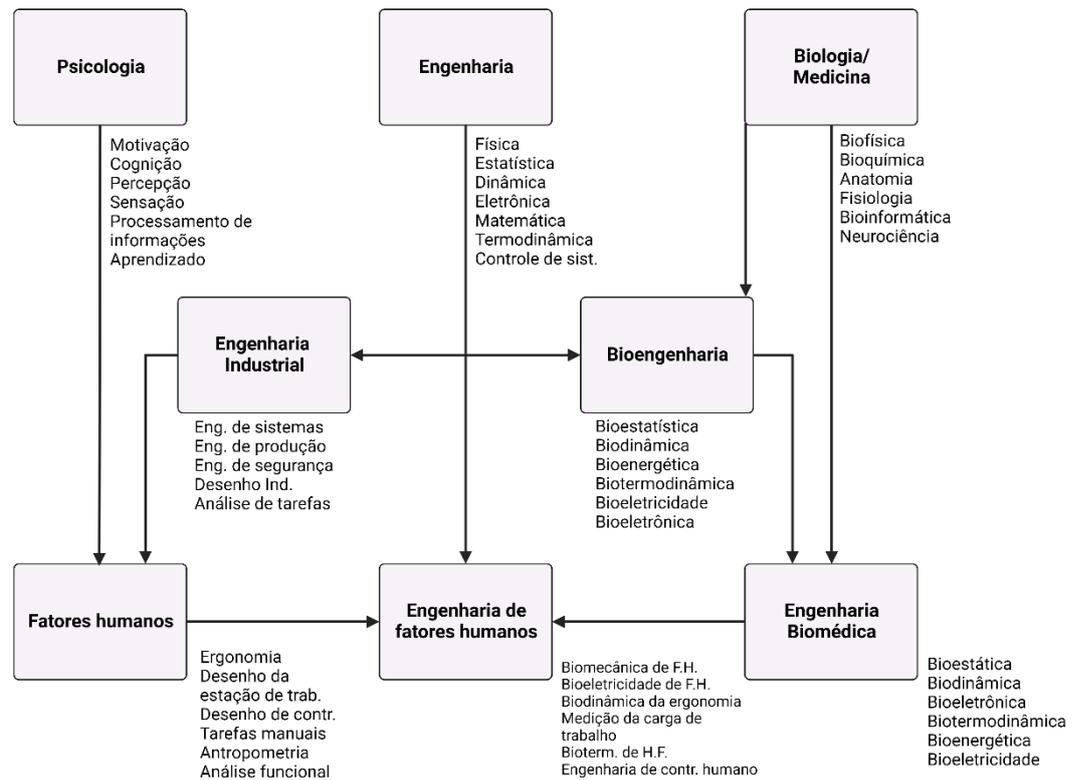


Figura 3: Fluxograma da multidisciplinaridade da Engenharia Biomédica. A bioenergética é classicamente tida como uma importante área de estudo dentro da bioengenharia e engenharia biomédica. Traduzida de Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering (2006) com licença de reprodução nº 5566550829917.

No citoplasma celular, as enzimas envolvidas na via glicolítica realizam a oxidação de moléculas de glicose a piruvato, que entra na matriz mitocondrial, e ao ser associada ao Acil-Coa, derivado de ácidos graxos, gera os transportadores de elétrons Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH) e Flavina Adenina Dinucleotídeo (FADH₂) através do Ciclo do Ácido Tricarboxílico (ou ciclo de *Krebs*), doando elétrons para a cadeia ou sistema de transporte de elétrons (CTE) localizada na membrana interna da mitocôndria, cujo esquema está representado na figura 4 (KENNEDY; LEHNINGER, 1949; LOGAN, 2006; STOCK; LESLIE; WALKER, 1999). Os transportadores de elétrons, ou coenzimas reduzidas, são oxidados nos complexos proteicos I, II, III e IV do ETS, e os elétrons doados são transportados entre os complexos e a ubiquinona, até alcançarem o receptor final, uma molécula de oxigênio (O₂), sendo reduzida à água. Os complexos I, III e IV geram um gradiente de prótons pelo bombeamento de prótons da matriz para o espaço inter-membrana

(EIM) e os prótons retornam para a matriz por meio da ATP sintase (ou complexo V), que conduz a conversão de adenosina difostato (ADP) + fosfato inorgânico (Pi) em ATP, no processo conhecido como fosforilação oxidativa. Essas reações fazem com que o funcionamento do ETS esteja acoplado à oxidação do substrato e à fosforilação do ADP (JASTROCH et al., 2010; MITCHELL, 1975; NAKAE, 1976; STOCK; LESLIE; WALKER, 1999). Como acceptor final dos elétrons utilizados na formação do gradiente eletroquímico, o O₂ possui um papel central na bioenergética mitocondrial. O consumo de O₂ é alterado em resposta a diversos estímulos, como mudanças na alimentação, doenças e fármacos, e pode ser utilizado como parâmetro de avaliação da função e da dinâmica mitocondrial (HÜTTER et al., 2006).

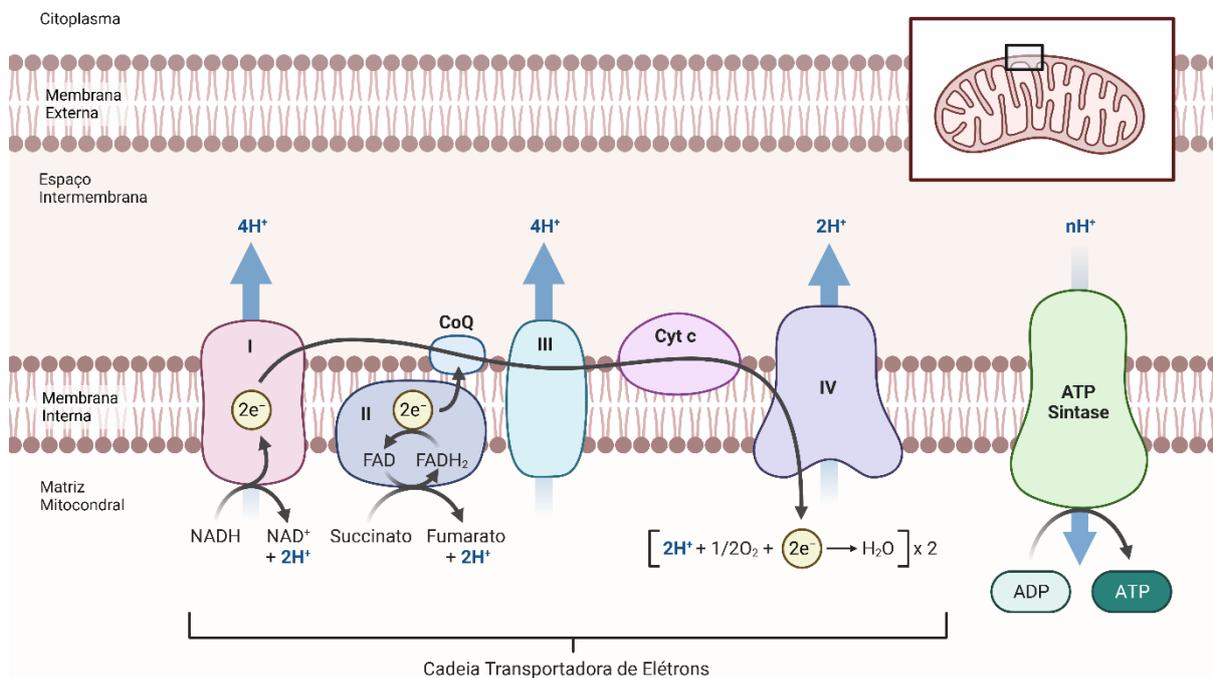


Figura 4: Complexos mitocondriais da cadeia transportadora de elétrons. Os elétrons (e⁻) do NADH e FADH₂ são recebidos pelos complexos I e II e transferidos ao complexo III através da Coenzima Q (Ubiquinona). O Citocromo C realiza a transferência do e⁻ do complexo III para o IV. Este processo é acompanhado pela transferência de prótons (H⁺) nos complexos I, III e IV para o EIM, que por sua vez, retornam para a matriz mitocondrial através da ATP-sintase (ou complexo V). A movimentação deste gradiente de prótons através da ATP-sintase é a origem da força motriz utilizada para a produção de ATP a partir de ADP e Pi. Traduzida dos recursos do BioRender com licença de reprodução nº XJ25HG4M9R

A função mitocondrial no tecido cardíaco é de extrema importância devido à grande demanda energética para os movimentos de contração e relaxamento, chegando a corresponder a um terço do conteúdo celular de cardiomiócitos humanos e de alguns animais (MURPHY et al., 2016; NGUYEN et al., 2019; PIERCE; DHALLA, 1985). A maior parte da demanda energética do coração é suprida pela β -oxidação de ácidos graxos, no entanto o coração é capaz de alternar entre diversos substratos energéticos conforme a disponibilidade (CHEN; SONG; HU, 2019; LOPASCHUK et al., 2010). Por conta desta de sua demanda energética, o coração é sensível a mudanças sistêmicas na disponibilidade de energia, que por sua vez impactam a forma como as mitocôndrias utilizam a energia disponível para a geração de ATP.

Segundo a literatura, os protocolos de JI podem afetar o metabolismo mitocondrial cardíaco de várias formas. Uma delas seria a cardioproteção através de efeitos mais gerais como a diminuição da obesidade, da inflamação e de outros fatores de riscos relacionados (DOTE-MONTERO; SANCHEZ-DELGADO; RAVUSSIN, 2022). Outra forma seria através de modificações na matriz energética mitocondrial, sobretudo através do aumento da concentração de corpos cetônicos como o β -hidroxibutirato, que além de provocarem mudanças no perfil energético são capazes de agir como moléculas sinalizadoras, regulando vias de autofagia e diminuindo o estresse oxidativo através da ativação de proteínas como Sirtuinas e fatores de transcrição da família FOXO, como o FOXO3a e o FOXO3m (ANTON et al., 2018; PETRICK et al., 2020; SHIMAZU et al., 2013). No entanto, existem poucas evidências de modulação direta nos parâmetros bioenergéticos mitocondriais em abordagens experimentais envolvendo JI. Chausse et al. (2015) encontraram uma modulação em parâmetros de respiração de forma tecido-dependente em camundongos, com uma leve diminuição de dano oxidativo no coração e aumento do dano oxidativo no encéfalo.

Em nosso trabalho buscamos estabelecer um protocolo de JI em zebrafish, para realizar o estudo de possíveis alterações desta intervenção na bioenergética mitocondrial cardíaca e encefálica, além de verificar possíveis efeitos no comportamento desses animais. Nossa hipótese é que o zebrafish seria um bom modelo para o estudo de protocolos de JI, como indica a literatura. Além disso, avaliamos como a oferta energética diferenciada proporcionada pelos protocolos de JI pode causar alterações na bioenergética mitocondrial e no comportamento desses animais entendendo, portanto, se tais protocolos são seguros e aplicáveis em estudos posteriores.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um protocolo de JI em *zebrafish* que possibilite investigar os impactos deste protocolo na bioenergética de mitocôndrias cardíacas e encefálicas, bem como no comportamento dos animais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um protocolo viável de JI em *zebrafish* para estudos fisiológicos e comportamentais;
- Investigar os efeitos do protocolo estabelecido sobre o peso e outras medidas morfométricas em *zebrafish*;
- Investigar, através de respirometria de alta resolução, os efeitos do JI no metabolismo mitocondrial do tecido cardíaco inteiro permeabilizado e no homogenato do encéfalo de *zebrafish*;
- Avaliar o efeito do JI em diferentes paradigmas comportamentais em *zebrafish*, tais como comportamento tipo ansioso e tipo social.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Quarenta e nove *Zebrafish* (*Danio rerio*) adultos da linhagem *short-fin* (11-14 meses de idade) foram adquiridos de um fornecedor local (Aquários Maeda, DF, Brasil) e mantidos em ambiente controlado nas dependências do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília, em aquários de vidro de 5 litros (4 – 7 por aquário, 2 peixes/litro, aquário medindo 30 cm de largura, 20 de profundidade e 25 de altura) com água obtida do sistema ZebTEC (TECNIPLAST, Itália) reconstituída de acordo com o protocolo número 203 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2019), com aeração constante, temperatura de 25 ± 2 °C e em ciclo dia/noite de 14 h/10 h (luzes acesas às 8 h). Os peixes foram alimentados com a dieta comercial Tetra Colorbits (Tetra, Alemanha) contendo 47,5% de proteínas, 6,5% de gorduras (4,9 cal/mg) e suplementada com náuplios de Artêmia (*Artemia salina*) 1 a 2 vezes por semana, de acordo com o grupo experimental. As Artêmias são utilizadas como alimentação viva e complemento para a alimentação comercial (LAWRENCE, 2011). A eutanásia dos animais para a realização dos experimentos de bioenergética mitocondrial foi realizada através de resfriamento rápido em água (0 – 4 °C) e decapitação. Para tal, os animais foram removidos de seus aquários originais e rapidamente colocados em água gelada durante 10 minutos, até a parada total do movimento opercular.

Após um período de adaptação de três dias, os animais foram divididos em três grupos experimentais:

1. Dieta padrão (SD, *standard diet*, n = 18): animais alimentados duas vezes ao dia com a dieta comercial (total diário 7,5 mg/animal) e com Artêmia duas vezes por semana, conforme rotina para manejo destes animais (PANNEVIS; EARLE, 1994; PICCOLO et al., 2021);
2. Jejum Intermitente 24 h/24h (IF24, n = 15): animais alimentados em regime de JI ADF, alternando 24 horas com alimentação normal (2 alimentações diárias, total 7,5 mg/animal) e 24 horas de restrição calórica total, recebendo Artêmias uma vez por semana, em uma das janelas de alimentação normal;

3. Jejum Intermitente 24h/48h (IF48, n = 16): animais alimentados em regime de JI ADF modificado, alternando 24 horas de alimentação normal (2 alimentações diárias, total 7,5 mg/animal) e 48 horas de restrição calórica total, recebendo Artêmias uma vez por semana, em uma das janelas de alimentação normal.

Todos os regimes alimentares foram mantidos por seis semanas, após as quais os animais foram submetidos aos experimentos comportamentais e de bioenergética mitocondrial. Todos os indivíduos realizaram as tarefas comportamentais. Após a eutanásia, os animais passaram pela coleta de tecidos para experimentos de bioenergética mitocondrial (9-10 por grupo). O desenho experimental está esquematizado na figura 1. Todos os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IB/UnB (nº 23106.043449/2020-31) e seguiram os padrões estabelecidos no “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” do *National Institutes of Health* (NIH, ANIMALS, 2011).

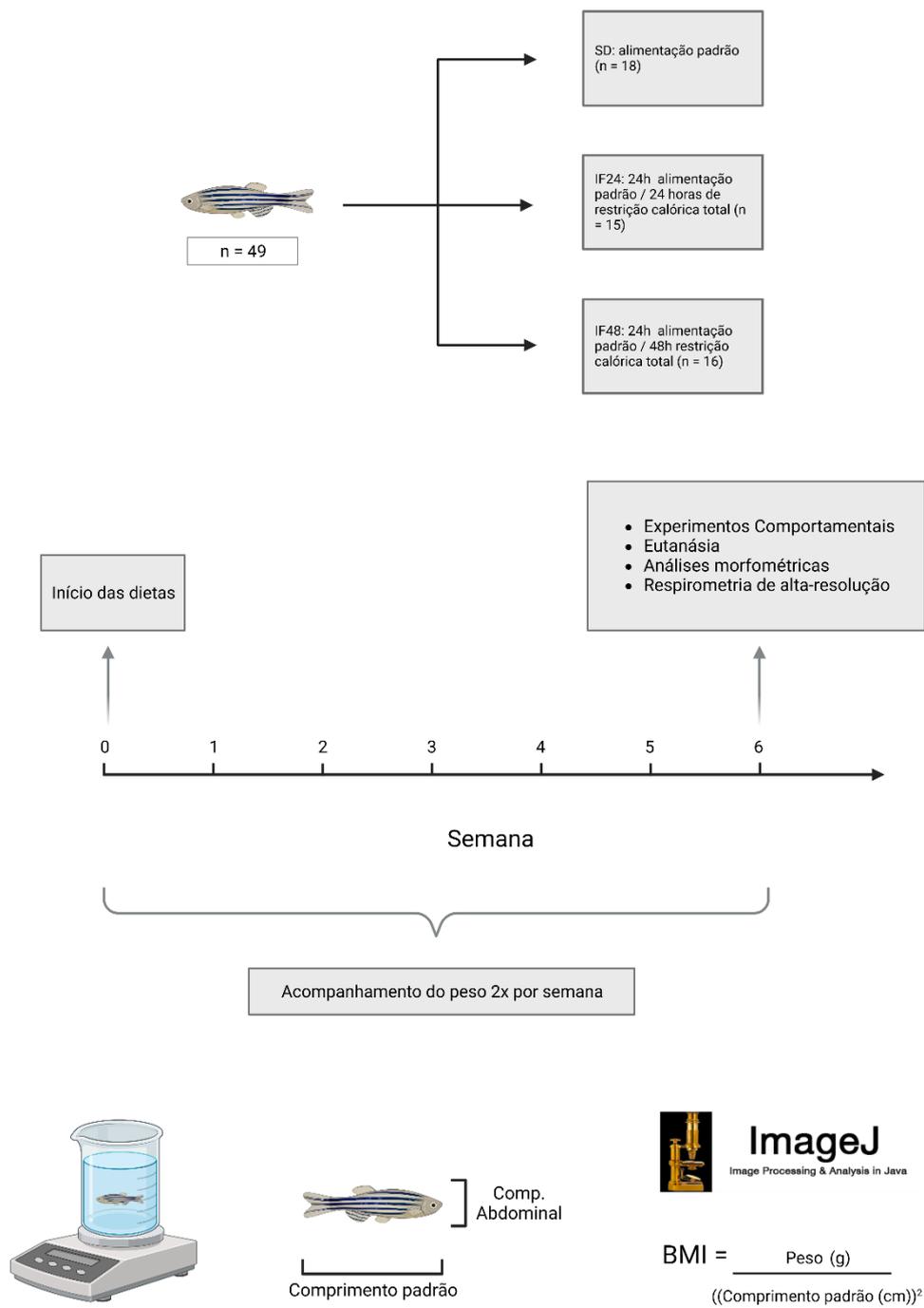


Figura 5: Esquema representativo do protocolo experimental. Quarenta e nove zebrafish adultos foram divididos em três grupos e submetidos a três regimes alimentares diferentes, de alimentação normal, conforme rotina do biotério (SD), JI alternando 24 horas de jejum com 24 horas de alimentação normal (IF24) ou alternando 48 horas de jejum com 24 horas de alimentação normal. Após seis semanas, durante as quais o peso corporal dos animais foi acompanhado semanalmente, os animais foram eutanasiados para realização de medidas morfométricas e dissecação de órgãos para realização de respirometria de alta resolução para medir o consumo de O₂ nos tecidos.

3.2 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

Para estimar os efeitos da alimentação no peso médio de cada grupo, os peixes foram pesados individualmente em balança de precisão. Para a realização da pesagem, os animais foram retirados individualmente e gentilmente secados com auxílio de papel-toalha. Em seguida, eles foram colocados dentro do béquer com água do sistema ZebTEC devidamente tarado, conforme a figura 1, e o peso foi registrado após a estabilização da balança. A pesagem foi realizada no primeiro e no último dia do tratamento, logo após a eutanásia, além de duas vezes por semana ao longo de todo o período de manutenção das dietas.

Após a eutanásia, os animais foram fotografados lateralmente utilizando-se de uma câmera digital (108 MP, Galaxy S20 Ultra, Samsung Company, Seul, Coreia) e um padrão de referência com graduações de 1 em 1 cm. As imagens obtidas foram posteriormente utilizadas para a medição do comprimento padrão e do comprimento abdominal utilizando o *software* ImageJ 1.45 (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). O comprimento padrão é definido como a linha reta da ponta da cabeça até o ponto mais distal da cauda, e o comprimento abdominal é a linha reta que sai do ponto mais baixo da região ventral até o topo da região central (PICOLO *et al.*, 2021). O índice de massa corporal foi calculado pela equação

$$BMI = \frac{\text{Peso (g)}}{(\text{Comprimento padrão (cm)})^2} \quad (1)$$

onde peso e comprimento padrão são aqueles aferidos logo após a eutanásia (OKA *et al.*, 2010b).

3.3 COLETA DE TECIDOS

Após a eutanásia e as análises morfométricas os animais foram dissecados para remoção do encéfalo e do coração para a respirometria de alta resolução (RAR, n = 9 por grupo).

A dissecação do coração foi baseada na metodologia descrita por Gupta e Mullins (2010). Brevemente, o animal foi posicionado na posição dorsal e é feita uma incisão da nadadeira anal até a nadadeira peitoral. Em seguida, o animal foi posicionado na posição lateral e outra incisão é feita, da nadadeira anal para cima até a metade do corpo, e então para o lado até o opérculo. Após esses dois cortes, a pele pôde ser retirada para revelar os órgãos internos. O

coração foi removido cuidadosamente da cavidade corporal após a remoção da membrana que envolve o tecido.

A dissecação do encéfalo foi feita imediatamente após a remoção do coração. Primeiro, o animal foi posicionado dorsalmente. Após isso, a calota craniana foi retirada após dois cortes na altura dos olhos. Após a remoção, o encéfalo foi exposto retirando-se o máximo de tecidos e ossos dos lados, até sua exposição completa, por último os nervos ópticos foram desconectados com o auxílio de tesouras e o encéfalo foi lavado rapidamente em tampão (GUPTA; MULLINS, 2010).

3.4 RESPIROMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO

A RAR é uma técnica através da qual é possível medir indiretamente o consumo de oxigênio promovido pelo metabolismo mitocondrial em uma amostra biológica, usualmente células, tecidos homogeneizados ou mitocôndrias isoladas (HÜTTER *et al.*, 2006). Esta quantificação é realizada através do oxímetro, um aparelho que contém basicamente duas câmaras isoladas, dentro das quais as amostras são posicionadas, equipadas com eletrodos altamente sensíveis, capazes de detectar a mudança de concentração de O₂ no meio interno. Devido à natureza isolada do interior das câmaras, a mudança na concentração de O₂ se deve principalmente ao consumo por parte da amostra, para a sustentação do metabolismo mitocondrial. Após o posicionamento das amostras, uma série de substratos, inibidores e desacopladores do metabolismo mitocondrial são adicionados à amostra, no chamado protocolo SUIIT (*substrates, uncouplers and inhibitors* ;GNAIGER, 2020). Este protocolo tem como objetivo estimular diferentes pontos da cadeia transportadora de elétrons, gerando informações sobre o funcionamento da bioenergética mitocondrial, que por sua vez é extremamente sensível a intervenções externas como doenças, consumo de drogas e consumo de energia na dieta (GNAIGER, 2020).

O consumo de O₂ foi avaliado através da RAR com o auxílio de um oxímetro Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) a 28 °C. As amostras foram posicionadas no oxímetro e em seguida o protocolo SUIIT foi aplicado para avaliar os diferentes estados mitocondriais do sistema de transporte de elétrons (electron transport system, (ETS; GNAIGER, 2020). A ETS relacionada ao complexo 1 foi avaliada utilizando Piruvato e Malato (PM). Em seguida, foi adicionado Succinato para avaliação da ETS

relacionada aos complexos 1 e 2. O estado fosforilante (OXPHOS) foi avaliado após a adição de ADP. O vazamento de prótons foi avaliado através da adição de Oligomicina (OMY), um inibidor da ATP-sintase. A capacidade respiratória máxima foi avaliada em seguida utilizando um protocolo de titulação com cianeto de carbonila 3-clorofenil-hidrazona (CCCP), um desacoplador da cadeia transportadora de elétrons. A respiração ligada a produção de ATP (ATP-linked respiration) é um parâmetro calculado através da equação

$$ATP - linked = Fluxo de O_2 (OXPHOS) - Fluxo de O_2 (vazamento de prótons) \quad (2.1)$$

e a capacidade respiratória de reserva (*Spare capacity*) através da equação

$$Spare capacity = Capacidade máxima - Fluxo de O_2 (OXPHOS) \quad (2.2).$$

3.4.1 Respirometria de coração inteiro permeabilizado

O coração foi dissecado, limpo brevemente em Meio de Reação (MR: sacarose 125 mM, KCl 65 mM, K₂HPO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes 10 mM, EGTA 0,2 mM) e depois imerso em 2 ml de solução contendo Saponina (50 µg/ml) em MR. Em seguida, a solução foi agitada gentilmente com o auxílio de um shaker orbital durante 10 minutos para a permeabilização do órgão. Após 10 minutos, o coração foi transferido para 2 ml de MR e agitado por mais 10 minutos para lavagem da saponina. Finalmente, o coração inteiro permeabilizado foi colocado no oxímetro contendo 2 ml de MR para a avaliação da capacidade respiratória. O protocolo de permeabilização foi adaptado a partir de outros protocolos de oximetria para coração de peixe disponíveis na literatura (KIRBY et al., 2019; MANDIC et al., 2022).

Para avaliar o ETS ligado a diferentes complexos da cadeia transportadora, foram adicionados PM (5 e 2,5 mM), para avaliação da ETS relacionada ao complexo I, e S (15 mM) para avaliação da ETS relacionada ao complexo II. O estado fosforilante (OXPHOS) foi avaliado após adição de adenosina difosfato ADP (500 µM) e o vazamento de prótons foi avaliado através da adição de OMY (0,1 µg/mL). A capacidade respiratória máxima foi avaliada através da titulação com CCCP (concentração final 1-5 µM).

3.4.2 Respirometria de homogenato de encéfalo

Após a dissecação, o cérebro inteiro foi homogeneizado em 200 µL de MR utilizando um homogeneizador tipo *Potter* de 5 ml feito de vidro-teflon. 100 µl desta preparação foram utilizados para a respirometria e posicionados no oxímetro junto com 2 ml do MR e 0,1 % de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (*Bovine serum albumin fat-free*, BSA fat-free).

Em seguida, um conjunto de substratos e inibidores foi adicionado em sequência para avaliação dos diferentes estados do metabolismo mitocondrial.

O ETS foi avaliado após adição de PM (15 mM e 7,5 mM) + S (8 mM). O estado fosforilante foi avaliado após adição de ADP (500 μ M) e o vazamento de prótons após adição de OMY (0,1 μ g/mL). A capacidade máxima da cadeia respiratória foi avaliada após titulação de CCCP (concentração final 1-3 μ M).

3.5 EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS

Os experimentos comportamentais foram realizados em sequência, com o auxílio do aparato experimental mostrado na figura 2a. O aparato experimental consistiu em dois aquários de teste novos, com estrutura e dimensões semelhantes aos aquários utilizados para as dietas, três béqueres de 1 L contendo água do sistema ZebTEC, quatro animais do biotério para o grupo de conspecíficos, um conjunto de seis barreiras brancas removíveis posicionadas nas laterais e na parte de trás do aquário, conforme a figura 2a, que reposicionáveis de acordo com o teste que está sendo realizado, além de dois espelhos posicionados atrás das barreiras, utilizados para a realização do teste de agressividade.

Os animais passaram por um período de aclimação de uma hora na sala de testes antes da realização dos experimentos. Todos os animais foram alimentados antes da realização dos experimentos, para diminuir a influência causada pelo jejum de forma aguda. Os aquários experimentais foram filmados lateralmente e de cima para baixo com o auxílio de webcams posicionadas a aproximadamente 1 metro de distância, para análise posterior utilizando o *software* de análise de vídeo ANY-maze (Stoelting Co., Illinois, Estados Unidos). Este *software* realiza o rastreamento de animais em vídeos de tempo real ou *offline* em arquivos de vídeo gravados, permitindo analisar parâmetros de locomoção, como o cálculo de distância percorrida e velocidade média, bem como de exploração, permitindo dividir o ambiente de teste em zonas virtuais e analisar como o animal se movimenta em relação a estas zonas. Todos os experimentos comportamentais foram realizados entre as 9 da manhã e 3 da tarde. Após o posicionamento para aclimação e durante as gravações, os experimentadores estavam sempre ausentes da sala, para evitar estresse ou o fornecimento de pistas visuais que pudessem gerar algum tipo de preferência, retornando à sala apenas para remover as barreiras durante a mudança de testes e no final, para transportar o animal no início e fim dos testes.

3.5.1 Teste do tanque novo

O Teste do Tanque Novo (TTN) é um paradigma bem estabelecido para o estudo de exploração, locomoção e comportamento tipo-ansioso em *zebrafish* (CACHAT *et al.*, 2010). O teste se baseia na tendência natural destes animais em buscar proteção ao serem inseridos em um novo ambiente, inicialmente mergulhando e ficando próximos ao fundo, mas explorando gradualmente mais próximo da superfície conforme o estresse do ambiente novo passa, sendo um comportamento sensível a estímulos ansiolíticos e ansiogênicos (FONTANA *et al.*, 2019; PICOLO *et al.*, 2021; RIEHL *et al.*, 2011).

Após o período de aclimação, os animais foram posicionados individualmente nos aquários de teste com todas as barreiras brancas posicionadas e imediatamente gravados pela câmera lateral durante 6 minutos com o auxílio do *software* ManyCam (INFORMAÇÕES). Com o auxílio do ANY-maze, o aquário foi dividido virtualmente em duas regiões (superior e inferior), conforme mostrado na figura 2b. A atividade locomotora dos animais foi avaliada por meio da análise da distância percorrida, da velocidade média e máxima e do ângulo absoluto de virada. A exploração e o comportamento tipo-ansioso foram avaliados através da análise do número de entradas na região superior, latência até a primeira entrada na região superior e tempo gasto nadando na área superior (PICOLO *et al.*, 2021; RAYMOND *et al.*, 2012). Foram analisados 5 minutos (300 segundos) de vídeo para gerar os dados do teste. Todos estes dados foram extraídos *offline* com o auxílio do ANY-maze.

3.5.2 Teste de preferência social

O *zebrafish* é um animal altamente social e possui, portanto, uma tendência natural a interagir com seus conspecíficos (GRAHAM; VON KEYSERLINGK; FRANKS, 2018). O Teste de Preferência Social (TPS) é um paradigma largamente utilizado para avaliar o comportamento de sociabilidade nestes animais, que pode ser modulado através de drogas ou estímulos aversivos, da mesma forma que em humanos e roedores (FONTANA *et al.*, 2018; GROSSMAN *et al.*, 2010).

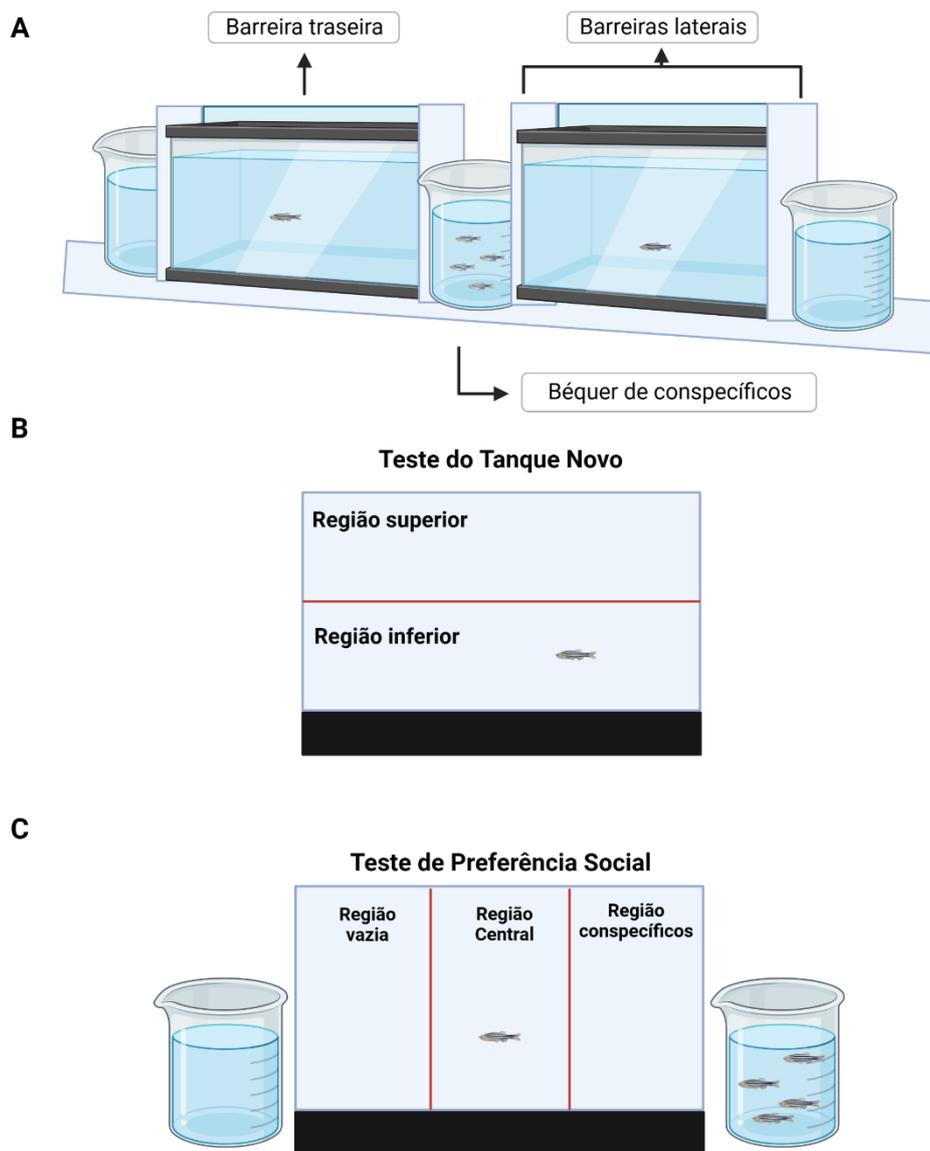


Figura 6: Resumo dos experimentos comportamentais. a) Aparato utilizado para testes b) Teste do Tanque Novo, visão lateral do aquário c) Teste de Preferência Social, visão lateral do aquário.

Imediatamente após o NTT, as barreiras laterais foram removidas do aparato pelos experimentadores, expondo os animais em teste a dois béqueres de 1L exatamente iguais, um em cada lado. Um dos béqueres continha um grupo de quatro *zebrafish*, coletados aleatoriamente do sistema ZebTEC exclusivamente para a participação nesse teste, e o outro béquer permaneceu vazio. Os animais foram então gravados durante mais dois minutos e dez segundos. No ANY-maze, o aquário foi dividido horizontalmente em três regiões: região

vazia (próxima ao béquer vazio), região conspecíficos (próxima ao béquer com os outros *zebrafish*) e região central. Para a avaliação do comportamento tipo-social destes animais, foram avaliados os seguintes parâmetros: tempo gasto na região dos conspecíficos, número de entradas na região dos conspecíficos e duração média de cada visita a essa região (FONTANA *et al.*, 2018; GROSSMAN *et al.*, 2010; PICOLO *et al.*, 2021). Foram analisados dois minutos (120 segundos) de vídeo para a geração dos dados.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média (*standard error of the mean*, SEM) e foram analisados utilizando o *software* GraphPad Prism 9 (GraphPad, California, EUA). Os *outliers* foram detectados através do método de ROUT (Q = 1%) e excluídos em seguida. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi utilizado em todos os grupos após remoção dos *outliers*. As diferenças estatísticas entre as medidas e os diferentes parâmetros da respiração mitocondrial foram analisadas através da análise de variância (ANOVA) de uma via para dados com distribuição paramétrica ou através do teste de Kruskal-Wallis para dados com distribuição não-paramétrica, de acordo com os resultados do teste de normalidade. A ANOVA foi seguida pelo pós-teste de Tukey para comparações múltiplas (pós-teste de Dunn para amostras não-paramétricas). Para verificar o comportamento do peso ao longo do tempo, foi feito um ANOVA de duas vias com o tempo e o tipo de tratamento como variáveis independentes. As curvas de sobrevivência foram comparadas utilizando o teste de Mantel-Cox (Log-rank). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 IMPACTOS DO JEJUM INTERMITENTE NO PESO CORPORAL, COMPRIMENTO ABDOMINAL E ÍNDICE DE MASSA CORPORAL

Os animais foram pesados duas vezes por semana para acompanhar possíveis alterações morfométricas. A figura 2A mostra a evolução do peso corporal de cada grupo experimental durante o estudo. Os animais submetidos aos protocolos de JI (IF24 e IF48) apresentaram uma diminuição significativa de peso a partir da quarta semana (31 dias; Figura 2A). Ao final do protocolo experimental (seis semanas de tratamento) os animais IF24 e IF48 apresentaram uma redução significativa de cerca de 20% no peso corporal (Figura 2B; $604,6 \pm 38,11$ vs. $484 \pm 37,37$ vs. $464,2 \pm 23,28$; $p \leq 0,05$) e no índice de massa corporal (*body mass index* – BMI; figura 2C; $0,037 \pm 0,0017$ vs. $0,031 \pm 0,002$ vs. $0,029 \pm 0,0014$; $p \leq 0,05$). Esses efeitos estiveram igualmente presentes nos dois grupos de JI em relação ao grupo controle (SD), sem diferença significativa entre os dois protocolos de jejum. Apenas o grupo IF48 apresentou uma redução significativa no comprimento abdominal em relação ao grupo SD (Figura 2D, $0,806 \pm 0,03$ vs. $0,696 \pm 0,02$ $p \leq 0,05$). A Figura 2E traz animais representativos dos três grupos.

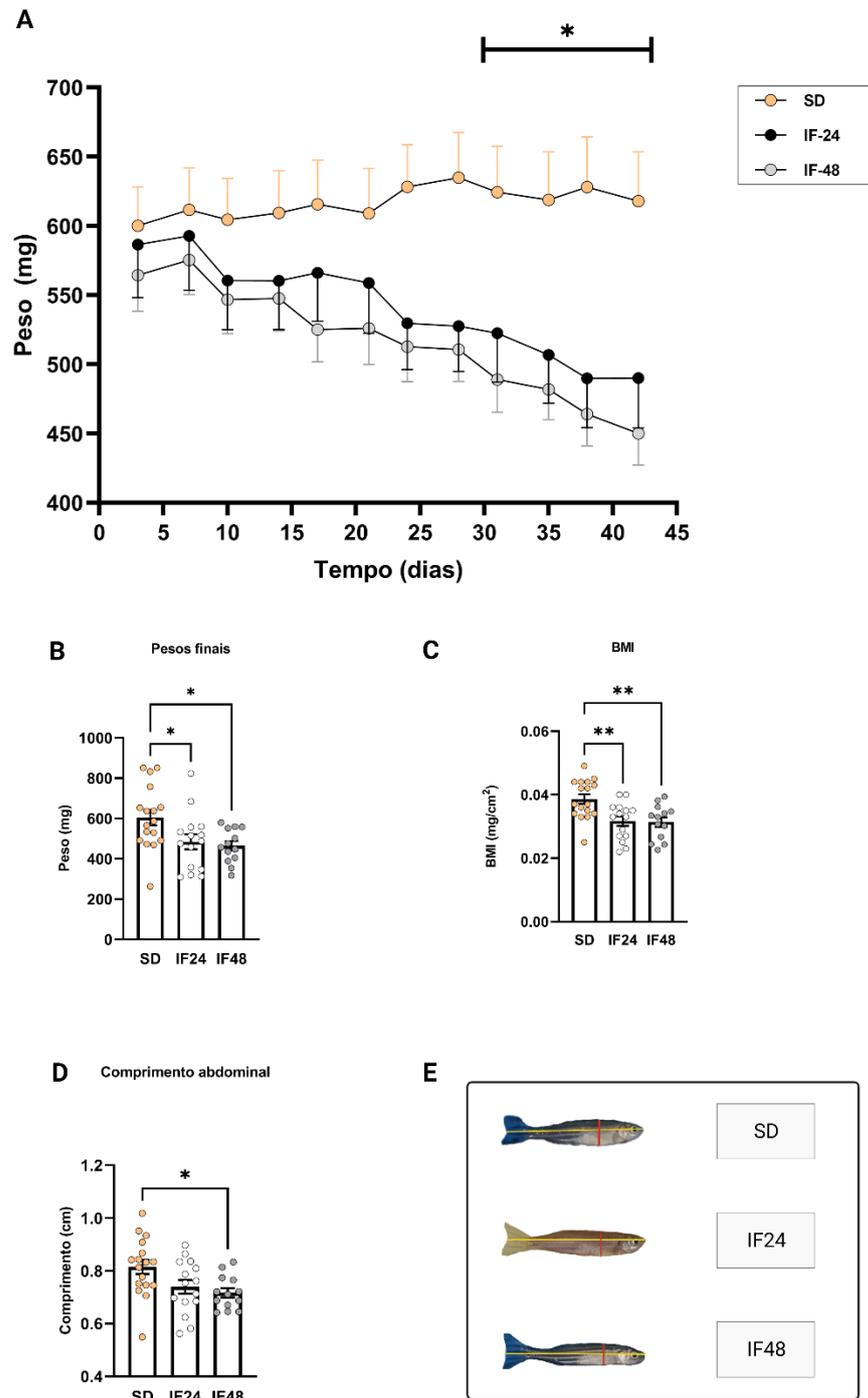


Figura 7: Impacto do Jejum Intermitente sobre o peso e BMI. Seis semanas de Jejum Intermitente promoveram redução no peso corporal (A, B) e no índice de massa corporal (C). Além disso, o protocolo de Jejum Intermitente 24/48 horas apresentou uma diminuição no comprimento abdominal em relação ao controle (D). A figura E mostra animais pertencentes a cada um dos grupos. ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. N = 13-17 animais/grupo.

4.2 EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE NA SOBREVIVÊNCIA DOS SUJEITOS EXPERIMENTAIS

A figura 4 traz as curvas de sobrevivência dos animais de cada grupo. O grupo SD apresentou apenas uma morte de indivíduo, que ocorreu por acidente não relacionado ao protocolo experimental, e que por isso não foi computada na análise de sobrevivência. O grupo IF48 apresentou três mortes não-acidentais, possivelmente causadas pelo protocolo experimental. O grupo IF24 não apresentou perdas. O teste de Mantel-Cox indica que há uma diferença significativa entre as curvas de sobrevivência do grupo IF48 e as demais curvas ($p < 0,05$). Os resultados apontam que a restrição calórica severa imposta pelo protocolo IF48 pode apresentar riscos à sobrevivência dos indivíduos mesmo em curto prazo.

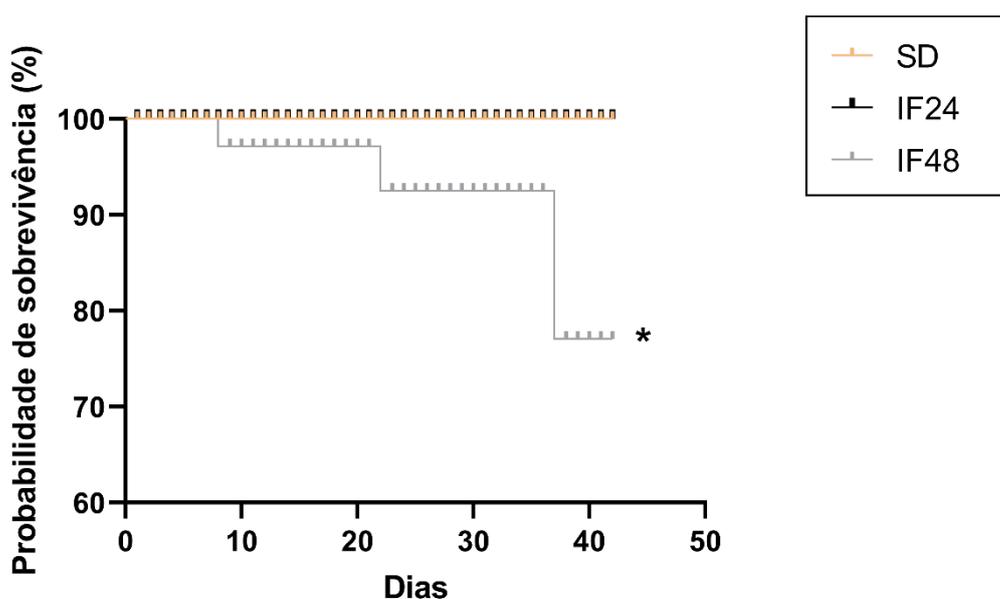


Figura 8: Curva de sobrevivência dos grupos experimentais. Após seis semanas de protocolo experimental, somente o grupo IF48 apresentou mortes não-acidentais. Os resultados indicam que este protocolo pode oferecer risco para os animais mesmo a curto prazo. Foi feito um teste de Mantel-Cox (Log-rank) para realizar a comparação entre as curvas de sobrevivência. $*p < 0,05$, $n = 13 - 17$ animais por grupo.

4.3 ALTERAÇÕES NA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL CARDÍACA EM DECORRÊNCIA DO JEJUM INTERMITENTE

Para avaliar os efeitos do JI sobre o metabolismo mitocondrial cardíaco, submetemos as mitocôndrias do coração inteiro permeabilizado a RAR. O consumo de oxigênio relacionado aos complexos I e II foram avaliados utilizando PM e S, respectivamente. Seis semanas do

protocolo IF24 não promoveram nenhuma alteração nas atividades dos complexos I e II. O protocolo IF48 provocou uma diminuição das atividades de ambos os complexos (Figura 3A e 3B; $p < 0,05$).

Para avaliar o estado fosforilante (OXPHOS), que é o componente da respiração mitocondrial relacionado a capacidade fosforilativa da ETS, foi utilizado ADP saturante. Os resultados mostraram uma redução significativa na OXPHOS após seis semanas do protocolo IF48 em relação ao grupo controle (Figura 3C, $p < 0,05$), enquanto o protocolo IF24 não promoveu nenhuma alteração significativa. Para avaliar a capacidade respiratória máxima da cadeia respiratória foi realizado seu desacoplamento através da titulação com CCCP. Os resultados apontaram uma redução significativa na capacidade máxima do grupo IF48 em relação aos outros dois grupos (Figura 3D, $p < 0,05$).

O consumo de O_2 relacionado à produção de ATP (respiração *ATP-linked*) foi calculado através da equação 2.1. O vazamento de prótons foi obtido através da adição de OMY após o ADP. Apesar da diminuição na OXPHOS observada nos animais IF48, não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos após seis semanas de protocolo experimental (Figura 2E). Para avaliar a capacidade respiratória de reserva, foi utilizada a equação 2.2. A capacidade de reserva dos animais do grupo IF48 foi significativamente menor em relação ao grupo controle e ao grupo IF24, não havendo diferenças significativas entre estes dois grupos (Figura 3F, $p < 0,05$ SD vs. IF48, $p < 0,01$ IF24 vs. IF48).

Em conjunto, os dados apontam uma diminuição da bioenergética mitocondrial cardíaca após seis semanas IF48 em relação ao controle, além de uma diminuição da capacidade de reserva bioenergética desses animais. Seis semanas de um protocolo IF24 horas não provocaram nenhuma alteração significativa na bioenergética mitocondrial cardíaca dos animais.

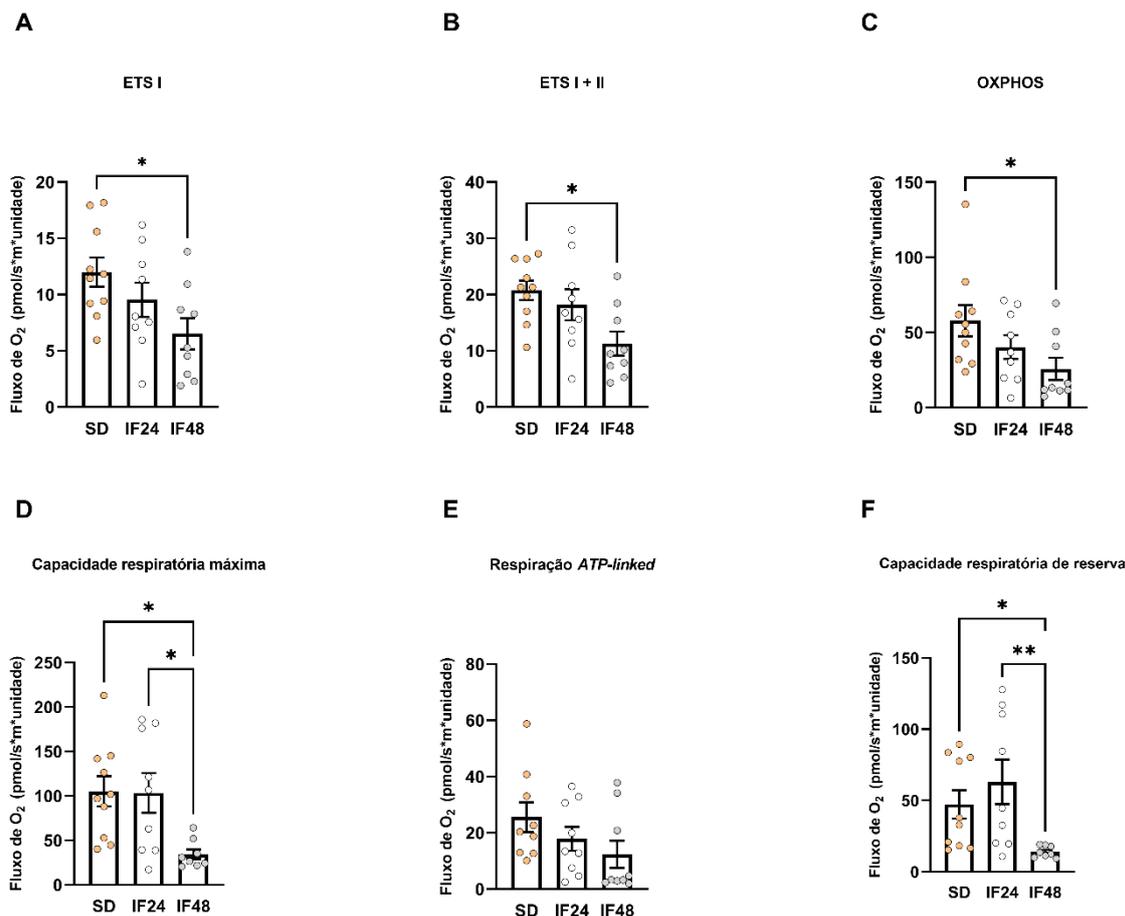


Figura 9: Efeitos dos protocolos de Jejum Intermitente sobre o metabolismo mitocondrial do tecido cardíaco. A RAR foi realizada para avaliar os diferentes estados respiratórios mitocondriais no tecido inteiro (fluxo de O₂ (pmol/s) / unidade de coração): ETS I (PM), ETS I + II (S), OXPPOS (ADP) e capacidade respiratória máxima (CCCP). Seis semanas de protocolo experimental provocaram uma diminuição da ETS I (A), ETS I + II (B), OXPPOS (C) e capacidade respiratória máxima (D) dos animais IF48 em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa na capacidade respiratória ligada à síntese de ATP (*ATP-linked*, E). Houve uma diminuição significativa na capacidade respiratória de reserva dos animais IF48 em relação aos grupos SD e IF24, sem diferenças significativas entre os dois últimos grupos. ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. N = 9-10 animais/grupo.

4.4 OS PROTOCOLOS DE JEJUM INTERMITENTE NÃO CAUSARAM ALTERAÇÕES NA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL DO ENCÉFALO

A figura 4 traz os dados obtidos após os experimentos de bioenergética mitocondrial no encéfalo dos animais. Os protocolos experimentais utilizados não exerceram alterações significativas sobre a respiração mitocondrial relacionada a substratos do complexo I e II (Figuras 4A e 4B, $p = 0,97$ e $p = 0,62$, respectivamente), tampouco modificaram a OXPPOS (Figura 4C, $p = 0,97$). A capacidade respiratória máxima (Figura 4D, $p = 0,84$), a respiração

ATP-linked (Figura 4E, $p = 0,93$) e capacidade respiratória de reserva (Figura 4E, $p = 0,46$) também não foram afetadas pelos protocolos. Os resultados apontam que a bioenergética mitocondrial do encéfalo não é alterada após seis semanas de JI, independente do protocolo utilizado.

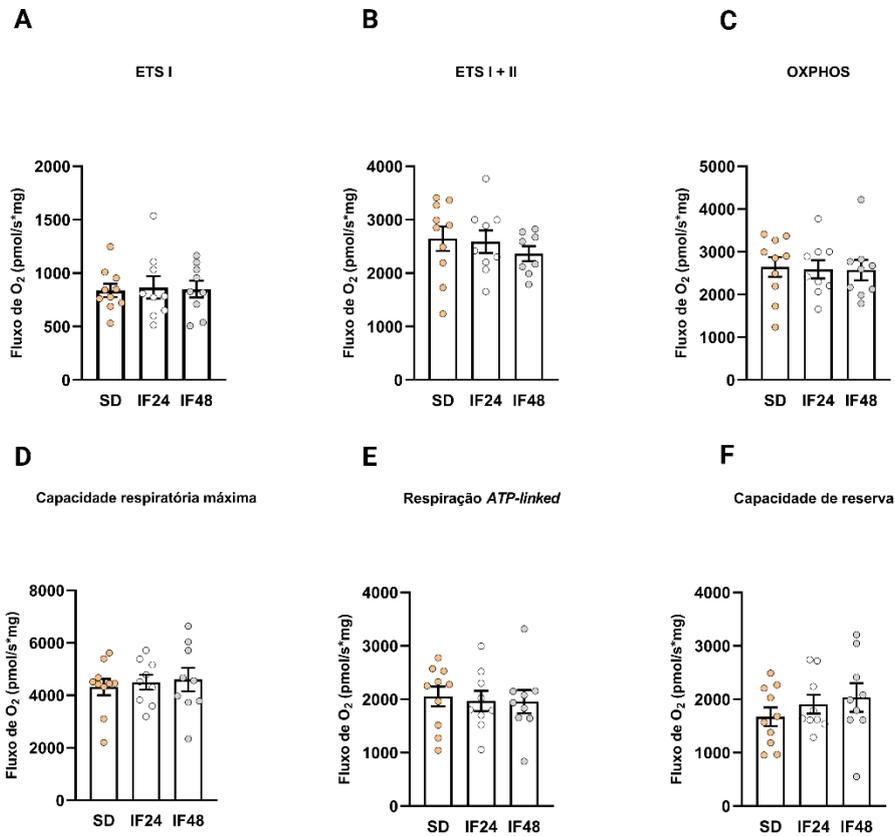


Figura 10: Efeito dos protocolos de Jejum Intermitente na ETS nas mitocôndrias do encéfalo. A RAR foi realizada para avaliar os estados respiratórios mitocondriais (Fluxo de O₂ (pmol/s) / mg de proteína da amostra). Seis semanas de JI, sem distinção de protocolo utilizado, não promoveram alterações na ETS I (A), ETS I + II (B), OXPHOS (C), capacidade respiratória máxima (D), respiração ligada à síntese de ATP (E) e na capacidade respiratória de reserva (F). ANOVA de uma via seguido por pós-teste de Tukey. N = 9-10 animais/grupo.

4.5 EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE SOBRE A EXPLORAÇÃO VERTICAL E COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO

Para realizar a avaliação da exploração vertical e comportamento tipo-social, foi utilizado o Teste do Tanque Novo, cujos resultados são mostrados na figura 6. Os protocolos de Jejum não exerceram influência significativa sobre a distância percorrida (Figura 6A, $p =$

0,71), velocidade máxima (Figura 6B, $p = 0,25$) e ângulo absoluto de virada (Figura 6C, $p = 0,38$), parâmetros usados para a avaliação da exploração vertical.

Apesar de nenhum dos protocolos de JI ter exercido influência significativa sobre o número de transições para a região superior (Figura 6E, $p = 0,07$) e na latência até a primeira entrada na região superior (Figura 6F, $p = 0,16$), o protocolo IF24 promoveu um maior tempo de exploração nesta região em relação ao grupo controle (Figura 6D, $p < 0,05$). O protocolo IF48, por outro lado, não promoveu alterações no tempo de exploração.

As figuras 6G e 6H mostram o tempo gasto na região superior e o número de entradas na região superior ao longo dos 300 segundos de teste. Apesar da diferença significativa na exploração no tempo superior promovida pelo protocolo IF24, a análise de ambas as curvas por ANOVA de duas vias mostra uma grande variação entre os sujeitos experimentais dentro do experimento. Em ambos os testes, os sujeitos experimentais são responsáveis por mais de 40% da variação de resultados (45% para o tempo na região superior e 41% para o número de entradas). A figura 6I mostra os traçados representativos da exploração de animais de cada um dos grupos ao longo do teste. De forma geral, os resultados indicam uma possível diminuição no comportamento tipo-ansioso dos animais IF24 em relação ao controle, no entanto, a grande variação entre indivíduos também parece estar influenciando os resultados observados.

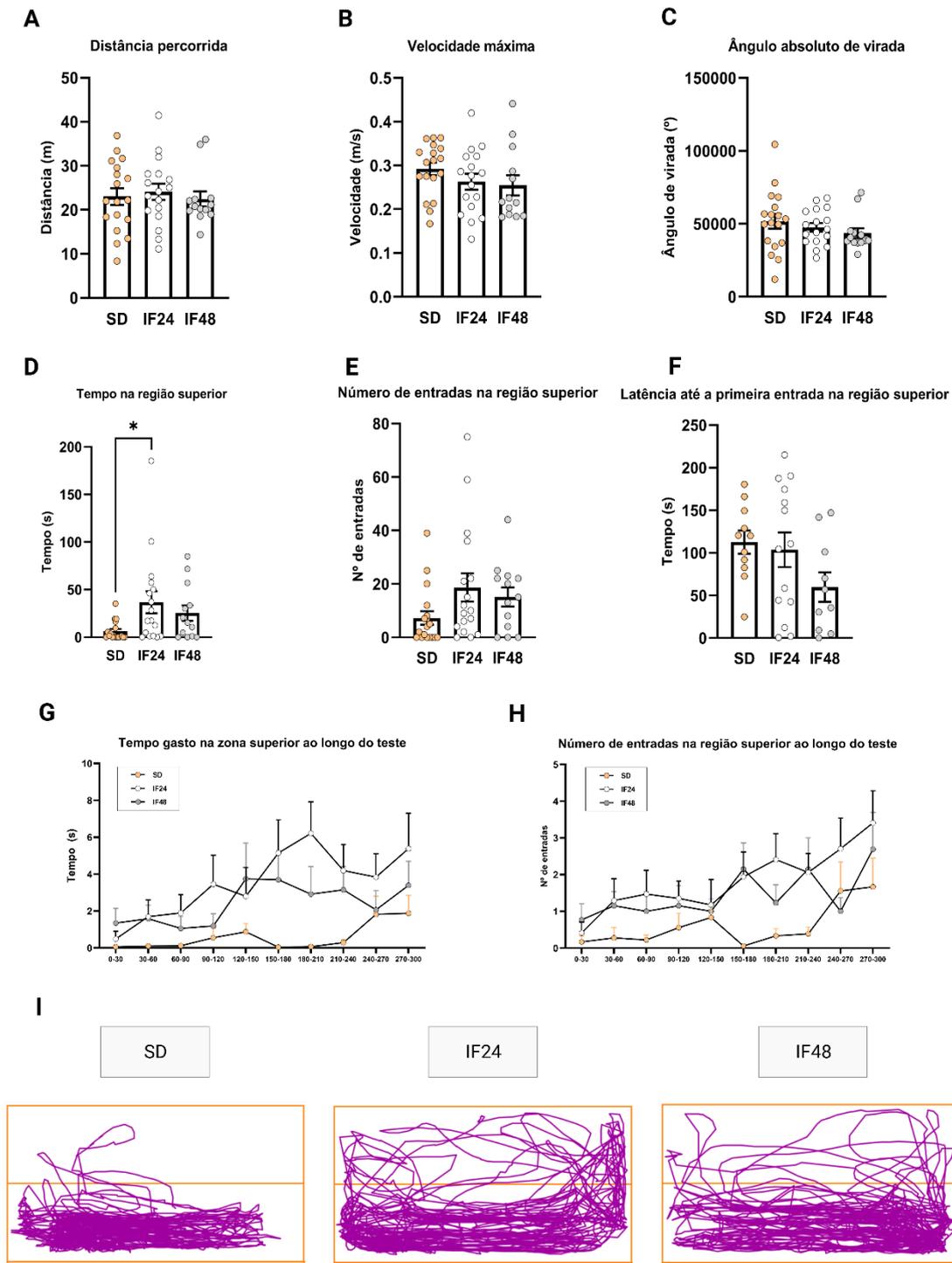


Figura 11: Efeitos do Jejum Intermitente sobre o comportamento tipo-ansioso de zebrafish. O comportamento tipo-ansioso foi acessado através do Teste do Tanque Novo. Os parâmetros relacionados a locomoção e exploração foram todos similares entre os grupos, e estão mostrados nas figuras: Distância percorrida (A), Velocidade máxima (B) e Ângulo absoluto de virada (C). O protocolo IF24 provocou um aumento significativo no tempo de exploração da parte superior (D), o que não foi observado no protocolo IF48. Não houve alterações significativas no número de entradas na região superior (E) e na latência até a primeira entrada na região superior (F). As figuras (G) e (H) mostram a análise temporal do tempo de exploração na parte superior e no número de entradas na região superior. Os traçados representativos da exploração dos animais estão mostrados na figura (I). ANOVA de duas vias para as análises temporais, ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey para amostras paramétricas ou teste de Kruskal Wallis seguindo de pós-teste de Dunn para amostras não-paramétricas, $* < 0,05$, $n = 13-18$ animais/grupo.

4.6 OS PROTOCOLOS DE JEJUM INTERMITENTE NÃO CAUSARAM ALTERAÇÕES NO COMPORTAMENTO TIPO-SOCIAL

O comportamento tipo-social dos animais foi avaliado através do Teste de Preferência Social, logo após a realização do TTN. Os resultados estão resumidos na figura 7. Os protocolos experimentais não influenciaram de forma significativa o tempo que os animais passaram nadando na área mais próxima aos conspecíficos ($p = 0,432$, Figura 7A), o número de transições para a área mais próxima aos conspecíficos ($p = 0,856$, Figura 7B) e a duração média de cada entrada na área dos conspecíficos ($p = 0,552$, Figura 7C). De forma geral, esses resultados indicam que o JI não altera a preferência social dos *zebrafish*, independente do protocolo utilizado.

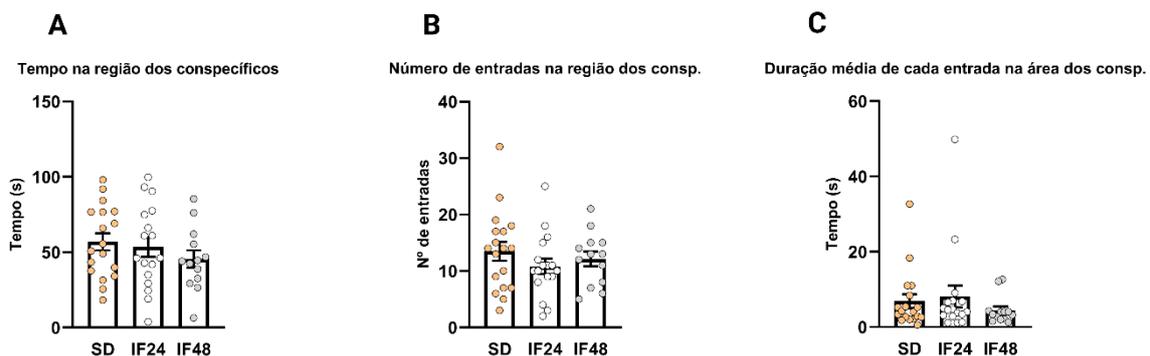


Figura 12: Efeitos dos protocolos de JI sobre a preferência social dos *zebrafish*. Nenhum dos tratamentos exerceu efeito significativo sobre os parâmetros de comportamento tipo-social: Tempo na região dos conspecíficos (A), número de entradas na região dos conspecíficos (B) e duração média de cada visita na área dos conspecíficos (C). ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey, N = 13 – 18 animais/grupo

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, buscamos estabelecer dois protocolos de JI em zebrafish: o primeiro (IF24) é uma reprodução do JI ADF, um dos protocolos mais utilizados na literatura (VARADY *et al.*, 2022) e o segundo (IF48) é uma versão modificada deste, mantendo o tempo de alimentação normal, mas dobrando o tempo de restrição calórica total. Observamos uma redução significativa no peso e no BMI dos animais, de aproximadamente 20%, ao final do tratamento, em ambos os grupos experimentais (IF24 e IF48). De forma interessante, o prolongamento do tempo de jejum no grupo IF48 não causou incremento na perda de peso dos animais, mas induziu uma redução significativa no comprimento abdominal, utilizado como indicativo do grau de adiposidade (PICOLO *et al.*, 2021). Essas observações corroboram com o conhecimento descrito na literatura atual sobre o JI (CHAUSSE *et al.*, 2014; CELEBI-BIRAND *et al.*, 2020; HENDERSON *et al.*, 2023) e fortalecem o estabelecimento de um protocolo de JI ADF nos animais do grupo IF24. Apenas o grupo IF48 apresentou mortes não-acidentais ao longo do protocolo experimental, evidenciando um possível risco associado a essa modificação. Além disso, investigamos possíveis alterações no metabolismo energético mitocondrial através da medição do consumo O₂ via RAR no tecido cardíaco inteiro permeabilizado e no homogenato de encéfalo. Ambos os protocolos de JI não causaram alterações no metabolismo mitocondrial do encéfalo. Por outro lado, alterações significativas no metabolismo energético cardíaco foram observadas após 6 semanas de protocolo de IF48, enquanto o protocolo de IF24 não modificou nenhum dos parâmetros bioenergéticos avaliados. Por fim, investigamos possíveis efeitos comportamentais associados às intervenções utilizadas. O grupo IF24 apresentou uma diferença significativa em um dos parâmetros utilizados para avaliar o comportamento tipo-ansioso em relação ao grupo controle, o que não foi observado no grupo IF48. No entanto, houve uma grande discrepância de resultados entre indivíduos dentro de um mesmo grupo, indicando possível estresse não relacionado com os protocolos experimentais que podem limitar a extrapolação dos resultados. Não encontramos alterações na preferência social de nenhum dos grupos tratados em relação ao controle.

As mortes observadas no grupo IF48 podem ser atribuídas a uma plethora de causas. Grupos de *zebrafish* estabelecem rapidamente uma hierarquia e naturalmente alguns animais

dentro de um cardume se alimentam mais do que os outros (MILN; WARD; SEEBACHER, 2021). É possível que a restrição calórica severa do protocolo IF48 tenha acentuado este comportamento. Seria necessário realizar um acompanhamento mais detalhado desses animais durante o protocolo experimental e principalmente durante a alimentação para investigar esta possibilidade. Entretanto, muitas perdas registradas em um protocolo de duração relativamente curta levantam dúvidas sobre a viabilidade desta modificação do protocolo de Jejum ADF.

Doenças cardiovasculares são uma das principais comorbidades associadas à obesidade a longo prazo (SAÚDE, 2021), por isso é muito importante investigar possíveis efeitos cardiometabólicos quando se estuda intervenções cujo propósito é justamente combater a obesidade. Tanto o JI quanto outros protocolos de RC exortam efeitos positivos sobre a saúde cardiovascular, mesmo em indivíduos saudáveis. A aplicação de protocolos de JI em humanos obesos e modelos murinos de obesidade demonstraram um efeito positivo contra a arteriosclerose, através do aumento da expressão de adiponectinas e diminuição do LDL circulante (BHUTANI et al., 2010; WAN et al., 2010; ACHARI; JAIN, 2017). Também há evidências na literatura de modulação na pressão arterial e na variabilidade cardíaca em modelos murinos saudáveis pelo JI, sendo associado a uma diminuição da pressão arterial após algumas semanas da aplicação do protocolo. Mager et al. (2006) atribuem estes efeitos à modulação do sistema nervoso parassimpático por parte do JI, enquanto Camelo et al. (2019) discutem a possibilidade de modulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona como contribuição importante para mudanças na pressão arterial observada em protocolos de JI. Tendo em vista que a função de mitocôndrias cardíacas é afetada por alterações renais, cardíacas e vasculares que leva a hipertensão (EIRIN; LERMAN; LERMAN, 2018), parece razoável que o JI, que é capaz de reverter estas disfunções, também gere impacto sobre a bioenergética cardíaca

O JI também tem sido pesquisado como uma promissora estratégia terapêutica para algumas desordens cardiovasculares. Kazmirczak et al. (2023) demonstraram em um estudo recente que o JI promove mudanças na composição lipídica do ventrículo direito de um modelo animal de hipertensão pulmonar em ratos, a saber eles encontraram diminuição de triacilgliceróis e aumento dos ácidos graxos livres, além de um aumento na expressão de proteínas relacionadas com a β -oxidação de ácidos graxos. Além disso, os autores também encontraram indicativos de reorganização na rede de microtúbulos do ventrículo direito,

possivelmente associada com o aumento da atividade da proteína quinase ativada por AMP (PKA) no ventrículo direito desses animais, o que pode contribuir para a melhora da função cardíaca. Xu et al. (2022) encontrou resultados semelhantes em relação a diminuição de triacilgliceróis e aumento do LDL, mas em camundongos submetidos a obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Os autores também demonstraram uma diminuição na expressão de proteínas relacionadas à apoptose e a fibrose cardíaca, possivelmente provocados pela diminuição da metilação tipo m6a no mRNA mensageiro. O aumento neste tipo de metilação está intimamente relacionado com a obesidade e o consumo de dietas hiperlipídicas (AZZAM; ALSAFAR; SAJINI, 2022).

Em nosso estudo, não encontramos nenhuma diferença significativa no consumo de O₂ mitocondrial do tecido cardíaco nos animais IF24 em relação ao controle. Nossos resultados são semelhantes aos encontrados por Chausse et al. (2015) em mitocôndrias isoladas do tecido cardíaco de ratos. A perda de peso e de BMI sem alterações no metabolismo mitocondrial fortalece as evidências de que o JI ADF é uma intervenção segura para promover o emagrecimento. O grupo IF48, por outro lado, apresentou uma diminuição em todos os estados da respiração mitocondrial avaliados, exceto a respiração *ATP-linked*. A respiração *ATP-linked* é o componente da OXPHOS que está diretamente relacionado com a atividade da ATP-sintase, portanto, isso indica que apesar de uma diminuição geral da eficiência bioenergética das mitocôndrias dos animais IF48, a produção de energia continua sendo suficiente para suprir a demanda de ATP do órgão.

Deve-se notar, no entanto, que tanto a capacidade respiratória máxima quanto a capacidade de reserva respiratória desses animais estão diminuídas, o que pode gerar consequências negativas para o animal caso a demanda por ATP aumente por algum motivo, como aquela evocada por uma resposta de luta-ou-fuga causada pela presença de um predador no mesmo ambiente. A capacidade de reserva respiratória se correlaciona com o grau de plasticidade mitocondrial, permitindo adaptabilidade bioenergética em resposta a condições de estresse (KUNZ, 2003). Uma vez que a diminuição da capacidade de reserva respiratória tem sido associada a várias doenças cardiovasculares e neurológicas (MARCHETTI *et al.*, 2020), o resultado observado no grupo IF48 pode estar relacionada à disfunção mitocondrial neste grupo. Além disso, uma menor eficiência da OXPHOS também está relacionada com o maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e insuficiência cardíaca (ZHOU; TIAN, 2018).

Em conjunto, os dados indicam que a restrição calórica severa a qual os animais IF48 foram submetidas pode ter induzido uma disfunção cardíaca ou dano ao tecido, gerando perda de massa mitocondrial. No entanto, mais estudos ainda são necessários para avaliação da integridade do tecido cardíaco de modo a explorar essa hipótese. De qualquer forma, os dados bioenergéticos em conjunto com os de sobrevivência, indicam que o JI IF48 pode trazer riscos para os animais, não sendo indicado para aplicação em protocolos de longa duração. É possível realizar uma caracterização mais completa desta adaptação, entretanto, o protocolo padrão utilizado no grupo IF24 parece ser a melhor abordagem para a utilização em estudos futuros sobre JI em *zebrafish*, sobretudo se o interesse for em aplicá-lo como estratégia de intervenção para a obesidade. Ademais, o fato de não termos encontrado alterações na bioenergética mitocondrial cardíaca do grupo IF24 não significa que o metabolismo mitocondrial desses animais não esteja sendo modulado de alguma forma pela intervenção, por isso são necessários estudos posteriores para realizar uma caracterização mais detalhada do metabolismo mitocondrial em resposta a essa estratégia.

O cérebro é um dos tecidos mais explorados nos estudos sobre os efeitos do JI. De fato, a literatura aponta uma série de efeitos metabólicos promovidos pelo JI que possuem impacto positivo nesse tecido. Entre os efeitos, destacam-se o aumento da expressão de proteínas que atuam contra o estresse oxidativo (e.g. catalase, superóxido desmutase; SOD), possivelmente através de vias ativadas pelo fator de transcrição FOXO3a (TAN et al., 2008; SHIMAZU et al., 2013; FASANO et al., 2019), e a promoção da neurogênese e proteção contra danos neuronais através do aumento da expressão de BDNF (BAIK *et al.*, 2020; SEIDLER; BARROW, 2022). Além disso, o JI tem sido estudado como uma possível intervenção não farmacológica em várias desordens neurológicas, como a doença de Alzheimer e a epilepsia (GUDDEN; ARIAS VASQUEZ; BLOEMENDAAL, 2021; LIU *et al.*, 2019).

No entanto, existem poucos estudos que se debruçaram a entender o impacto direto do JI no metabolismo mitocondrial e no ETS. Chausse et al., (2015) não encontraram diferença significativa no consumo de O₂ em mitocôndrias isoladas do cérebro inteiro e do coração de ratos, mas encontrou um aumento na OXPHOS em mitocôndrias isoladas de fígado após seis semanas de um protocolo de JI ADF. Interessantemente, os autores também não observaram mudanças na geração de EROs, indo de encontro com as evidências de diminuição de estresse oxidativo (SHIMAZU *et al.*, 2013). Carteri et al. (2021) também não encontrou mudanças significativas na respiração mitocondrial de mitocôndrias isoladas de córtex

cerebral de camundongos após 20 dias utilizando o mesmo protocolo, mas encontrou uma diminuição significativa no comportamento tipo ansioso desses animais.

No presente estudo, não encontramos diferenças significativas no consumo de O₂ no homogenato de mitocôndrias do encéfalo inteiro de zebrafish, reproduzido os resultados observados em roedores. Isso não quer dizer necessariamente que o metabolismo mitocondrial desses animais não esteja sendo afetado de outras formas, como já citado anteriormente, o que abre margem para investigação futura. O fato de o grupo IF48 também não ter apresentado alterações no metabolismo energético encefálico é especialmente interessante, pois apesar da privação de alimento por um longo período não houve uma diminuição da respiração mitocondrial como ocorreu no coração, demonstrando o controle homeostático para manter o funcionamento pleno do metabolismo encefálico em situações de estresse.

Um ponto que deve ser mencionado em relação a esse resultado é nossa limitação experimental em avaliar o consumo de oxigênio de regiões individualizadas do encéfalo, já que por limitações de amostra avaliamos o encéfalo inteiro nos experimentos de avaliação do metabolismo mitocondrial. Tal abordagem permite que sejam detectadas alterações metabólicas que afetam o encéfalo como um todo, mas limitam a observação de efeitos em áreas específicas. É possível que o efeito do JI em áreas específicas do cérebro tenha se perdido quando foram misturadas mitocôndrias do encéfalo total. Apesar de o zebrafish possuir um cérebro de estrutura menos complexa que o de humanos ou roedores, ele possui estruturas que cumprem funções homólogas a de estruturas desses animais, como o *pallium* médio-lateral, que exerce uma função tipo-hipocampo, e o *pallium* dorsal, que exerce funções tipo-córtex (CHENG; JESUTHASAN; PENNEY, 2014; GERLAI et al., 2020). De fato, o sistema nervoso do zebrafish é composto de áreas bem definidas (SHENOY et al., 2022) e que podem, ainda que com algum trabalho e muita prática, serem isolados para estudos futuros mais específicos. O estudo de possíveis alterações em áreas específicas é encorajado pelas evidências de alterações região-específicas causadas por dietas hiperlipídicas ou ricas em carboidratos (CAVALIERE et al., 2019; CRESCENZO et al., 2019) cujo consumo promove obesidade. Resta para ser investigado no futuro tanto possíveis alterações área-específicas no metabolismo mitocondrial relacionadas à aplicação de protocolos de JI, quanto se essas mudanças são capazes de compensar de alguma forma pelas mudanças observadas durante ou após a ingestão de dietas obesogênicas.

Possíveis efeitos do JI sobre o comportamento de humanos e modelos animais ainda são pouco explorados, porém a literatura existente traz achados interessantes. De forma geral, períodos de jejum agudo desencadeiam respostas de estresse em modelos animais (NAKAMURA *et al.*, 1990; OLSEN *et al.*, 2008), no entanto, a manutenção de protocolos de JI parece melhorar esse quadro, aumentando a resistência ao estresse causado pelos períodos de retirada de alimento, diminuindo a circulação de hormônios relacionados ao estresse, como o cortisol (SHIN *et al.*, 2018), e promovendo um efeito ansiolítico detectado em paradigmas comportamentais, cujos mecanismos subjacentes ainda são pouco explorados (LIU *et al.*, 2019; SOARES *et al.*, 2021).

Carteri *et al.* (2021) identificaram um possível efeito ansiolítico associado ao JI em camundongos saudáveis. Os autores observaram uma diminuição no comportamento tipo-ansioso desses animais através do teste de campo-aberto e do teste de preferência claro/escuro, sem encontrar alterações na bioenergética mitocondrial e na produção de EROs nos sinaptossomos desses animais. Liu *et al.* (2019) também reportaram uma diminuição no comportamento tipo-ansioso associado a um protocolo de JI ADF em camundongos saudáveis ou nocaute para Sirtuina 3 (SIRT3 $-/-$). Os autores encontraram um aumento da performance exploratória no teste de labirinto da cruz elevada e no teste de preferência claro/escuro no grupo de animais saudáveis após a aplicação do protocolo de JI em relação ao grupo controle, e uma queda de performance nos animais SIRT3 $-/-$, em dieta normal ou JI, em relação aos animais saudáveis, indicando que a proteína Sirt3 pode estar relacionada aos efeitos ansiolíticos promovidos pelo JI. Esta proteína, por sua vez, possui sua sinalização modulada pelo *switch* para o estado cetogênico que ocorre em dietas cetogênicas e protocolos de JI (OKA *et al.*, 2021; SHIMAZU *et al.*, 2013) e que também pode influenciar o metabolismo mitocondrial (NAGAO *et al.*, 2016). Um possível efeito ansiolítico associado ao JI seria especialmente interessante do ponto de vista de intervenção contra a obesidade, haja vista que esta patologia causa alterações ansiogênicas, declínio cognitivo e outras mudanças neurocomportamentais, demonstradas tanto em estudos com humanos (FREEMAN *et al.*, 2014) quanto em modelos animais (OKA *et al.*, 2010).

Por isso, como parte do processo de padronização do protocolo de JI e de caracterização desta intervenção em um novo modelo animal, também realizamos experimentos comportamentais para avaliar o comportamento tipo-ansioso, por meio do TTN, e de preferência social, por meio do TPS. Em nossos estudos, nenhum dos grupos tratados

apresentou diferenças nos parâmetros utilizados para avaliar locomoção e exploração no TTN (i. e. Distância percorrida, Velocidade máxima e Ângulo absoluto de virada), no entanto, encontramos um possível efeito ansiolítico nos animais submetidos ao JI ADF no grupo IF24 em relação ao grupo controle, representado pelo aumento na exploração na região superior, o que não foi observado nos animais IF48, o que corrobora os achados em trabalhos realizados com modelos animais murinos (DE NORONHA *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2021). A semelhança com dados obtidos em outros modelos animais é um indicativo de que o *zebrafish* seria um bom modelo translacional para pesquisas envolvendo JI e comportamento. Outra possibilidade para a alteração observada pode ser o aumento da coragem (*boldness*) desses animais. É possível que o estresse causado pela privação intermitente de alimento tenha um papel de encorajar esses animais a explorarem mais o ambiente em busca de alimento, embora não seja possível afirmar esta possibilidade apenas com os dados obtidos neste trabalho. Os resultados indicam a necessidade de experimentos mais detalhados para caracterizar o estresse desses animais em resposta aos protocolos de JI, possivelmente avaliando hormônios, como o cortisol, e a atividade locomotora desses animais em maiores detalhes.

É necessário considerar que houve algumas limitações em nossas metodologias comportamentais que indicam que é preciso cuidado com a interpretação dos dados que obtivemos. Um número considerável de animais de todos os grupos não subiu para a região superior, a maioria do grupo SD (a saber, 8 animais no grupo SD, 2 animais no grupo IF24 e 3 animais no IF48), sendo que é esperado que os animais comecem a explorar a região superior com o passar do tempo durante o TTN (CACHAT *et al.*, 2010). Além disso, obtivemos resultados muito heterogêneos dentro dos grupos, o que nos leva a crer que a padronização desses experimentos poderia ser melhorada. É possível que os animais estivessem muito estressados no momento do teste, seja em função da iluminação não-uniforme da sala, da manipulação por parte dos experimentadores ou algum outro estímulo não identificado. Ao mesmo tempo, possivelmente esta heterogeneidade pudesse ser resolvida aumentando o n experimental. Em resumo, nossos dados indicam que há a possibilidade de um efeito ansiolítico relacionado a aplicação do protocolo de JI ADF utilizado no grupo IF24, no entanto este resultado pode estar sofrendo influência de outros fatores de estresse não detectados durante o processo de padronização. São necessários experimentos complementares para reforçar esta evidência, como a medição indireta do estresse através de

hormônios ou a realização de outros paradigmas de ansiedade, como o teste de preferência claro/escuro (BLASER; ROSEMBERG, 2012) para complementar os dados de comportamento tipo-ansioso em experimentos futuros.

Não encontramos diferenças significativas no comportamento de preferência social dos animais submetidos a JI em relação aos animais do grupo SD. Este resultado está dentro do esperado. Não encontramos estudos onde possíveis alterações no comportamento tipo-social em resposta ao JI, no entanto, tampouco há alguma evidência que suporte alguma possibilidade de alteração neste tipo de comportamento em resposta a este protocolo. De fato, somente alterações muito profundas na fisiologia animal, como ocorre em modelos de doenças neurológicas como esquizofrenia e epilepsia, causam alterações no comportamento social em modelos animais (CHO *et al.*, 2021; GIONGO *et al.*, 2023).

É importante também discutir algumas limitações que tivemos ao longo do estudo e algumas formas de refinar o protocolo de JI em investigações futuras. Primeiro, realizamos uma caracterização inicial das mudanças causadas pelo JI no peso e no BMI, mas não realizamos o acompanhamento de alguns metabólitos básicos, como glicose, triacilgliceróis e corpos cetônicos, cuja análise enriqueceria nossa caracterização do modelo. Estes dados complementam as medidas morfométricas e podem ser utilizados como indicadores de estabelecimento adequado do protocolo de JI. Nossos resultados ajudam a entender que, ao realizar experimentos com dietas é muito importante fazer este tipo de acompanhamento. No momento, o protocolo para extração do sangue desses animais para a utilização em kits de medição encontra-se em fase de padronização em nosso laboratório.

Nossa caracterização da bioenergética mitocondrial é apenas um passo na caracterização do metabolismo mitocondrial como um todo, e diversas técnicas podem ser utilizadas para complementar os dados da RAR, tais como avaliação de produção de EROs, avaliação do potencial de membrana mitocondrial e de marcadores de massa mitocondrial, como a citrato sintase. Este último ensaio poderia ter sido útil na avaliação de possíveis perdas de massa mitocondrial por parte do grupo IF48. A realização de ensaios complementares é importante para uma caracterização mais completa do metabolismo mitocondrial dos *zebrafish* em resposta ao JI.

Os protocolos comportamentais aplicados podem e devem ser refinados. Os resultados do TTN, ainda que promissores, apresentaram uma grande variação dentro dos grupos, como discutido anteriormente. Ressalta-se a importância de um ambiente com iluminação uniforme

para a realização de experimentos com *zebrafish* em estudos futuros, onde seja possível controlar a intensidade da luz e possíveis marcadores no ambiente de testes. Nós também testamos um número limitado de paradigmas comportamentais. O estudo de paradigmas adicionais, como o T-maze para memória e aprendizado, teste de discriminação de objetos e teste de esQUIVA inibitória são possibilidades para uma caracterização mais detalhada dos efeitos do JI sobre o comportamento do *zebrafish*.

Em suma, neste trabalho conseguimos estabelecer com sucesso um protocolo de JI ADF em *zebrafish*, bem como uma modificação deste protocolo para estudos exploratórios. Em nossas investigações acerca da bioenergética, não encontramos alterações em resposta ao protocolo IF24 nos parâmetros de respiração mitocondrial do coração e encéfalo, mas observamos uma diminuição significativa da respiração mitocondrial dos animais IF48, bem como da capacidade de reserva respiratória desses animais, um indicativo de perda de plasticidade. As alterações no comportamento tipo-ansioso mostram um possível efeito ansiolítico relacionado ao JI ADF, no entanto, são necessárias investigações mais aprofundadas para caracterizar melhor o comportamento desses animais. Em conjunto, os dados reiteram os benefícios do JI como estratégia de emagrecimento e de intervenção contra a obesidade, e lançam bases para diversas investigações futuras desta intervenção em um novo modelo animal.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, conseguimos estabelecer com sucesso um protocolo de JI ADF em *zebrafish*, bem como uma versão modificada deste para propósitos de investigação. Os animais submetidos ao JI apresentaram redução em parâmetros morfométricos, o que reitera os impactos positivos associados ao JI e demonstra sua efetividade como uma possível estratégia de combate a obesidade, que deve ser investigada no futuro.

Nossas investigações acerca do metabolismo mitocondrial não apontaram disfunção mitocondrial no coração e no encéfalo nos animais do grupo IF24, que foi submetido ao protocolo de JI ADF, o que abre espaço para uma miríade de novas questões acerca de como o JI pode afetar o metabolismo mitocondrial e vias relacionadas. A diminuição da eficiência do metabolismo mitocondrial cardíaco observada no coração dos animais do grupo IF48, submetido ao protocolo de JI ADF modificado indicam que esta talvez não seja a melhor abordagem para a aplicação de JI, ao menos no que concerne ao metabolismo mitocondrial. Não encontramos mudanças no comportamento de preferência social desses animais em resposta ao JI, porém os animais IF24 apresentaram uma maior exploração na região superior no NTT, o que indica um possível efeito ansiolítico. Ademais, a grande variabilidade dos resultados indica que possivelmente há efeitos externos intervindo nos resultados.

O estabelecimento com sucesso de um protocolo de JI abre a possibilidade de realizar uma caracterização mais aprofundada de seus efeitos em modelos animais. É possível avaliar outros parâmetros metabólicos, como os níveis de glicose, triacilgliceróis e corpos cetônicos, outros efeitos subjacentes ao metabolismo mitocondrial, como o impacto da intervenção na geração de EROs e na utilização de substratos energéticos alternativos além dos que fornecemos nos experimentos de RAR além de possíveis efeitos em outros tipos de comportamento, como o aprendizado ou memória de curto e longo prazo. É de fundamental importância avaliar o JI como uma estratégia de intervenção para obesidade, para entender os reais benefícios dessa intervenção em indivíduos não saudáveis.

LISTA DE REFERÊNCIAS

ACHARI, Arunkumar E; JAIN, Sushil K. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1321, 2017. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/6/1321>.

ANIMALS, National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>. Acesso em: 24 maio 2023.

ANTON, Stephen D. *et al.* Flipping the Metabolic Switch: Understanding and Applying the Health Benefits of Fasting. **Obesity**, v. 26, n. 2, p. 254–268, 2018.

ARSLAN-ERGUL, Ayca *et al.* Short-term dietary restriction in old zebrafish changes cell senescence mechanisms. **Neuroscience**, v. 334, p. 64–75, 2016.

AZZAM, Sarah Kassem; ALSAFAR, Habiba; SAJINI, Abdulrahim A. FTO m6A Demethylase in Obesity and Cancer: Implications and Underlying Molecular Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, p. 3800, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/7/3800>.

BAIK, Sang-Ha *et al.* Intermittent fasting increases adult hippocampal neurogenesis. **Brain and Behavior**, v. 10, n. 1, p. e01444, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/brb3.1444>.

BHUTANI, Surabhi *et al.* Improvements in Coronary Heart Disease Risk Indicators by Alternate-Day Fasting Involve Adipose Tissue Modulations. **Obesity**, v. 18, n. 11, p. 2152–2159, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/oby.2010.54>.

BLASER, Rachel E; ROSEMBERG, Denis B. Measures of Anxiety in Zebrafish (*Danio rerio*): Dissociation of Black/White Preference and Novel Tank Test. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36931, 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0036931>.

BROWN, David A *et al.* Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. **Nature Reviews Cardiology**, v. 14, n. 4, p. 238–250, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrcardio.2016.203>.

CACHAT, Jonathan *et al.* Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. **Nature Protocols**, v. 5, n. 11, p. 1786–1799, 2010.

CAMELO, Luana *et al.* Intermittent fasting exerts beneficial metabolic effects on blood pressure and cardiac structure by modulating local renin-angiotensin system in the heart of mice fed high-fat or high-fructose diets. **Nutrition Research**, v. 63, p. 51–62, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0271531718305670>.

CARTERI, Randhall B *et al.* Intermittent fasting promotes anxiolytic-like effects unrelated to synaptic mitochondrial function and BDNF support. **Behavioural Brain Research**, v. 404, p. 113163, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432821000504>.

CATTERSON, James H. *et al.* Short-Term, Intermittent Fasting Induces Long-Lasting Gut Health and TOR-Independent Lifespan Extension. **Current Biology**, v. 28, n. 11, p. 1714-1724.e4, 2018.

CAVALIERE, Gina *et al.* High-Fat Diet Induces Neuroinflammation and Mitochondrial Impairment in Mice Cerebral Cortex and Synaptic Fraction. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00509>.

CELEBI-BIRAND, Dilan *et al.* Dietary and Pharmacological Interventions That Inhibit Mammalian Target of Rapamycin Activity Alter the Brain Expression Levels of Neurogenic and Glial Markers in an Age-and Treatment-Dependent Manner. **Rejuvenation Research**, v. 23, n. 6, p. 485–497, 2020. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/rej.2019.2297>.

CERQUEIRA, Fernanda M; KOWALTOWSKI, Alicia J. Mitochondrial metabolism in aging: Effect of dietary interventions. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, Special Issue: Invertebrate Models of Aging, p. 22–28, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163712000530>.

CHAUSSE, Bruno *et al.* Intermittent Fasting Induces Hypothalamic Modifications Resulting in Low Feeding Efficiency, Low Body Mass and Overeating. **Endocrinology**, v. 155, n. 7, p. 2456–2466, 2014a. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2013-2057>.

CHAUSSE, Bruno *et al.* Intermittent Fasting Induces Hypothalamic Modifications Resulting in Low Feeding Efficiency, Low Body Mass and Overeating. **Endocrinology**, v. 155, n. 7, p. 2456–2466, 2014b.

CHAUSSE, Bruno *et al.* Intermittent fasting results in tissue-specific changes in bioenergetics and redox state. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2015.

CHENG, Ruey-Kuang; JESUTHASAN, Suresh J; PENNEY, Trevor B. Zebrafish forebrain and temporal conditioning. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1637, p. 20120462, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3895987/>.

CHICO, Timothy J A; INGHAM, Philip W; CROSSMAN, David C. Modeling Cardiovascular Disease in the Zebrafish. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 18, n. 4, p. 150–155, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050173808000595>.

CHO, Sung-Joon *et al.* Post-Traumatic Epilepsy in Zebrafish Is Drug-Resistant and Impairs Cognitive Function. **Journal of Neurotrauma**, v. 38, n. 22, p. 3174–3183, 2021.

CRESCENZO, Raffaella *et al.* Effect of Initial Aging and High-Fat/High-Fructose Diet on Mitochondrial Bioenergetics and Oxidative Status in Rat Brain. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 11, p. 7651–7663, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1617-z>.

DA SILVA, Vanessa Oliveira; DOS SANTOS BATISTA, Átila. Efeitos do jejum intermitente para o tratamento da obesidade: uma revisão de literatura. **Revista da Associação Brasileira de Nutrição - RASBRAN**, v. 12, n. 1, p. 164–178, 2021.

DE CABO, Rafael; MATTSON, Mark P. Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 26, p. 2541–2551, 2019.

DE NORONHA, Sylvana Rendeiro *et al.* High fat diet induced-obesity facilitates anxiety-like behaviors due to GABAergic impairment within the dorsomedial hypothalamus in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 316, p. 38–46, 2017.

DONG, Tiffany A. *et al.* Intermittent Fasting: A Heart Healthy Dietary Pattern?. **The American Journal of Medicine**, v. 133, n. 8, p. 901–907, 2020.

EIRIN, Alfonso; LERMAN, Amir; LERMAN, Lilach O. Enhancing Mitochondrial Health to Treat Hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 20, n. 10, p. 89, 2018.

ELESAWY, Basem H. *et al.* The Impact of Intermittent Fasting on Brain-Derived Neurotrophic Factor, Neurotrophin 3, and Rat Behavior in a Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus. **Brain Sciences**, v. 11, n. 2, p. 242, 2021.

EMINI VESELI, Besa *et al.* Animal models of atherosclerosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 816, p. 3–13, 2017.

ERBABA, Begun *et al.* Caloric restriction reinforces the stem cell pool in the aged brain without affecting overall proliferation status. **Gene**, v. 851, p. 147026, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111922008460>.

FAILLACI, Francesca *et al.* Obese zebrafish: A small fish for a major human health condition. **Animal Models and Experimental Medicine**, v. 1, n. 4, p. 255–265, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ame2.12042>.

FANN, David Yang Wei *et al.* Intermittent fasting attenuates inflammasome activity in ischemic stroke. **Experimental Neurology**, v. 257, p. 114–119, 2014. Disponível em: Acesso em: 24 ago. 2021.

FASANO, Candida *et al.* FOXO3a from the Nucleus to the Mitochondria: A Round Trip in Cellular Stress Response. **Cells**, v. 8, n. 9, p. 1110, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/9/1110>.

FONTANA, Barbara D. *et al.* Taurine modulates acute ethanol-induced social behavioral deficits and fear responses in adult zebrafish. **Journal of Psychiatric Research**, v. 104, p. 176–182, 2018.

FONTANA, Barbara D. *et al.* Zebrafish (*Danio rerio*) behavioral laterality predicts increased short-term avoidance memory but not stress-reactivity responses. **Animal Cognition**, v. 22, n. 6, p. 1051–1061, 2019.

FREEMAN, Linnea R. *et al.* Damaging effects of a high-fat diet to the brain and cognition: A review of proposed mechanisms. **Nutritional Neuroscience**, v. 17, n. 6, p. 241–251, 2014.

FRIEDMAN, Jonathan R; NUNNARI, Jodi. Mitochondrial form and function. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 335–343, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4075653/>.

GERLAI, R *et al.* **Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects.** 2020.

GIARDOGLOU, Panagiota; BEIS, Dimitris. On Zebrafish Disease Models and Matters of the Heart. **Biomedicines**, v. 7, n. 1, p. 15, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9059/7/1/15>.

GIONGO, Franciele Kich *et al.* Effects of Taurine in Mice and Zebrafish Behavioral Assays With Translational Relevance to Schizophrenia. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 125–136, 2023.

GNAIGER, Erich. Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis. **Bioenerg Commun**, v. 2, 2020. Disponível em: www.oroboros.at.

GRAHAM, Courtney; VON KEYSERLINGK, Marina A.G.; FRANKS, Becca. **Zebrafish welfare: Natural history, social motivation and behaviour**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2018.

GROSSMAN, Leah *et al.* Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 214, p. 277–284, 2010. Disponível em: Acesso em: 30 maio 2023.

GUDDEN, Jip; ARIAS VASQUEZ, Alejandro; BLOEMENDAAL, Mirjam. The Effects of Intermittent Fasting on Brain and Cognitive Function. **Nutrients**, v. 13, n. 9, p. 3166, 2021.

GUPTA, Tripti; MULLINS, Mary C. Dissection of Organs from the Adult Zebrafish. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 37, p. 1717, 2010. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3144575/](https://www.jove.com/doi/10.1002/jvpe.1717). Acesso em: 25 maio 2023.

HARDIANY, N. S. *et al.* The Effect of Fasting on Oxidative Stress in the Vital Organs of New Zealand White Rabbit. **Reports of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 11, n. 2, p.190–199, 10 ago. 2022

HARGRAVE, Sara L. *et al.* Western diets induce blood-brain barrier leakage and alter spatial strategies in rats. **Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 130, n. 1, p. 123–135, 2016.

HENDERSON, Yoko O *et al.* A long-term obesogenic high-fat diet in mice partially dampens the anti-frailty benefits of late-life intermittent fasting. **GeroScience**, v. 45, n. 2, p. 1247–1262, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00678-1>.

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

HWANGBO, Dae-Sung *et al.* Mechanisms of Lifespan Regulation by Calorie Restriction and Intermittent Fasting in Model Organisms. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1194, 2020.

KAZMIRCZAK, Felipe *et al.* Intermittent Fasting Activates AMP-Kinase to Restructure Right Ventricular Lipid Metabolism and Microtubules. **JACC: Basic to Translational Science**, p. S2452302X22004399, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452302X22004399>.

KENNEDY, Eugene P; LEHNINGER, Albert L. OXIDATION OF FATTY ACIDS AND TRICARBOXYLIC ACID CYCLE INTERMEDIATES BY ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 179, n. 2, p. 957–972, 1949. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819512893>.

KUNZ, Wolfram S. Different Metabolic Properties of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Different Cell Types - Important Implications for Mitochondrial Cytopathies. **Experimental Physiology**, v. 88, n. 1, p. 149–154, 2003.

LAWRENCE, Christian. Advances in zebrafish husbandry and management. **Methods in Cell Biology**, v. 104, p. 429–451, 2011. Disponível em: Acesso em: 24 maio 2023.

LAWRENCE, Christian *et al.* The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquaculture**, v. 368–369, p. 103–108, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848612005595>.

LI, Xing-tong *et al.* Brain-derived Neurotrophic Factor Promotes Growth of Neurons and Neural Stem Cells Possibly by Triggering the Phosphoinositide 3-Kinase/ AKT/Glycogen Synthase Kinase-3 β / β -catenin Pathway. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 16, n. 7, 2017.

LI, Xixi *et al.* Effects of Nutritionally Induced Obesity on Metabolic Pathways of Zebrafish. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 1850, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/3/1850>.

LIU, Yong *et al.* SIRT3 mediates hippocampal synaptic adaptations to intermittent fasting and ameliorates deficits in APP mutant mice. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1886, 2019.

LONGO, Valter D.; MATTSON, Mark P. Fasting: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 2, p. 181–192, 2014.

MAGER, Donald E *et al.* Caloric restriction and intermittent fasting alter spectral measures of heart rate and blood pressure variability in rats. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 6, p. 631–637, 2006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.05-5263com>.

MALINOWSKI, Bartosz *et al.* Intermittent Fasting in Cardiovascular Disorders—An Overview. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 673, 2019.

MARCHETTI, Philippe *et al.* Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 10, p. 13106–13124, 2020.

MAURO-LIZCANO, Marta; SOTGIA, Federica; LISANTI, Michael P. SOX2-high cancer cells exhibit an aggressive phenotype, with increases in stemness, proliferation and invasion, as well as higher metabolic activity and ATP production. **Aging**, v. 14, n. 24, p. 9877–9889, 2022.

MCCARTHY, Cameron G. *et al.* Ketone body β -hydroxybutyrate is an autophagy-dependent vasodilator. **JCI Insight**, v. 6, n. 20, 2021.

MILN, Clare; WARD, Ashley J. W.; SEEBACHER, Frank. Social rank and not physiological capacity determines competitive success in zebrafish (*Danio rerio*). **Royal Society Open Science**, v. 8, n. 4, p. rsos.210146, 2021.

MONTALBANO, Giuseppe *et al.* A White Grape Juice Extract Reduces Fat Accumulation through the Modulation of Ghrelin and Leptin Expression in an In Vivo Model of Overfed Zebrafish. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1119, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/4/1119>.

NAGAO, Manabu *et al.* β -Hydroxybutyrate elevation as a compensatory response against oxidative stress in cardiomyocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 475, n. 4, p. 322–328, 2016. Disponível em: Acesso em: 7 ago. 2021.

NAKAMURA, K. *et al.* Effect of food-restriction stress on immune response in mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 30, n. 1, p. 23–29, 1990.

NGUYEN, Binh Yen *et al.* Mitochondrial function in the heart: the insight into mechanisms and therapeutic potentials. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 22, p. 4302–4318, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6887906/>.

NOWOSAD, Karolina; SUJKA, Monika. Effect of Various Types of Intermittent Fasting (IF) on Weight Loss and Improvement of Diabetic Parameters in Human. **Current Nutrition Reports**, v. 10, n. 2, p. 146–154, 2021.

OCDE, Oecd /. Section 2 Effects on Biotic Systems OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. 2019. Disponível em: <http://www.oecd.org/termsandconditions/>. Acesso em: 24 maio 2023.

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

OKA, Shin-Ichi *et al.* β -Hydroxybutyrate, a Ketone Body, Potentiates the Antioxidant Defense via Thioredoxin 1 Upregulation in Cardiomyocytes. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 7, 2021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34356388>. Acesso em: 7 ago. 2021.

OLSEN, Rolf Erik *et al.* The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod, *Gadus morhua* L. **Aquaculture**, v. 280, n. 1–4, p. 232–241, 2008.

PICOLO, Victor L. *et al.* Short-term high-fat diet induces cognitive decline, aggression, and anxiety-like behavior in adult zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 110, p. 110288, 2021. Disponível em: Acesso em: 25 maio 2023.

RAYMOND, Jolia *et al.* Assessing Habituation Phenotypes in Adult Zebrafish: Intra- and Inter-Trial Habituation in the Novel Tank Test. p. 273–285, 2012. Disponível em: Acesso em: 28 maio 2023.

RIEHL, Russell *et al.* Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, n. 6, p. 658–667, 2011. Disponível em: Acesso em: 28 maio 2023.

SAÚDE, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA. Obesity and overweight. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 23 fev. 2023.

SCHNEIDER, Caroline A; RASBAND, Wayne S; ELICEIRI, Kevin W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SEEBACHER, Frank; JAMES, Rob S. Increased physical activity does not improve obesity-induced decreases in muscle quality in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Applied Physiology**, v. 127, n. 6, p. 1802–1808, 2019. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/japplphysiol.00433.2019>.

SEIDLER, Karin; BARROW, Michelle. Intermittent fasting and cognitive performance – Targeting BDNF as potential strategy to optimise brain health. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 65, p. 100971, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009130222100073X>.

SHENOY, Avinash *et al.* The Brilliance of the Zebrafish Model: Perception on Behavior and Alzheimer's Disease. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 16, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2022.861155>.

SHIMAZU, Tadahiro *et al.* Suppression of Oxidative Stress by β -Hydroxybutyrate, an Endogenous Histone Deacetylase Inhibitor. **Science**, v. 339, n. 6116, p. 211–214, 2013. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1227166>.

SHIN, Bae Kun *et al.* Intermittent fasting protects against the deterioration of cognitive function, energy metabolism and dyslipidemia in Alzheimer's disease-induced estrogen deficient rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 4, p. 334–343, 2018.

SOARES, Naís Lira *et al.* Does intermittent fasting associated with aerobic training influence parameters related to the gut-brain axis of Wistar rats?. **Journal of Affective Disorders**, v. 293, p. 176–185, 2021.

STAINIER, Didier Y R; FISHMAN, Mark C. The zebrafish as a model system to study cardiovascular development. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 4, n. 5, p. 207–212, 1994. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/1050173894900361>.

SUTTON, Elizabeth F. *et al.* Early Time-Restricted Feeding Improves Insulin Sensitivity, Blood Pressure, and Oxidative Stress Even without Weight Loss in Men with Prediabetes. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 6, p. 1212-1221.e3, 2018.

TAN, Wei-Qi *et al.* Foxo3a Inhibits Cardiomyocyte Hypertrophy through Transactivating Catalase *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 44, p. 29730–29739, 2008. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)63372-5/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)63372-5/abstract).

TINSLEY, Grant M.; LA BOUNTY, Paul M. Effects of intermittent fasting on body composition and clinical health markers in humans. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. 10, p. 661–674, 2015.

UNO, Masaharu *et al.* A Fasting-Responsive Signaling Pathway that Extends Life Span in *C. elegans*. **Cell Reports**, v. 3, n. 1, p. 79–91, 2013.

VARADY, Krista A. *et al.* Cardiometabolic Benefits of Intermittent Fasting. **Annual Review of Nutrition**, v. 41, n. 1, p. 333–361, 2021.

VARADY, Krista A. *et al.* Clinical application of intermittent fasting for weight loss: progress and future directions. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 18, n. 5, p. 309–321, 2022.

WAN, Ruiqian *et al.* Cardioprotective effect of intermittent fasting is associated with an elevation of adiponectin levels in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 5, p. 413–417, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095528630900031X>.

WANG, Xiaomeng *et al.* Ketogenic Metabolism Inhibits Histone Deacetylase (HDAC) and Reduces Oxidative Stress After Spinal Cord Injury in Rats. **Neuroscience**, v. 366, p. 36–43, 2017.

WEBSTER, A. J. F. Bioenergetics, bioengineering and growth. **Animal Science**, v. 48, n. 2, p. 249–269, 1989.

XU, Zujie *et al.* 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, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/2/251>.

ZANG, Liqing *et al.* Preventive Effects of Green Tea Extract against Obesity Development in Zebrafish. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2627, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/9/2627>.

ZHOU, Bo; TIAN, Rong. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 9, p. 3716–3726, 2018. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/120849>.