



AMANDA MARIA SIQUEIRA MOREIRA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO
LABORATÓRIO DO ESTUDO DA INTERAÇÃO QUÍMICO-
BIOLÓGICA E DA REPRODUÇÃO ANIMAL DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG**

LAVRAS-MG

2019

AMANDA MARIA SIQUEIRA MOREIRA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO
LABORATÓRIO DO ESTUDO DA INTERAÇÃO QUÍMICO-
BIOLÓGICA E DA REPRODUÇÃO ANIMAL DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG**

Relatório de estágio supervisionado apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte das
exigências do Curso de Medicina Veterinária, para
a obtenção do título de Bacharel.

Orientador

Dr. Luis David Solis Murgas

Co-orientadora

Bárbara do Carmo Rodrigues Virote

LAVRAS-MG

2019

AMANDA MARIA SIQUEIRA MOREIRA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO LABORATÓRIO DO
ESTUDO DA INTERAÇÃO QUÍMICO-BIOLÓGICA E DA
REPRODUÇÃO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS
GERAIS – UFMG**

Relatório de estágio supervisionado apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte das
exigências do Curso de Medicina Veterinária, para
a obtenção do título de Bacharel.

APROVADO em 20/11/2019

Dr. Luis David Solis Murgas UFLA

Dra. Cristina Delarete Drummond UFLA

Me. Bárbara do Carmo Rodrigues Virote UFLA

AGRADECIMENTOS

Dedico meu trabalho de conclusão de curso primeiramente a Deus à tantas bênçãos em minha vida. Agradeço também a minha família e amigos por todo amor, paciência e compreensão neste período.

À minha co-orientadora Bárbara, pelo amparo e por estar sempre presente dando suporte e atenção a este trabalho.

Aos meus orientadores, Luis Murgas e Cristina Delarete, por todo apoio e ensinamento durante toda a jornada da graduação. Agradeço pelas oportunidades e pela confiança no meu trabalho.

Gostaria de agradecer aos laboratórios onde realizei parte do experimento: ao Laboratório De Microscopia Eletrônica E Análise Ultraestrutural (LME) - UFLA, que me permitiram retirar as fotografias das lâminas do projeto. E ao laboratório do Estudo da Interação Químico-Biológica e da Reprodução Animal (LIQBRA) – UFMG, por ter me acolhido e me orientado durante o estágio.

Agradeço também a Universidade Federal de Lavras pela minha ótima formação profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da UFLA.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

O estágio supervisionado, realizado no último período do curso de medicina veterinária, é a etapa em que o aluno escolhe uma instituição conveniada para aprimorar sua formação profissional na área pretendida. A parte prática foi realizada no Laboratório do Estudo da Interação Químico-Biológica e da Reprodução Animal (LIQBRA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no período de 15 de julho ao dia 27 de setembro de 2019, sob a orientação do Professor Luis David Solis Murgas e supervisão do Professor José Dias Corrêa Júnior. Este relatório descreve a estrutura física do local, bem como as atividades realizadas no período de estágio. Além disso, apresenta os resultados das análises histológicas do projeto intitulado “Influência da obesidade induzida pela dieta em zebrafish (*Danio rerio*)” realizada durante o período do estágio. O experimento foi efetuado no Biotério Multiusuário Central da Universidade federal de Lavras (UFLA) e dirigido pela doutoranda Bárbara do Carmo Rodrigues Virote. O material coletado (animais de aproximadamente 5 meses) foi processado sob a supervisão do Professor José Dias Corrêa Júnior no LIQBRA-UFMG. E seus resultados permitiram identificar e compreender os efeitos da obesidade sob tecidos do zebrafish (*Danio rerio*). A realização do estágio possibilitou o cumprimento e o aprimoramento dos estudos adquiridos ao longo da graduação, bem como possibilitou agregar novos conhecimentos, sobretudo nas áreas de morfologia tecidual.

Palavras-chave: Análise morfológica; Obesidade; Zebrafish

ABSTRACT

The supervised internship, carried out in the last period of the veterinary medicine course, is the stage in which the student chooses a convened institution to improve their professional training in the desired area. The practical part was carried out in the Laboratory of the Study of Chemical-Biological Interaction and Animal Reproduction (LIQBRA) of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), from July 15 to September 27, 2019, under the guidance of Professor Luis David Solis Murgas. This report describes the physical structure of the site as well as the activities carried out in the internship period. It also presents the results of the histological analyses of the project entitled "Influence of obesity induced by the diet in zebrafish (*Danio rerio*)" performed during the internship period. The experiment was carried out at the Central Multiuser Bioterium of the Federal University of Lavras (UFLA) and directed by doctoral student Barbara do Carmo Rodrigues Virote. The collected material (approximately 3-month animals) was processed under the supervision of Professor José Dias Corrêa Júnior at LIQBRA-UFMG. Their results allowed to identify and understand the effects of obesity on zebrafish tissues (*Danio rerio*). The internship allowed compliance and improvement of the studies acquired during graduation, as well as made it possible to add new knowledge, especially in the areas of tissue morphology.

Key words: Morphological analysis; Obesity; Zebrafish.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE - ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO SUPERVISIONADO.

1	INTRODUÇÃO GERAL	3
2	DESCRIÇÃO DO LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTAGIO SUPERVISIONADO	4
3	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	6
3.1	Curso de Férias do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular	7
3.2	Técnica histológica	7
4	REFERENCIAL TEÓRICO	13
4.1	Panorama sobre a obesidade	13
4.2	Obesidade e alterações morfológicas	15
4.3	O zebrafish (<i>Danio rerio</i>) como modelo animal para obesidade	17
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	18
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

SEGUNDA PARTE - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) INDUZIDO À OBESIDADE.

1	INTRODUÇÃO	25
2	MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1	Local do experimento	26
2.2	Manutenção dos animais	26
2.3	Metodologia de alimentação	26
2.4	Reprodução	27
2.5	Análises bioquímicas	28
2.6	Análises Histológicas	28
2.7	Análise Estatística	30
3	RESULTADOS	30
3.1	Peso Corporal	30
3.2	Reprodução	31
3.3	Análises Bioquímicas	31
3.4	Análises Histológicas	32
4	DISCUSSÃO	38
5	CONCLUSÃO	41
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE - ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO SUPERVISIONADO.

Figura 1- Entrada principal do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG.....	4
Figura 2- Área central	5
Figura 3- Sala de cultura	6
Figura 4- Módulo de manutenção de Peixes	6
Figura 5- Plano de corte da amostra.	8
Figura 6- Forma para o molde de parafina.	9
Figura 7- Micrótopo rotativo manual.	11
Figura 8- Imersão das lâminas em hematoxilina e eosina, respectivamente.	12
Figura 9- Comparação da frequência de casos de obesidade entre os sexos durante os anos de 2006 a 2016 no Brasil.	14

SEGUNDA PARTE - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) INDUZIDO À OBESIDADE.

Figura 1- Peso corporal.	30
Figura 2- Desova total.	31
Figura 3- Avaliação bioquímica dos pais.	32
Figura 4- Avaliação do tecido adiposo.	33
Figura 5- Corte histológico do tecido adiposo.	33
Figura 6- Corte histológico da porção anterior do intestino.	34
Figura 7- Avaliação do tecido hepático.	35
Figura 8- Corte histológico do Fígado.	35
Figura 9- Avaliação do tecido pancreático	36
Figura 10- Corte histológico do pâncreas.	36
Figura 11- Avaliação do tamanho dos ovócitos.	37
Figura 12- Corte histológico do ovário.	38

LISTA DE TABELAS**PRIMEIRA PARTE - ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO SUPERVISIONADO.**

Tabela 1 - Cronograma de Inclusão em Parafina.	10
Tabela 2 - Cronograma de Coloração Hematoxilina e Eosina.	13

SEGUNDA PARTE - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) INDUZIDO À OBESIDADE.

Tabela 1- Protocolo do horário das alimentações	27
Tabela 2- - Análises morfométricas do intestino dos grupos Controle e DIO.	34

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO SUPERVISIONADO.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA) tem em seu último período curricular a disciplina PRG107- Estágio Supervisionado, em que o aluno deve escolher uma instituição ou empresa conveniada com a universidade para realizar o estágio.

É estipulado no plano da disciplina, 408 horas de estágio com acompanhamento à profissionais da área veterinária, auxiliando-os e realizando anotações diárias com a finalidade de aprender e aplicar conhecimentos adquiridos ao longo do curso. Além disso, são destinadas 68 horas à redação do relatório e ao preparo da apresentação, juntamente com o orientador.

O local de escolha para realização das atividades do estágio supervisionado foi o Laboratório do Estudo da Interação Químico-Biológica e da Reprodução Animal (LIQBRA), situado no Departamento de Morfologia, no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em Belo Horizonte.

O estágio foi orientado pelo professor Dr. Luis David Solis Murgas, docente da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e supervisionado pelo professor Dr. José Dias Corrêa Júnior, docente da instituição Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O período de realização do estágio foi de 15 de julho a 27 de setembro de 2019.

Para a realização do estágio foi escolhido a área de histologia, um campo da morfologia que possibilita a identificação de células e estruturas. Além disso, permite a diferenciação entre tecidos saudáveis e doentes, sendo assim largamente usada em análises quantitativas e qualitativas em pesquisas experimentais.

Também foi realizado neste período a análise histológica de amostras do projeto denominado 'Influência da obesidade induzida pela dieta em zebrafish (*Danio rerio*)', trabalho de dissertação realizado por Barbara do Carmo Rodrigues Virote, doutoranda da Universidade Federal de Lavras e também orientada pelo Dr. Luis David Solis Murgas.

2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTAGIO SUPERVISIONADO

A UFMG é uma instituição pública de ensino superior gratuito, sendo a mais antiga universidade do estado de Minas Gerais. Atualmente a universidade oferta em torno de 77 cursos de graduação e 80 programas de pós-graduação. Além disso é considerada a terceira melhor universidade brasileira no ranking Times Higher Education (UFMG, 2019).

Entre as instituições presentes, se encontra o Instituto de Ciências Biológicas (ICB), criado em 11 de novembro de 1968, que se localiza no campus Pampulha na cidade de Belo Horizonte. Atualmente, o ICB é dividido em 10 departamentos e possui laboratórios multiusuários para o desenvolvimento da pesquisa básica, tendo como lema 'Formar profissionais competentes, inovadores e éticos, comprometidos com o desenvolvimento do país, bem como promover o avanço do conhecimento científico e tecnológico no Brasil e no mundo' (ICB, 2019).

Figura 1- Entrada principal do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG



Fonte: Portal UFMG.

O laboratório escolhido para o estágio, LIQBRA, que se encontra no Departamento de Morfologia, foi fundado em 2009. O grupo de pesquisa é liderado pelos professores Antônio Carlos Castro, José Carlos Nogueira e José Dias Corrêa Júnior e tem como propósito estudar os efeitos de micropoluentes através da Biologia Celular.

O LIQBRA tem como missão de pesquisa o conhecimento dos efeitos de elementos em diversos modelos biológicos. Além da liderança do professor José Dias, a equipe é composta

também por alunos da pós-graduação. A pós doutoranda Betânia Mara Alvarenga desenvolve pesquisas envolvendo nanopartículas e sua utilização como agentes de imagem e transfecção celular. O doutorando Igor Barbosa Lima atua na elaboração de estratégia terapêutica para o tratamento de melanoma utilizando o zebrafish (*Danio rerio*) como modelo. A mestranda Francieli A. da Cruz realiza pesquisas envolvendo a genotoxicidade em embriões de zebrafish. E a mestranda Letícia Dias Lima atua na elaboração terapêutica para o tratamento de osteoporose utilizando o zebrafish como modelo.

O laboratório é composto por uma área central, sala de cultura, área de estudos e módulo de manutenção dos peixes. A área central é o local onde os estudantes elaboram experimentos e as técnicas para preparação das lâminas histológicas. Ele conta com bancada para a realização de análises e também equipamentos para a confecção das lâminas, tais como: micrótomo, estufa para parafina e reagentes (Figura 2).

Figura 2- Área central do laboratório de Estudo da Interação Químico-Biológica e da Reprodução Animal- ICB- UFMG.



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Logo após a área central se encontra a sala de cultura, um ambiente estéril, monitorado e equipado com capela de fluxo, destinado ao manuseio de materiais biológicos, impedindo assim que as amostras sofram contaminação (Figura 3).

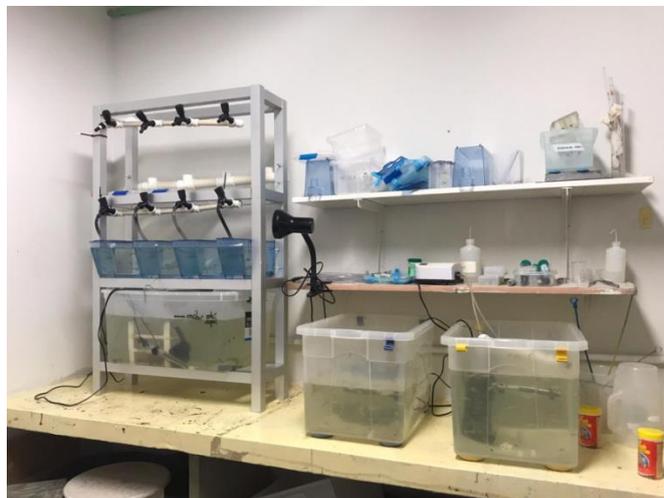
Figura 3- Sala de cultura do laboratório de Estudo da Interação Químico-Biológica e da Reprodução Animal- ICB- UFMG.



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Associado ao laboratório, encontra-se o Módulo de manutenção de Peixes, uma instalação onde se produz e mantém peixes da espécie zebrafish (*Danio rerio*) (Figura 4).

Figura 4- Módulo de manutenção de Peixes



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

3 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Um plano de trabalho foi elaborado pelo orientador Luis David Solis Murgas previamente ao período do estágio. As atividades estabelecidas nesta programação, constavam-se a participação do Curso de Férias do Programa de Pós-Graduação Em Biologia Celular, o

estudo da técnica histológica, confecção de lâminas e análises histomorfológicas e morfométricas de amostras do experimento da dissertação previamente realizado pela doutoranda e co-orientadora desse trabalho Barbara do Carmo Rodrigues Virote, na UFLA. Os objetivos do plano foram:

- Usar técnicas histológicas para identificação de alterações morfológicas no tecido adiposo unilocular subcutâneo e visceral, intestino, fígado, pâncreas e gônadas do zebrafish induzido a obesidade;
- Avaliar o impacto da indução da obesidade na hipertrofia do tecido adiposo visceral e subcutâneo;
- Avaliar o grau de vacuolização dos hepatócitos após a indução a obesidade;
- Avaliar, após à indução da obesidade, a divergência de tamanho das ilhotas pancreáticas, porções intestinais e desenvolvimento gonadal das fêmeas.

3.1 Curso de Férias do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

O curso é ministrado anualmente pelos alunos da pós-graduação em Biologia Celular da UFMG aos estudantes de graduação. São ofertados módulos teóricos e práticos que visam abordar assuntos atuais no campo científico.

Esta edição ocorreu entre os dias 15 a 19 de julho de 2019 e teve como temática ‘Câncer: desafios do século XXI’, em que visava apresentar aos estudantes pesquisas relacionadas ao câncer assim como demonstrar as técnicas realizadas nos laboratórios do ICB. No conteúdo do curso constava palestras desde temáticas sobre assuntos de conhecimento básico da doença, tais como aspectos gerais do câncer, histórico desta doença na humanidade, o microambiente tumoral, até temas mais específicos, como o acometimento e a terapêutica de neoplasias específicas à órgãos alvos.

3.2 Técnica histológica

A histologia é a ciência que estuda as células no contexto da estrutura tecidual e a inter-relação delas com os constituintes da matriz extracelular. A histotecnologia proporciona o

entendimento dos fundamentos técnicos para análise dos elementos teciduais, normais ou patológicos (MOLINARO *et al.*, 2010).

Como as análises foram feitas em microscópio de luz, a preparação dos tecidos engloba os seguintes procedimentos: Fixação, Desidratação, Diafanização, Infiltração, Microtomia e Coloração dos cortes. O protocolo que será descrito a seguir, foi adotado de acordo com Junqueira (1983) e adaptado pelo laboratório LIQBRA.

- Fixação

Após as amostras serem coletadas, foram utilizados fixadores para manter a forma definitiva das estruturas citológicas e histológicas, evitando assim, a autólise dos tecidos (JUNQUEIRA, 1983). Os espécimes de zebrafish, corpo inteiro, foram coletados e fixados em formaldeído a 10% por 24 horas, em um volume 20 vezes maior que o seu tamanho. Após esse período as amostras foram acondicionadas em álcool 70% até o momento do restante do protocolo. As fases descritas posteriormente fazem parte do processo de inclusão.

- Secções das amostras

Os espécimes foram seccionados no eixo transversal (Figura 5). Desta forma é possível a visualização de vários órgãos e tecidos da cavidade celomática, entre eles bexiga natatória, intestino, fígado, tecido adiposo, pâncreas e gônadas.

Figura 5- Plano de corte da amostra.



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

- Desidratação

Com a amostra fixada, começa a etapa de desidratação. Nesta etapa ocorre uma série de banhos em álcoois em concentrações crescentes (Tabela 1). Essa etapa é importante para que a água presente no tecido seja removida e substituída por álcool, para que ocorra a infiltração da parafina nas próximas etapas.

- Diafanização

Antes de infiltrar o tecido com a parafina, deve-se substituir o álcool por xilol. Seu alto fator de solvência permite o máximo de retirada de álcool dos tecidos, tornando-os translúcidos e melhorando a infiltração pela parafina (CAZARI *et al.*, 2013).

- Infiltração

Em seguida, o tecido foi submerso em parafina fundida a 62°C, por dois banhos consecutivos (Tabela 1). Este processo de impregnação por parafina é conhecido como inclusão.

A inclusão é um procedimento que tem como finalidade impregnar os tecidos com substância de consistência firme, que permita posteriormente corta-las em fatias finas para depois cora-las (JUNQUEIRA, 1983).

Logo após os banhos, o tecido é alocado em pequenas formas e embebido com parafina fundida até o seu completo endurecimento (Figura 6).

Figura 6- Forma para o molde de parafina.



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Tabela 1 - Cronograma de Inclusão em Parafina.

Inclusão em Parafina		
Passo	Solução	Tempo
Desidratação	Álcool 70%	30 minutos
	Álcool 80%	30 minutos
	Álcool 90%	30 minutos
	Álcool 95%	30 minutos
	Álcool 100%	30 minutos
	Álcool 100%	30 minutos
Diafanização	Xilol I	30 minutos
	Xilol II	30 minutos
	Xilol III	30 minutos
Inclusão	Parafina a 60°C	30 minutos
	Parafina a 60°C	30 minutos

Fonte: Do autor (2019) - Protocolo seguido de acordo com (Junqueira, 1983) e adaptado pelo LIQBRA.

- Microtomia

Na etapa seguinte, obtém-se os cortes dos blocos de parafina (espessura de 5µm) contendo fragmentos da amostra. Esta etapa é feita com o auxílio do micrótomo, uma máquina equipada com navalha e um braço que avança o bloco de tecido em incrementos específicos e uniformes (GARTNER; HIATT, 2007) (Figura 7).

Para que haja a transferência do corte para a lâmina, é necessário, com o auxílio de uma pinça, o deslocamento dessas fatias ao banho-maria a 45°C. Esta etapa permite que os cortes se distendam sobre a superfície da água, de modo que ao final do processo os cortes não apresentem irregularidades e distorções no tecido. Seguidamente os cortes são colhidos, se aderindo na superfície da lâmina.

Figura 7- Micrótomo rotativo manual.



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

- Coloração

A coloração é a etapa que consiste em corar as estruturas do tecido, possibilitando a diferenciação dos componentes celulares (GARTNER; HIATT, 2007). Diversos tipos de corantes foram criados para a visualização de diferentes estruturas. Neste trabalho, foi utilizado os corantes Hematoxilina e Eosina (H&E), uma coloração histológica geral que possibilita a diferenciação de estruturas basófilas e acidófilas.

A hematoxilina é um corante básico, tendo afinidade por corar estruturas ácidas, tais como DNA, RNA e regiões ricas em ribossomos, que se coram em azul-escuro ou arroxeado. Em contrapartida, a eosina é um corante ácido, que tem afinidade por estruturas básicas, como os componentes citoplasmáticos, deixando esses componentes com tonalidade avermelhada (GARTNER; HIATT, 2007).

Antes de começar o processo de coloração em si, é importante transferir as lâminas para estufas por aproximadamente uma hora. Este processo permite que o corte esteja completamente distendido e seco antes do método de coloração.

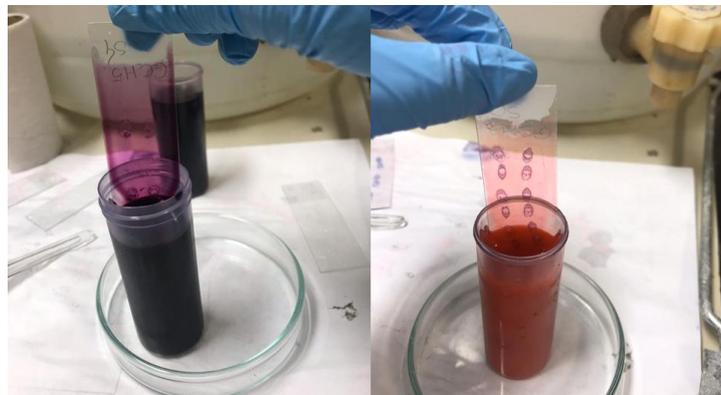
O protocolo de coloração é subdividido em 3 etapas: Hidratação, Coloração e Desidratação, como descrito por Junqueira (1983).

Na hidratação, as lâminas são mergulhadas em banhos de xilol (Tabela 2), para a retirada da parafina (desparafinização). Após esses banhos, as lâminas passam por uma série de álcoois

em concentrações decrescentes, pois a maioria dos corantes são solúveis em água, sendo necessário hidratar o corte antes da coloração propriamente dita.

Na coloração propriamente dita, é feita a imersão das lâminas primeiramente em hematoxilina e após o banho de água corrente para a remoção do excesso do corante, as lâminas são imergidas em eosina, retirando posteriormente também o excesso do corante com banho em água corrente (Figura 8) (Tabela 2).

Figura 8- Imersão das lâminas em hematoxilina e eosina, respectivamente.



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Posteriormente, as lâminas passam por desidratação, esta etapa é composta por uma sequência de álcoois crescentes, a fim de retirar a água do tecido, e também por banhos de xilol. Sendo estes últimos banhos necessários para que a montagem seja de forma permanente.

Por fim, a lamínula (fina película de vidro) é fixada à lâmina. Esta etapa é importante não só para proteção de tecidos a danos, como também para a observação do corte ao microscópio (GARTNER; HIATT, 2007). Após a secagem total das lâminas, estas estão aptas a serem analisadas em microscópio óptico.

Tabela 2 - Cronograma de Coloração Hematoxilina e Eosina.

Coloração H&E		
Passo	Solução	Tempo
Hidratação	Xilol	15 minutos
	Xilol	15 minutos
	Álcool 100%	5 minutos
	Álcool 90%	5 minutos
	Álcool 80%	5 minutos
	Álcool 70%	5 minutos
	Água corrente	10 minutos
Coloração	Hematoxilina	1 minuto
	Água corrente	15 minutos
	Eosina	10 minutos
	Água corrente	Passar na água
Desidratação	Álcool 70%	5 minutos
	Álcool 80%	5 minutos
	Álcool 90%	5 minutos
	Álcool 100%	5 minutos
	Álcool 100%	5 minutos
	Álcool 100%	5 minutos
	Xilol	15 minutos
	Xilol	15 minutos

Fonte: Protocolo seguido de acordo com (Junqueira, 1983) e adaptado pelo LIQBRA.

4 REFERENCIAL TEÓRICO – ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) COMO MODELO ANIMAL PARA OBESIDADE: UMA REVISÃO DE LITERATURA.

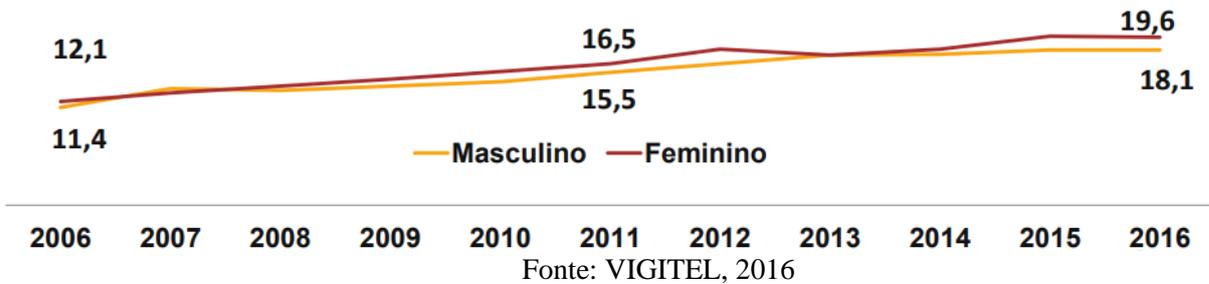
4.1 Panorama sobre a obesidade

Nos últimos 35 anos, as taxas de sobrepeso e obesidade aumentaram consideravelmente, tendo atualmente um terço da população mundial classificado como obeso ou em sobrepeso (CHOOI; DING; MAGKOS, 2018).

Em relação ao Brasil, segundo dados divulgados pela Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL, 2016), realizada em todas as capitais brasileiras, uma em cada cinco pessoas está acima do peso. Mostrando que a prevalência da obesidade no país passou de 11,8% em 2006 para 18,9% em

2016. Demonstrando que houve um aumento de 60% da doença no Brasil em 10 anos, com aumento semelhante entre os sexos (figura 9).

Figura 9- Comparação da frequência de casos de obesidade entre os sexos durante os anos de 2006 a 2016 no Brasil.



A obesidade é caracterizada por um acúmulo excessivo de tecido adiposo, sendo considerada uma enfermidade de origem multifatorial, resultante de fatores genéticos, fisiológicos, ambientais e psicológicos (SPERETTA; LEITE; DUARTE, 2014).

Acredita-se que a crescente disponibilidade de dietas ricas em alto teor calórico e de gorduras seja um dos principais contribuintes para a obesidade. Esse tipo especial de obesidade (não-genética) é chamado de obesidade nutricional, dietética ou induzida por dieta (DIO) (YANG; HUFFMAN, 2012).

O acúmulo do tecido adiposo provoca resistência à hormônios inibidores de apetite, como insulina e leptina, e também gera alterações no balanço energético a nível central, promovendo assim uma diminuição do gasto energético e um aumento do consumo alimentar ((BARRETO *et al.*, 2016).

Este aumento da adiposidade causa a desregulação dos processos homeostáticos energéticos que gera alterações no estado da saúde, levando a uma condição denominada síndrome metabólica. Muitas comorbidades estão associadas à obesidade, como doença renal, osteoartrose, câncer, diabetes melittus, cardiopatias e doença hepática gordurosa não alcoólica (MELO, 2011).

Além de distúrbios metabólicos, a obesidade também causa alterações inflamatórias em funções cerebrais, afetando especialmente as áreas do cérebro que regulam a homeostase energética e o metabolismo sistêmico (JAIS *et al.*, 2017; ALMEIDA, 2017). Todas essas consequências mostram que o estado nutricional e a dieta são importantes fatores relacionados com a promoção e a manutenção de uma boa saúde. Realçando a obesidade como uma das principais causas de doenças crônicas não transmissíveis.

4.2 Obesidade e alterações morfológicas

A obesidade é definida pela Organização Mundial de Saúde, como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura, representando risco à saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000). Além de causar o aumento no peso corporal, esta síndrome leva a dislipidemia, alteração dos níveis de triglicérides do plasma, acarretando problemas a nível sistêmico e até mesmo a nível tecidual, como no tecido adiposo, que pode gerar a hipertrofia dos adipócitos (FUGGETTA *et al.*, 2019). No intestino, pode ocorrer o aumento da permeabilidade de sua mucosa (YE *et al.*, 2019). Em relação ao fígado, o excesso de gordura pode causar acúmulo de gordura no tecido hepático (FESTI *et al.*, 2004). No pâncreas, esta alteração pode acarretar na ineficiência das células do tecido pancreático (SCIENCE IN THE NEWS, 2019). E na reprodução, o aumento de peso pode influenciar na formação dos ovócitos (LEIBOLD; HAMMERSCHMIDT, 2015).

No tecido adiposo unilocular (branco), o acúmulo de lipídios pode resultar na multiplicação das células (hiperplasia), e no aumento do tamanho dos adipócitos (hipertrofia). (FUGGETTA *et al.*, 2019). Isso ocorre, pois em períodos de abundante oferta de energia, há uma alta atividade lipogênica, levando à processos metabólicos que resultam em biossíntese, incorporação e armazenamento de triglicérides no citoplasma (FONSECA *et al.*, 2006).

Além de ter a função de estoque de energia, o tecido adiposo também é o maior órgão endócrino do corpo humano (ORIO *et al.*, 2016). Sendo também encarregado pela produção de substâncias que regulam várias funções orgânicas como o balanço energético, a secreção de peptídeos e adipocinas que são responsáveis por uma série de alterações metabólicas, como no controle da ingestão alimentar, no controle da sensibilidade à insulina e em processos inflamatórios (FICHMAN, 2018).

As doenças crônicas degenerativas associadas a síndrome metabólica tem relação direta com o excesso de tecido adiposo. Vale ressaltar que esta síndrome está associada principalmente à obesidade visceral, ou seja, uma dieta com alto teor de lipídeos promove um acúmulo de gordura ectópica (DESPRÉS; LEMIEUX, 2006).

É importante compreender também que o aumento do tecido adiposo induz a ativação do sistema imune levando à inflamação crônica de baixa intensidade. Isto porque a hipertrofia dessas células induz a infiltração e proliferação de macrófagos e alteração na secreção de adipocinas (SPERETTA; LEITE; DUARTE, 2014).

No intestino, fisiologicamente, os produtos digestivos dos macronutrientes (ácidos graxos, aminoácidos e açúcares) interagem com células do epitélio gastrointestinal levando a respostas funcionais, como a secreção de peptídeos e as alterações na motilidade (STEWART *et al.*, 2011). O excesso de peso pode alterar a absorção, isso porque a obesidade modifica o estado de inflamação do corpo, levando a apoptose de células epiteliais intestinais e desregulação de junções celulares. Desta forma o excesso de peso pode gerar uma disfunção da barreira da mucosa intestinal, levando ao aumento da permeabilidade intestinal (YE *et al.*, 2019). Com isso, dietas ricas em gorduras saturadas e trans, podem acarretar doenças gastrointestinais (como por exemplo Síndrome do intestino irritável) pois dietas com alto teor de gordura alteraram a microbiota intestinal (ZHANG; YANG, 2016).

No que se diz respeito ao fígado, o excesso de gordura pode resultar em esteatose hepática não alcoólica (NAFLD), termo usado para descrever a condição patológica de deposição de triglicerídeos nos hepatócitos (CORDEIRO *et al.*, 2015). Esta alteração ocorre porque a alimentação excessiva aumenta a glicose circulante, respondendo menos a insulina (hormônio que provoca a esterificação e o armazenamento de gordura no tecido adiposo). Quando a resistência à insulina se desenvolve, os ácidos graxos livres são movidos inapropriadamente para tecidos não adiposos como o fígado por diminuição da inibição da lipólise e aumento da lipogênese (LEVENE; GOLDIN, 2012).

O pâncreas, é uma glândula anfícrina, cuja a porção endócrina (ilhotas pancreáticas) é responsável pelo controle dos níveis de açúcar no sangue. Isto ocorre, pois, as células β das ilhotas pancreáticas, produzem o hormônio insulina, que é responsável por reduzir os níveis de glicose do sangue (SCIENCE IN THE NEWS, 2019).

Na obesidade, a hiperglicemia relacionada a alta ingestão de açúcar pode levar a ação prejudicada da insulina nos tecidos-alvo (resistência à insulina) e conseqüentemente à secreção insuficiente de insulina pelo pâncreas. Este quadro se caracteriza como Diabetes Mellitus (KAHN, 2003). Nesta doença, é possível observar alterações funcionais no pâncreas, como a ineficiência das células β e um estado de inflamação gerado por macrófagos ativos (SCIENCE IN THE NEWS, 2019). Em um estado que antecede a diabetes, pode-se observar o aumento das ilhotas pancreáticas, como uma forma de controlar a glicose sanguínea. Este quadro é denominado pré diabetes.

Em se tratando do sistema reprodutivo, sabe-se que existe uma proporção significativa de casos de infertilidade ser direta ou indiretamente relacionada com a obesidade (BAKER, 2017). Isto ocorre pois o processo reprodutivo envolve gasto energético, sendo, portanto, sensível a mecanismos fisiológicos ligados àqueles envolvidos no controle do apetite e

consumo alimentar (SELI *et al.*, 2014). Além disso em fêmeas, o aumento de peso influencia na formação dos ovócitos (LEIBOLD; HAMMERSCHMIDT, 2015), isto porque a leptina, hormônio adipocitário, interage com o eixo reprodutivo desempenhando papel importante no desenvolvimento de órgãos reprodutores (MOSCHOS *et al.*, 2002)

4.3 O zebrafish (*Danio rerio*) como modelo animal para obesidade

O zebrafish é um pequeno peixe tropical de água doce que está sendo cada vez mais usado como modelo para doenças humanas. Devido à nossa história evolutiva compartilhada, muitas das características anatômicas e fisiológicas dos peixes são altamente homólogas aos seres humanos (NISHIMURA *et al.*, 2015). Entre as suas vantagens como modelo experimental, estão a semelhança do organismo, a capacidade de manipulação genética e suas colônias experimentais poderem ser mantidas de forma econômica (MEGURO; HASUMURA; HASE, 2015).

A glicose provida dos alimentos é o combustível responsável pelo funcionamento adequado de vários órgãos, incluindo cérebro, intestinos, músculo esquelético e tecido adiposo. O mal funcionamento desta via metabólica, acarreta desordens no organismo. Por isso, o uso de modelos animais é essencial para uma melhor compreensão do desenvolvimento e progressão de uma disfunção metabólica, como a obesidade. O zebrafish é um modelo promissor para estudar esta doença, pois possui órgãos que são importantes para a regulação da homeostase energética e metabolismo em mamíferos, incluindo órgãos digestivos, tecido adiposo e músculo esquelético. Além disso, possui as principais funções bem conservadas, como regulação do apetite, regulação da insulina e armazenamento de lipídios (ZANG *et al.*, 2018).

Foi elaborado, em 2010, o primeiro modelo de zebrafish obeso induzido por dieta (DIO). A partir de um protocolo de superalimentação com *Artemia* durante 8 semanas, demonstraram, segundo análises como, índice de massa corporal (IMC), análises comparativas do transcriptoma do tecido adiposo visceral e triglicerídeos plasmáticos, que o zebrafish DIO compartilha características fisiopatológicas comuns com obesidade dos mamíferos (OKA *et al.*, 2010). O simples protocolo alimentar e o curto período de indução são vantagens de se usar o zebrafish como modelo para obesidade. Zang (2017) pôde observar que o zebrafish é um modelo promissor para compreender também a diabetes mellitus. Seus resultados sugerem que estes animais podem responder à fármacos antidiabéticos, permitindo o uso do modelo para a

triagem de novas drogas. Outros achados em pesquisas do zebrafish DIO sugerem que este modelo pode ser útil também para identificar alvos farmacológicos e testes de novos compostos químicos para o tratamento da esteatose hepática humana (NAFLD) (ASAOKA *et al.*, 2014).

STOLETOV *et al.* (2009) propôs que larvas e adultos de zebrafish modificados geneticamente e alimentados com uma dieta com alto teor de colesterol podem acarretar acúmulo de lipídios vasculares. Sendo um resultado interessante para estudos futuros sobre os aspectos da inflamação vascular e da aterosclerose.

Estudos mais recentes demonstram que o zebrafish também pode ser utilizado como modelo para o controle da obesidade por meio de fitoterápicos, como por exemplo o uso da canela (*Cinnamomum zeylanicum*) que melhora as características genotípicas e fenotípicas associada a obesidade, reduzindo os distúrbios metabólicos (KAUR *et al.*, 2019).

Todos esses trabalhos demonstram os benefícios da utilização do zebrafish DIO para avaliar os efeitos da alimentação hipercalórica e superalimentação e compostos funcionais no desenvolvimento e tratamento da obesidade.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a finalização do curso de graduação em Medicina Veterinária, o estágio curricular obrigatório foi de grande relevância, uma vez que este período proporcionou o aprimoramento e a aplicação dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso. Além disso, a supervisão de pesquisadores especializados e a escolha do local de estágio contribuíram em peso para o enriquecimento de conhecimento no campo da histologia.

A realização da revisão sobre toda a problemática e desordens causada pela obesidade demonstrou que muitos mecanismos subjacentes a essa condição ainda não foram elucidados. Sendo necessários ainda estudos utilizando modelos animais que se possa esclarecer estas alterações provocadas no organismo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. B. de. **Efeito da obesidade pré-gestacional no teor de citocinas de compartimentos maternos e fetais e na expressão de transportadores de ácidos graxos da placenta.** 2017. 145 p. Tese (Doutorado em Ciências Nutricionais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

ASAOKA, Y. *et al.* The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease. **Disease Models & Mechanisms**, v. 7, n. 3, p. 409-409, 2014.

BAKER, Kathryn D. *et al.* The impact of obesity and hypercaloric diet consumption on anxiety and emotional behavior across the lifespan. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 83, p.173-182, 2017.

BARRETO, André R.C.V.; AGUILA, Marcia B.; MANDARIM, Carlos A. Effects of liraglutide in hypothalamic arcuate nucleus of obese mice. **Obesity**, v. 24, n. 3, p. 626-633, 2016.

BRASIL, **VIGITEL**. Hábitos dos brasileiros impactam no crescimento da obesidade e aumenta prevalência de diabetes e hipertensão. 2016.

CAZARI, Vânia R. da R. *et al.* Redução do uso do xilol na técnica de coloração Hematoxilina e Eosina. **Colloquium Vitae**, v. 5, n. 2, p. 135-148, 2013.

CHOOI, Yu Chung; DING, Cherlynmagkos; FAIDON. The epidemiology of obesity. **Metabolism**, v. 92, p. 6-10, 2018.

CORDEIRO, A.; PEREIRA, S. E.; SABOYA, C. J. *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease Relationship with Metabolic Syndrome in Class III Obesity Individuals. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-7, 2015.

DESPRÉS, Jean-Pierre; LEMIEUX, Isabelle. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 881-887, 2006.

FESTI, D.; COLECCHIA, A.; SACCO, T. *et al.* Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. **Obesity Reviews**, v. 5, n. 1, p. 27-42, 2004.

FICHMAN, V. **Investigando a associação da obesidade com a infertilidade**. 2018. 49 p. Dissertação (Mestre em Ciências) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

FONSECA, Miriam H.A.; TAKADA, Julie; ALONSO, Maria Isabel C.V. *et al.* O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

FUGGETTA, Maria Pia; ZONFRILLO, Manuela; VILLIVÀ, Cristina *et al.* Inflammatory Microenvironment and Adipogenic Differentiation in Obesity: The Inhibitory Effect of Theobromine in a Model of Human Obesity In Vitro. *Mediators of Inflammation*, p. 1-10, 2019.

GARTNER, Leslie P; HIATT, James L. **Tratado de histologia em cores**. 3. ed. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier, 2007.

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFMG. Curso de Férias “Câncer: Desafios do século XXI” ocorre dia 15 a 19 de julho de 2019. **ICB-UFMG**. Disponível em: <<https://www.icb.ufmg.br/en/rss-noticias/2136-curso-de-ferias-cancer-desafios-do-seculo-xxi-ocorre-dia-15-a-19-de-julho-de-2019>>. Acesso em: 18 out. 2019.

JAIS, Alexander; BRÜNING, Jens C. *et al.* Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 127, n. 1, p. 24-32, 2017.

JUNQUEIRA, L. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. 1. ed. São Paulo: Santos, 1983.

KAHN, S. E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*, v. 46, n. 1, p. 3-19, 2003.

KAUR, Navrinder; CHUGH, Heerak; TOMAR, Vartika *et al.* Cinnamon attenuates adiposity and affects the expression of metabolic genes in Diet-Induced obesity model of zebrafish. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 47, n. 1, p. 2930-2939, 2019.

LEIBOLD, Sandra; HAMMERSCHMIDT, Matthias. Long-Term Hyperphagia and Caloric Restriction Caused by Low-or High-Density Husbandry Have Differential Effects on Zebrafish

Postembryonic Development, Somatic Growth, Fat Accumulation and Reproduction. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. e0120776, 2015.

LEVENE, Adam P; GOLDIN, Robert D. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. **Histopathology**, v. 61, n. 2, p. 141-152, 2012.

MEGURO, Shinichi; HASUMURA, Takahiro; HASE, Tadashi. Body fat accumulation in zebrafish is induced by a diet rich in fat and reduced by supplementation with green tea extract. **PlosOne**, v. 10, n. 3, p. e0120142, 2015.

MELO, MARIA EDNA. Doenças Desencadeadas ou Agravadas pela Obesidade. **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica – ABESO**, 2011.

MOSCHOS, Stergios; CHAN, Jean L.; MANTZOROS, Christos S. Leptin and reproduction: a review. **FertilityandSterility**, v. 77, n. 3, p. 433-444, 2002.

MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. 2. ed. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010.

NISHIMURA, Yuhei *et al.* Zebrafish as a systems toxicology model for developmental neurotoxicity testing. **Congenital anomalies**, v. 55, n. 1, p. 1-16, 2015.

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.

ORIO F, Muscogiuri *et al.* Obesity, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease risk: nuptodate in the management of polycystic ovary syndrome. **European Journal of Obstetrics e Gynecology and Reproductive Biology**, v. 207, p. 214-219, 2016.

SCIENCE IN THE NEWS. The Big Eater: How the immune system alters the pancreas during obesity. **ScienceintheNews**, Disponível em: <<http://sitn.hms.harvard.edu/flash/2019/the-big-eater-how-the-immune-system-alters-the-pancreas-during-obesity/>>. Acesso em: 18 out. 2019.

SELI, Emre *et al.* Minireview: metabolism of female reproduction: regulatory mechanisms and clinical implications. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 6, p. 790-804, 2014.

SPERETTA, Guilherme Fleury; LEITE, Richard Diego; DUARTE, Ana Cláudia de Oliveira. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 13, n. 1, 2014.

STEWART, Jessica E.; FEINLE-BISSET, Christine; KEAST, Russell S.J. Fatty acid detection during food consumption and digestion: Associations with ingestive behavior and obesity. **Progress in Lipid Research**, v. 50, n. 3, p. 225-233, 2011.

STOLETOV, Konstantin; FANG, Longhou; CHOI, Soo-Ho *et al.* Vascular Lipid Accumulation, Lipoprotein Oxidation, and Macrophage Lipid Uptake in Hypercholesterolemic Zebrafish. **Circulation Research**, v. 104, n. 8, p. 952-960, 2009.

UFMG. UFMG é a terceira melhor universidade brasileira no ranking THE. **Universidade Federal de Minas Gerais**. Disponível em: <<https://ufmg.br/comunicacao/noticias/ufmg-e-a-terceira-melhor-universidade-brasileira-no-ranking-the>>. Acesso em: 18 out. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. WHO/FAO. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42665/1/WHO_TRS_916.pdf> Acesso em: out. 2019.

YANG, Zhenyu; HUFFMAN, Sandra L. Nutrition in pregnancy and early childhood and associations with obesity in developing countries. **Maternal & Child Nutrition**, v. 9, p. 105-119, 2012.

YE, Cheng; LIU, Ling; MA, Xiao *et al.* Obesity Aggravates Acute Pancreatitis via Damaging Intestinal Mucosal Barrier and Changing Microbiota Composition in Rats. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

ZANG, Liqing; SHIMADA, Yasuhito; NISHIMURA, Norihiro. Development of a novel zebrafish model for Type 2 diabetes mellitus. **Scientificreports**, v. 7, n. 1, p. 1461, 2017.

ZANG, Liqing; MADDISON, Lisette A.; CHEN, Wenbiao. Zebrafish as a model for obesity and diabetes. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 6, p. 91, 2018.

ZHANG, Mei; YANG, Xiao-Jiao. Effects of a high fat diet on intestinal microbiota and gastrointestinal diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 40, p. 8905, 2016.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) INDUZIDO A OBESIDADE

Amanda Maria Siqueira Moreira¹, Bárbara do Carmo Rodrigues Virote¹, Cristina Delarete Drummond², André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna³, Luis David Solis Murgas^{1*}

1 Departamento de Medicina Veterinária, Biotério Central - Ala de Peixes, Universidade Federal de Lavras (UFLA) Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brasil.

2 Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Lavras (UFLA) Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brasil.

3 Departamento de Biociências, Universidade Federal do Paraná, Palotina, Paraná, 85950-000, Brasil.

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

Palavras-chave: Superalimentação; Histologia; Sobrepeso

RESUMO

A obesidade ocorre pelo acúmulo excessivo de gordura no corpo devido à alta ingestão alimentar. Esta condição acarreta em uma síndrome metabólica que causa grandes problemas no organismo. Diante disso, objetivou-se neste trabalho avaliar histologicamente o impacto desta enfermidade sobre alguns órgãos, utilizando o zebrafish (*Danio rerio*) como modelo. Foram usados 60 animais alocados em dois grupos, o Grupo Controle (C) que recebeu uma alimentação balanceada para a espécie e o Grupo Induzido a Obesidade (DIO), que recebeu uma superalimentação. Após oito semanas de alimentação os animais foram eutanasiados, fixados e foi utilizada a técnica de coloração com hematoxilina e eosina em secções do corpo inteiro para a avaliação microscópica dos órgãos. Foi realizado morfometria das estruturas corporais a partir do software ImajeJ. Como resultados foi observado o aumento de peso corporal, hipertrofia do tecido adiposo visceral e subcutânea, aumento da vacuolização dos hepatócitos, hiperglicemia, aumento das ilhotas pancreáticas nas fêmeas e aumento dos ovócitos vitelogênicos com uma maior fertilidade absoluta do grupo DIO em relação ao controle. Concluímos que a indução a obesidade no zebrafish, através de uma superalimentação, acarreta modificações morfológicas no tecido adiposo, mucosa intestinal, fígado, ilhotas pancreáticas e tecido ovariano.

1 INTRODUÇÃO

O sobrepeso é um problema de grande relevância para o sistema de saúde. A prevalência da obesidade tem crescido rapidamente e representa um dos principais desafios de saúde pública neste início de século (COUTINHO, 2007). Mesmo com os grandes avanços na ciência, ainda são necessários estudos para compreender as consequências e as vias de sinalização fisiológicas ligadas a essa doença. Além de causar o aumento do peso corporal, esta enfermidade também provoca disfunções em outros sistemas do corpo tais como sistema gastrointestinal, imune, reprodutor, acarretando assim alterações que podem ser observados a nível tecidual.

Entre as alterações morfológicas observadas, esta enfermidade leva ao acúmulo de lipídeos e multiplicação de células no tecido adiposo (FUGGETTA *et al.*, 2019). A absorção intestinal também pode ser alterada devido ao aumento da permeabilidade de sua mucosa (YE *et al.*, 2019). Além disso, a superalimentação pode acarretar no acúmulo de lipídeos no tecido hepático, gerando um quadro de Esteatose Hepática não Alcoólica (NAFLD) no fígado (CORDEIRO *et al.*, 2015). Também pode-se observar a ineficiência das células β e um estado de inflamação nas ilhotas pancreáticas (SCIENCE IN THE NEWS, 2019). Nota-se também alterações no sistema reprodutivo, uma vez que o aumento de peso interfere na secreção do hormônio leptina que participa do desenvolvimento gonadal, podendo alterar por exemplo, a formação dos ovócitos (LEIBOLD; HAMMERSCHMIDT, 2015).

Com tantas alterações sistêmicas, é fundamental o uso de modelos animais para melhorar a compreensão das consequências desse distúrbio. Foi demonstrado que o zebrafish (*Danio rerio*) induzido pela obesidade (DIO) compartilha caminhos patofisiológicos comuns com o sobrepeso em mamíferos (OKA *et al.*, 2010). Por causa de seu pequeno porte, as análises histológicas dos seus sistemas podem ser simplificadas, uma vez que o emblocamento por parafina pode ser feito do corpo todo do animal.

Portanto, o propósito deste trabalho foi a induzir obesidade através de uma superalimentação em zebrafish e avaliar as alterações morfológicas no tecido adiposo, intestino, fígado, pâncreas e gônadas femininas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O experimento foi realizado na Ala de Peixes do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras, MG. Todos os ensaios envolvendo o uso de peixes foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal incluídos nas normas da Comissão de Ética no Uso de Animais, tendo sido aprovado pela mesma e estando o projeto protocolado sob nº 084/2017. Quanto ao processamento histológico das amostras, foram feitas no Laboratório do Estudo da Interação Químico-Biológica e da Reprodução Animal (LIQBRA) – UFMG.

2.2 Manutenção dos animais

Foram utilizados 60 espécimes de zebrafish (*Danio rerio*), sendo 28 fêmeas e 32 machos, de aproximadamente seis meses de idade. Todos os animais foram mantidos em uma raque específica para a espécie (Rack Hidrus, modelo ZEB-40), em aquários de polycarbonato, com tamanho de 11,5 cm x 34,5 cm x 15,5 cm, que possuía um complexo de recirculação e limpeza automatizada. O sistema dispunha de aquários de 2,5L cada, nos quais acomodaram-se dez animais por aquário. Além disso, as matrizes foram mantidas em fotoperíodo com 14:10 (luz:escuro) (DAMMSKI *et al.*, 2011) e temperatura de 28°C durante o período experimental.

Quanto ao delineamento experimental, alocaram-se os animais em dois grupos, o Grupo Controle (C) que recebeu uma alimentação balanceada para a espécie e o Grupo induzido a obesidade, que recebeu uma superalimentação, sendo assim intitulado animais com obesidade induzida pela dieta (DIO). Para cada grupo, utilizaram-se dois aquários, totalizando seis aquários com cinco fêmeas e cinco machos em cada.

2.3 Metodologia de alimentação

A sistematização da alimentação fornecida para os animais foi baseada em um estudo feito por Zang *et al.* (2017) no qual os zebrafish DIO foram alimentados com 120 mg por peixe por dia de uma ração comercialmente disponível, Otohime B2, dividido em cinco alimentações. Já os zebrafish controle foram alimentados com 20 mg por peixe por dia de Otohime B2 dividido em duas alimentações.

A ração Otohime B2 contém um mínimo de 11% de gordura bruta, 51% de proteína bruta, 2,3% de cálcio bruto, 1,5% de fósforo, um máximo de 15% de cinza, 3% de petróleo

bruto fibra e 6,5% de umidade. O tamanho dos grânulos é de 0,36 a 0,65 mm e a densidade de energia é de 3,39 kcal / g.

Além da ração fornecida, os animais dos dois grupos também receberam uma quantidade de 1500 náuplios de *Artemia* por peixe por dia. Dessa forma a alimentação ofertada continha 428 calorias para o grupo DIO contra 88 calorias por peixe por dia para o grupo controle. O protocolo de alimentação foi executado durante oito semanas e os horários da alimentação estão descritos na Tabela 1. Para avaliar a massa corporal durante o período experimental, foi feita a medição e a pesagem dos animais semanalmente (OKA *et al.*, 2010).

Tabela 1- Protocolo do horário das alimentações

Tipo de alimentação	Grupo Controle	Grupo DIO
Ração	08:00	08:00
Ração	-	10:00
Ração	12:00	12:00
Ração	-	14:00
Ração	-	16:00
<i>Artemia sp.</i>	18:00	18:00

2.4 Reprodução

A reprodução dos peixes foi induzida semanalmente durante oito semanas nos grupos controle e DIO. Como protocolo de reprodução utilizado, os animais foram removidos da rack e alocados em ambiente adequados para a reprodução. Um dia antes da desova, machos e fêmeas foram separados (proporção de 1:1). Na manhã do dia seguinte, antes do final do período escuro, os animais foram misturados no mesmo local, e após 2 horas os embriões foram coletados e colocados em placas de Petri (50 embriões por placa) contendo o meio *Egg water* (GALINDO-VILLEGAS *et al.*, 2012).

2.5 Análises bioquímicas

No final da oitava semana de alimentação foram realizadas as análises bioquímicas de glicemia, imediatamente após a eutanásia ser realizada por meio de anestésico com benzocaína (250mg/L-1por imersão em solução aquosa).

Foram selecionados, aleatoriamente, seis machos e seis fêmeas em jejum de 12 horas de cada grupo e utilizados para avaliar a glicemia. O sangue foi coletado através da punção da veia caudal (CASTRO *et al.*, 2018) e a glicose corporal (mg/dL) foi avaliada com um glicosímetro (Accu-check Active®).

2.6 Análises Histológicas

Após o período de 8 semanas de alimentação, oito fêmeas e dez machos de cada grupo foram anestesiados e posteriormente eutanasiados conforme a regulamentação do comitê de ética. Em seguida foi realizada a fixação dos indivíduos em formaldeído a 10%, para manter as estruturas e evitar a deterioração dos tecidos. Os animais foram seccionados no eixo transversal, cranial à barbatana pélvica. Posteriormente os espécimes foram desidratados em uma série de álcoois, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os blocos obtidos permitiram o seccionamento dos corpos inteiros em espessura 5 µm. O nível de seccionamento foi padronizado estabelecendo a posição dos órgãos de interesse na cavidade abdominal. As lâminas foram coradas em coloração rotineira, hematoxilina e eosina (HE). E a partir das imagens digitais, de três lâminas por peixe feitas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) - UFLA pelo Microscópio Invertido De Epifluorescência Zeiss Observer Z1, foram analisados os órgãos separadamente: tecido adiposo, intestino, fígado, pâncreas e gônada feminina. Todas as análises foram realizadas utilizando o software ImageJ® (Image-Pro Plus® versão 7.01; National Institutes Of Health, Bethes da, Maryland, USA).

2.6.1 Análise Histomorfológica do Tecido Adiposo

Para a análise do tecido adiposo foi aferido os menores e maiores diâmetros de cada adipócito para calcular o diâmetro médio dos adipócitos localizados nos compartimentos subcutâneos e viscerais pela lente objetiva de 40x (LEIBOLD; HAMMERSCHMIDT, 2015).

2.6.2 Análise Histomorfológica do Intestino

Para a avaliação morfométrica do intestino, foram identificadas três porções intestinais de cada lâmina pela lente objetiva de 10x, observou-se também diferenças morfológicas entre esses seguimentos. Dessa forma dividimos este órgão em porção anterior, média e posterior, como condizente com a descrição anatômica feito por Wallace *et al.* (2005). Foram mensurados o diâmetro intestinal, a altura das vilosidades intestinais, contagem de vilosidades por porção intestinal e a largura das vilosidades intestinais como descrito por (CEREZUELA *et al.*, 2012).

2.6.3 Análise Histomorfológica do Fígado

Para avaliar a atividade hepática, foram analisados três campos da região hepática pela lente objetiva de 40x. Os parâmetros utilizados foram a medição da área de vacuolização dos hepatócitos (RASKOVIC *et al.*, 2011), calculando a área preenchida pelas vacuolizações dos hepatócitos.

2.6.4 Análise Histomorfológica do Pâncreas

Para se investigar os efeitos da obesidade no pâncreas, avaliou-se a morfometria das ilhotas pancreáticas presentes em cada lâmina pela lente objetiva de 10x. A fim de calcular o diâmetro médio das ilhotas (FRANTZ *et al.*, 2013).

2.6.5 Análise Histológica das Gônadas Femininas

Foi identificado o estágio de maturação das gônadas de acordo com a classificação Vazzoler (1996): imaturo (estádio A), em maturação (estádio B) e maduro (estádio C). Durante o processo de maturação do folículo ovariano, podem-se observar mudanças na sua morfologia e na sua constituição química, que caracteriza os cinco estádios de maturação distintas no seu desenvolvimento (SCHULTZ *et al.* 2002). Células pequenas, em ninhos, chamadas ovogônias (Fase I ou Cromatina-nucleolar). Células foliculares pavimentosas que envolvem o ovócito (Fase II ou Perinucleolar). Vesículas citoplasmáticas na periferia do ovócito (Fase III ou Formação da Vesícula Vitelínica). Inclusão citoplasmática no ovócito de vesículas citoplasmáticas e os grânulos de vitelo (Fase IV ou Vitelogênese). O ovócito sofre um aumento de volume; o citoplasma apresenta-se repleto de grânulos de vitelo (Fase V ou Maduro) (VAZZOLLER,1996; COSTA *et al.*, 2005; OECD, 2010). Foi identificado três campos do tecido gonadal pela lente objetiva de 10x, contabilizado as diferentes fases de maturação dos folículos em cada tratamento e depois feito a morfometria, a partir do diâmetro médio, de cada tipo de folículos diferentes estágios de maturação (VAN DER VEN *et al.*, 2003).

2.7 Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk, atendido ao pressuposto foi realizada análise de variância (ANOVA) pelo programa Minitab[®] versão 1.8 (Minitab LLC, Stage College, PA).

3 RESULTADOS

3.1 Peso Corporal

No início do experimento, os animais não diferiram no peso corporal ($P > 0.05$). Observamos que o protocolo de superalimentação em machos e fêmeas levou a um aumento gradual e contínuo no peso corporal, com aumento significativo no grupo DIO em comparação com o grupo Controle a partir da sétima semana, tanto para machos quanto para as fêmeas. Na oitava semana de tratamento, os machos do grupo DIO apresentaram peso corporal 20% maior que os machos do grupo Controle ($P < 0,05$). Na mesma semana, as fêmeas do grupo DIO apresentaram peso corporal 25% maior que os fêmeas do grupo Controle ($P < 0,05$) (Figura 1).

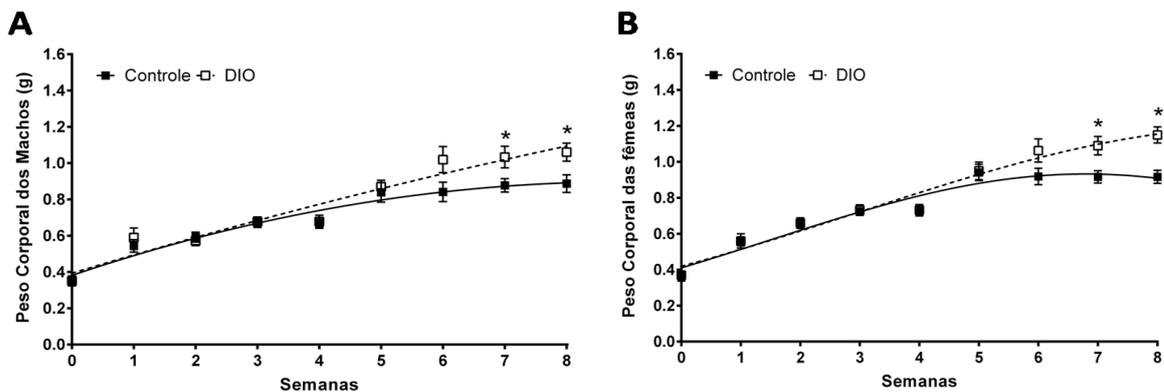


Figura 1- Peso corporal. Evolução do peso corporal durante oito semanas de protocolo experimental com quantidade adequada de ração indicada para zebrafish (Controle) ou superalimentação (DIO), em machos (A) e fêmeas (B). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão, $n = 15$. (*) significa diferenças significativas ($P < 0.05$) em comparação ao grupo controle.

3.2 Reprodução

Efeitos da obesidade na capacidade de reprodução do zebrafish - Desova total

Durante as 8 semanas experimentais, os animais desovaram semanalmente. A desova total durante o experimento foi 59% maior ($P < 0,05$) no grupo DIO em comparação ao grupo C (Figura 2).

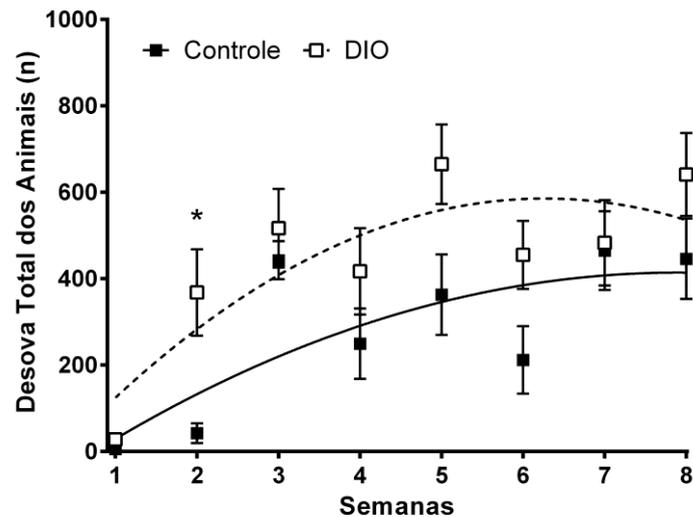


Figura 2- Desova total (n) dos grupos DIO e Controle durante as oito semanas de alimentação. Todos os valores são uma média \pm erro médio padrão (*) são significativamente diferentes entre os grupos ($P < 0,05$).

3.3 Análises Bioquímicas

Comparado ao grupo Controle, machos e fêmeas do grupo DIO mostraram aumentos nos níveis de glicose no sangue no final da oitava semana, com aumento de 143% nos machos ($P < 0,05$) e aumento de 201% nas fêmeas ($P < 0,05$) (Figura 3).

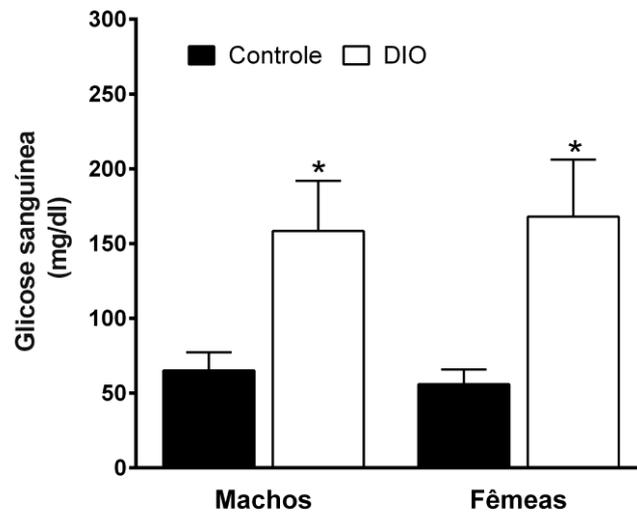


Figura 3- Avaliação bioquímica dos pais. Avaliação da glicemia em machos ($P = 0.0031$, $n = 6$) e fêmeas ($P = 0.003$, $n = 6$). Todos os valores são uma média \pm erro médio padrão (*) são significativamente diferentes entre os grupos na semana indicada. ($P < 0.05$).

3.4 Análises Histológicas

Tecido adiposo

Através da análise morfométrica, verificou-se aumento do tamanho dos adipócitos nos compartimentos subcutâneo e visceral, em machos e fêmeas do grupo DIO em relação aos seus correspondentes do grupo Controle. Os machos do grupo DIO apresentaram aumento no tamanho dos adipócitos subcutâneo (+ 28%; $P < 0,05$) e visceral (+ 35%; $P < 0,05$). As fêmeas do grupo DIO apresentaram aumento no tamanho dos adipócitos subcutâneo (+ 43%; $P < 0,05$) e visceral (+ 47%; $P < 0,05$) (Figura 4).

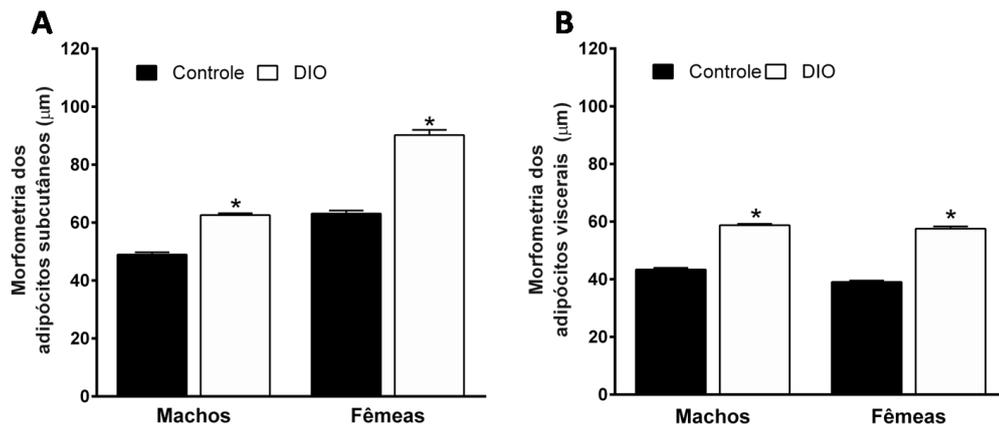


Figura 4- Avaliação do tecido adiposo. Avaliação do tecido adiposo visceral e subcutâneo no final da última semana de alimentação. Avaliação dos adipócitos subcutâneo de machos ($P < 0,05$; $n = 8$) e fêmeas (A). Avaliação dos adipócitos viscerais de machos ($P < 0,05$)

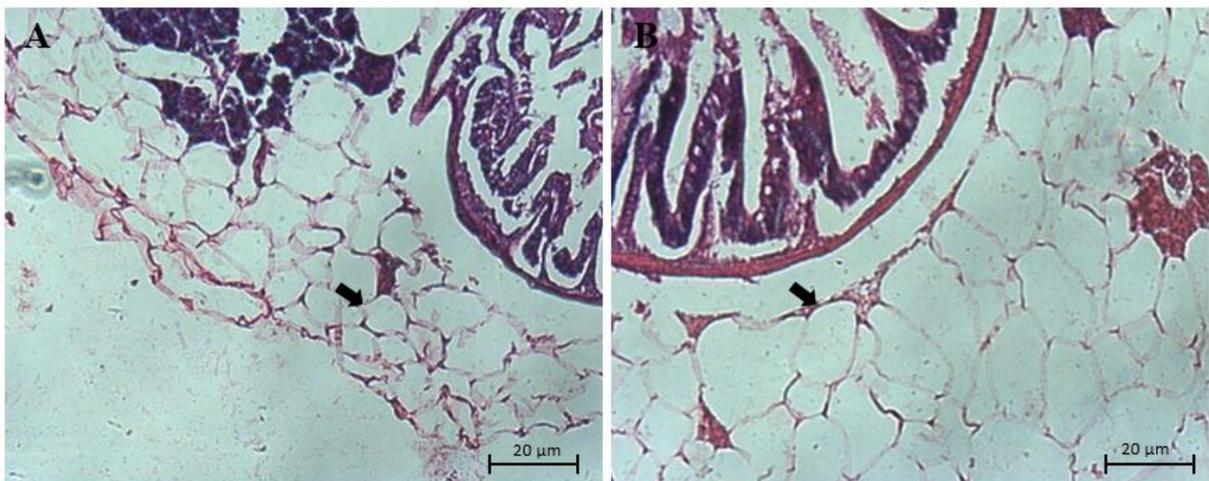


Figura 5- Corte histológico do tecido adiposo em fêmeas. Grupo controle (A) e grupo DIO (B). Aumento do citoplasma dos adipócitos no grupo DIO (setas).

Intestino

Foi observado que os machos DIO tiveram um aumento na altura das vilosidades da porção média de 10% em relação ao grupo controle, mas na porção anterior, o grupo controle teve um aumento de 21% em relação ao grupo DIO. Em relação a largura das vilosidades, houve um aumento de 12% apenas na porção anterior do grupo controle, enquanto o diâmetro médio do intestino do grupo DIO apresentou aumento de 32% apenas da porção média. Em relação as fêmeas DIO, houve um aumento de 42% apenas no número de vilosidades da porção media do intestino ($P < 0,05$) (Tabela 2)

Tabela 2 - Análises morfométricas do intestino dos grupos Controle e DIO.

VARIÁVEIS	INTESTINO ANTERIOR		INTESTINO MÉDIO	
	CONTROLE	DIO	CONTROLE	DIO
Altura das Vilosidades das Fêmeas	147±8a	134±3a	121±4a	112±5a
Altura das Vilosidades dos Machos	156±5a	129±4b	108±3a	119±4b
Largura das Vilosidades das Fêmeas	66±3a	73±2a	56±2a	62±3a
Largura das Vilosidades dos Machos	66±3a	58±3b	59±3a	63±2a
Número de Vilosidades das Fêmeas	9±1a	9±0,6a	7±0,5a	10±0,7b
Número de Vilosidades dos Machos	9±0,6a	9±0,5a	8±0,9a	6±0,9a
Diâmetro Médio do Intestino das Fêmeas	596±31a	604±50a	674±29a	664±38a
Diâmetro Médio do Intestino dos Machos	481±28a	473±30a	662±24a	498±17b

Todos os valores estão em μm e são médias \pm erro padrão da média. ($P < 0.05$). Valores com diferentes sobrescritos nas linhas para cada porção intestinal são significativamente diferentes entre os tratamentos ($P < 0.05$).

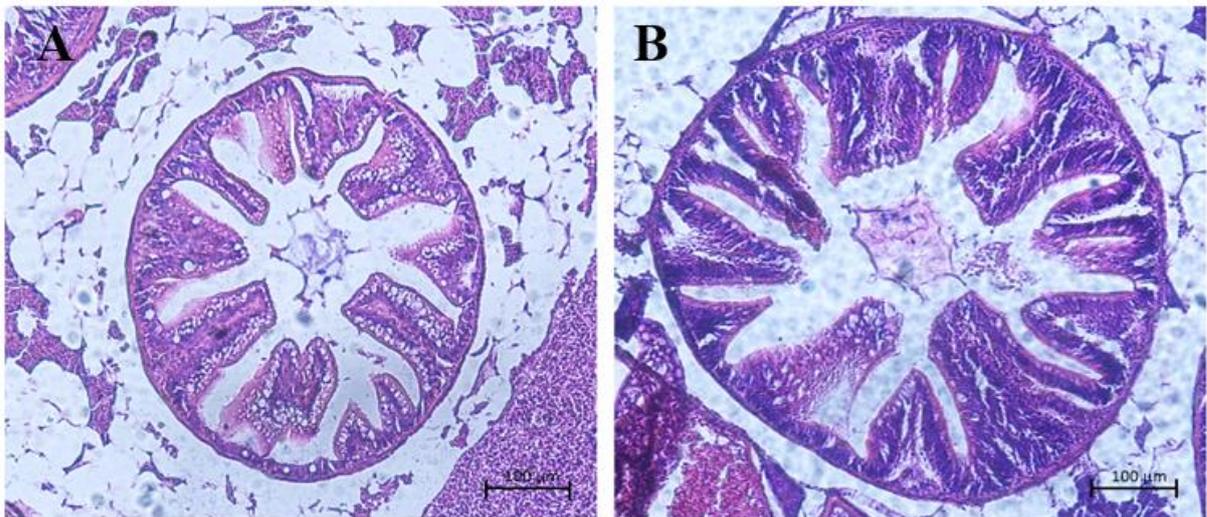


Figura 6- Corte histológico da porção anterior do intestino de machos. Grupo controle (A) e Grupo DIO (B). Aumento do número das vilosidades intestinais no grupo DIO.

Fígado

Comparado ao grupo Controle, machos e fêmeas do grupo DIO mostraram aumentos da vacuolização dos hepatócitos no final da oitava semana, com aumento de 49% nos machos ($P < 0,05$) e aumento de 28% nas fêmeas ($P < 0,05$) (Figura 7).

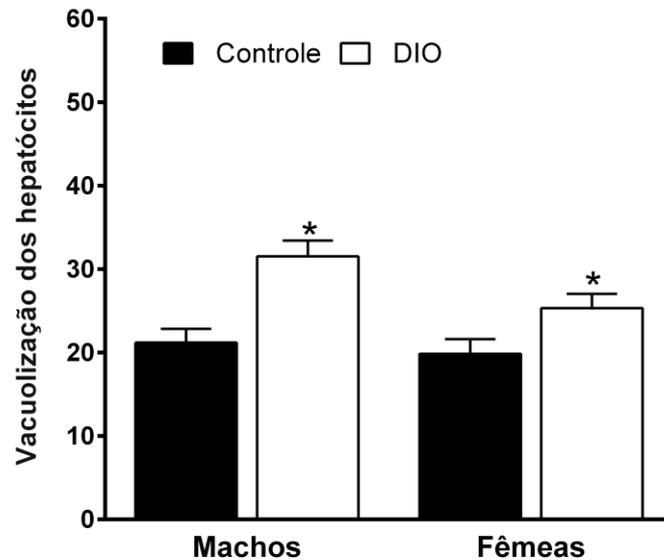


Figura 7- Avaliação do tecido hepático no final da última semana de alimentação. Avaliação da vacuolização de hepatócitos em machos zebrafish ($P < 0,05$; $n = 8$) e fêmeas ($P < 0,05$; $n = 10$). Todos os valores são uma média \pm erro médio padrão (*) são significativamente diferentes entre os grupos na semana indicada. ($P < 0,05$).

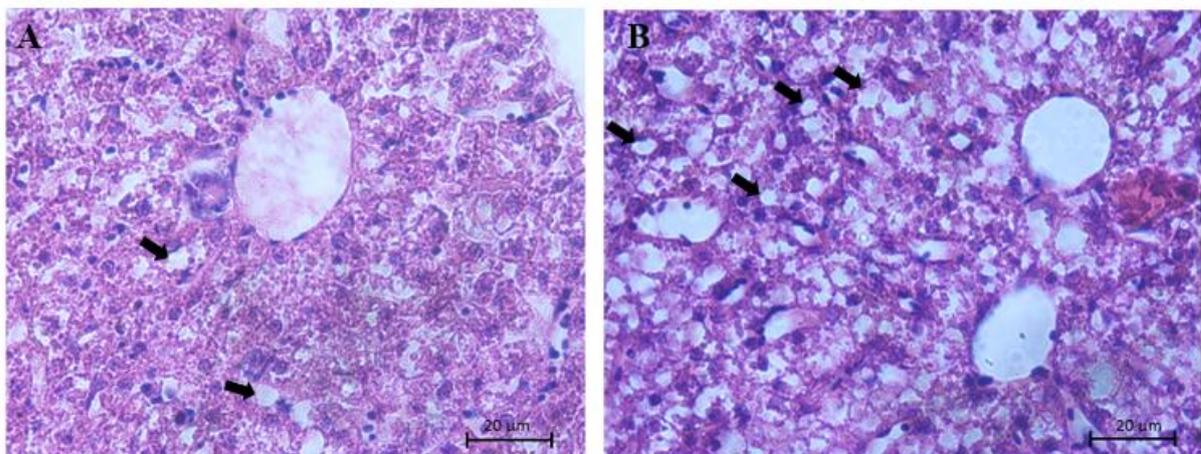


Figura 8- Corte histológico do Fígado de fêmeas. Alterações histopatológicas em fígado de zebrafish (*Danio rerio*) em coloração HE. Grupo controle (A) e grupo DIO (B) com presença de vacuolizações (setas pretas) no citoplasma dos hepatócitos

Pâncreas

Através da análise morfométrica, verificou-se aumento de 42% do tamanho das ilhotas pancreáticas das fêmeas do grupo DIO em relação as fêmeas do grupo Controle ($P < 0,05$). Os machos do grupo DIO não apresentaram aumento significativo das ilhotas em relação os machos do grupo Controle ($P < 0,05$) (Figura 9).

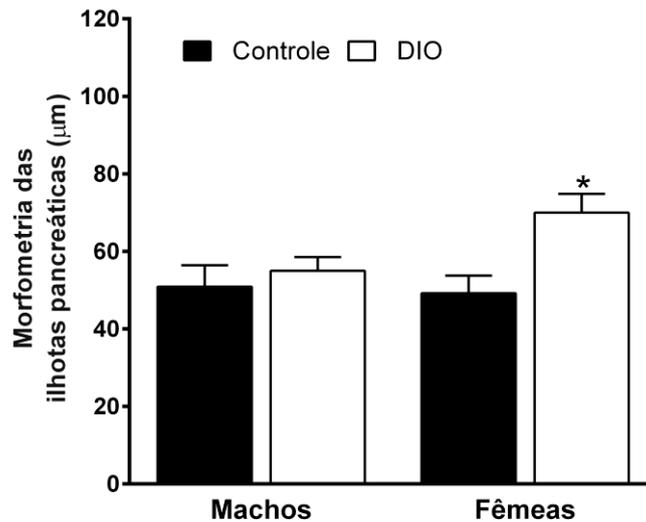


Figura 9- Avaliação do tecido pancreático no final da última semana de alimentação. Avaliação da morfometria das ilhotas pancreáticas de machos ($P > 0,05$; $n = 8$) e fêmeas ($P < 0,05$; $n = 10$). Todos os valores são uma média \pm erro médio padrão (*) são significativamente diferentes entre os grupos na semana indicada. ($P < 0,05$).

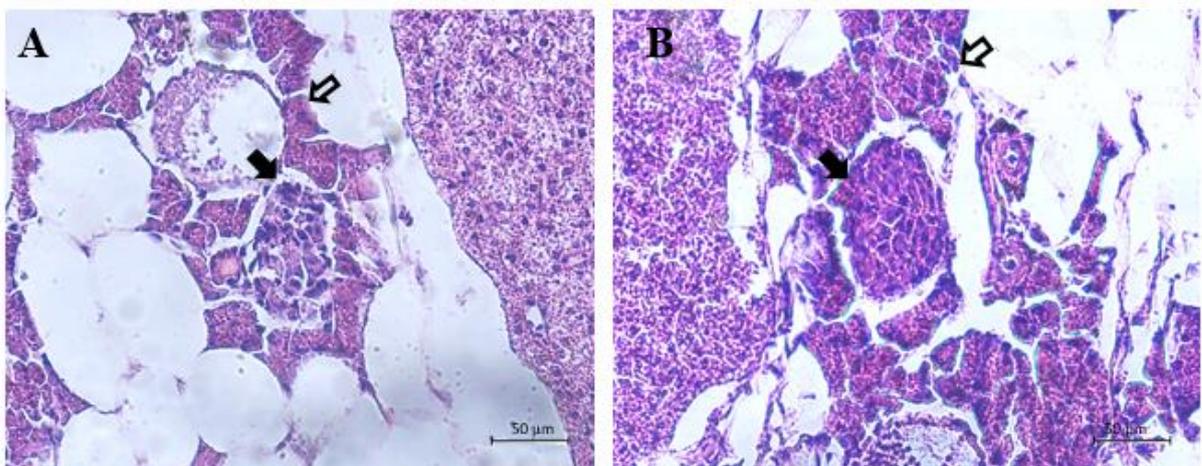


Figura 10- Corte histológico do pâncreas de fêmeas. Alterações histopatológicas do pâncreas de zebrafish (*Danio rerio*) em coloração HE. Grupo controle (A) e grupo DIO (B). Ilhota pancreática (seta preenchida) e porção exócrina do pâncreas (seta não preenchida).

Gônadas Femininas

Nos dois grupos, todas as fêmeas estavam no estágio de desenvolvimento ovariano maduro (estágio C), pois possuíam maior quantidade de ovócitos na fase madura (fase V). Não houve diferença estatística na contagem dos diferentes tipos de ovócitos entre os tratamentos ($P > 0.05$). Em relação a morfometria dos ovócitos, as fêmeas do grupo DIO apresentaram um aumento de 10% dos ovócitos vitelogênicos (Fase IV) e de 28% dos ovócitos maduros (Fase V) ($P < 0.005$) em relação às fêmeas do grupo controle (Figura 11).

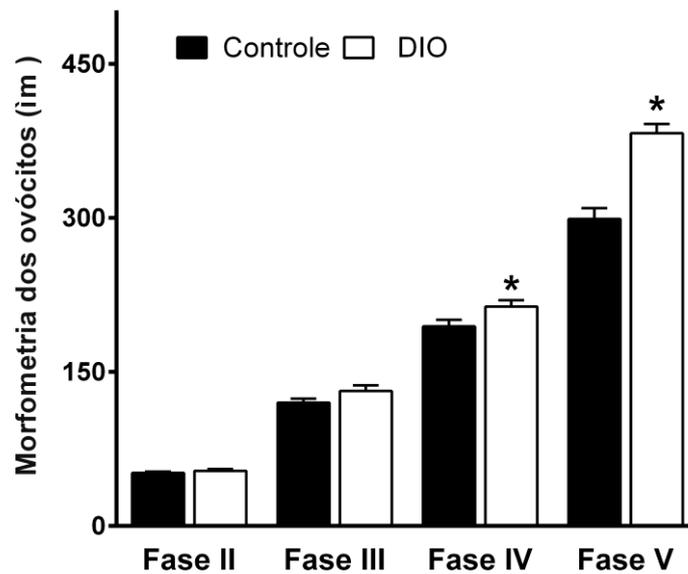


Figura 11- Avaliação do tamanho dos ovócitos. Análise das fêmeas do grupo DIO em relação ao grupo Controle no zebrafish. Morfometria dos ovócitos perinucleares (Fase II) ($P < 0,05$). Morfometria de ovócitos com formação de vesícula vitelina (Fase III) ($P < 0,05$). Morfometria dos ovócitos vitelogênicos (Fase IV) ($P < 0,05$). Morfometria de ovócitos maduros (Fase V) ($P < 0,05$). Todos os valores são uma média \pm erro médio padrão (*) são significativamente diferentes entre os grupos ($P < 0.05$).

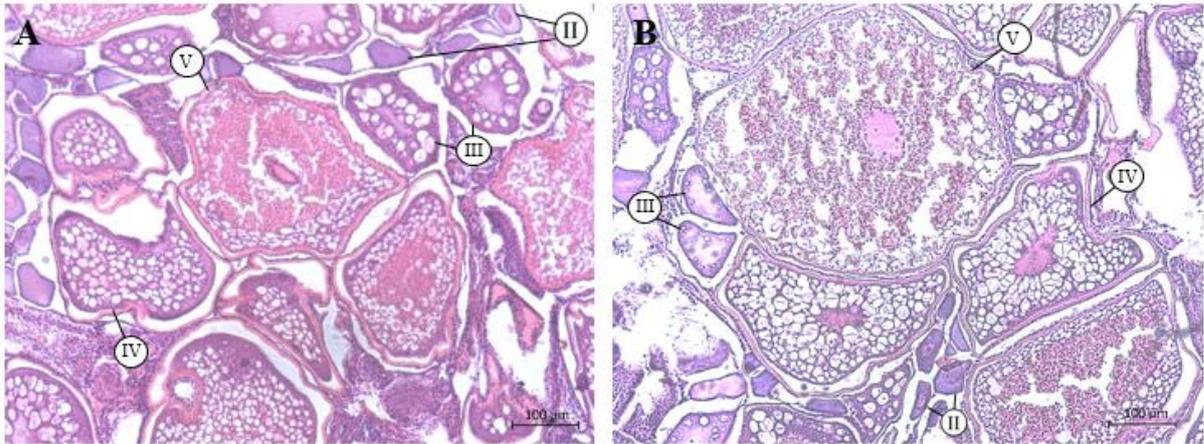


Figura 12- Corte histológico do ovário. Alterações morfométricas dos ovócitos de zebrafish (*Danio rerio*) em coloração HE. Grupo controle (A) e grupo DIO (B). II- Fase perinuclear. III- Fase de formação da vesícula vitelínica. IV- Fase vitelogênica. IV- Fase ovócito maduro.

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicam que a obesidade induzida através da superalimentação no zebrafish causa o aumento de peso corporal, hipertrofia do tecido adiposo, hiperglicemia, aumento das vilosidades intestinais e das vacuolizações dos hepatócitos. Análises microscópicas revelaram que a superalimentação também acarretou aumento das ilhotas pancreáticas nas fêmeas. No que se refere às gônadas femininas, o sobrepeso aumentou a área dos ovócitos vitelogênicos (Fase IV) e maduros (Fase V) com uma melhor desova no grupo DIO.

Os machos e as fêmeas do grupo DIO tiveram acréscimo do peso corporal a partir da sétima semana, em comparação ao grupo controle. Isto ocorreu, em partes, pela superalimentação do zebrafish adulto que leva ao aumento no peso corporal, devido ao acúmulo de gordura no corpo (LANDGRAF *et al.*, 2017).

Resultado semelhante foi observado por Zang *et al.* (2017), do qual nos baseamos para o protocolo de alimentação, que constatou com a superalimentação um aumento do peso corporal do grupo DIO. Demonstrando que o protocolo utilizado é viável para o aumento do peso corporal no zebrafish.

A obesidade tem como principal característica a hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo (ZANG *et al.*, 2018). Os adipócitos do zebrafish possuem características

histológicas semelhantes às descritas para adipócitos de mamíferos, como uma gota única de lipídeo, o citoplasma escasso e núcleo periférico (IMRIE *et al.*, 2010). Nesses animais, as gotas lipídicas aparecem primeiramente em adipócitos viscerais e acumulam-se ao longo do crescimento (ZANG *et al.*, 2018).

O efeito hipertrófico indica que os adipócitos são células susceptíveis ao armazenamento de triglicerídeos da dieta no citoplasma no zebrafish (LEIBOLD; HAMMERSCHMIDT, 2015). Dessa forma a gordura visceral excessiva predispõe à síndrome metabólica, associada à outras doenças como diabetes (AHIMA; LAZAR, 2013).

Já a diferença sexo-específica sugere que as fêmeas são mais sujeitas à deposição de gordura, devido a vitelogenese (LEIBOLD; HAMMERSCHMIDT, 2015). Isto é semelhante ao resultado encontrado por Meguro *et al.* (2015), que observou que a gordura subcutânea em fêmeas obesas era significativamente mais elevada do que nos machos.

No que se refere ao trato gastrointestinal, este é um sistema complexo que desempenha um papel fundamental na digestão, absorção e osmoregulação (CEREZUELA *et al.*, 2012). Análises histológicas e imunohistoquímicas revelaram que a organização geral do sistema nervoso entérico e a anatomia do tecido conjuntivo e camadas musculares lisas dentro do intestino de zebrafish são comparáveis aos mamíferos (WALLACE *et al.*, 2005). O intestino do zebrafish consiste em um tubo longo que se dobra duas vezes na cavidade abdominal (MENKE *et al.*, 2011). Wang *et al.* (2010) mostrou que o zebrafish é regionalmente segmentado em um intestino delgado e intestino grosso.

As partes no intestino analisadas (porção anterior e média) são compatíveis com o intestino delgado, ou seja, nestes locais ocorria a absorção de nutrientes pelos enterócitos. O aumento das vilosidades intestinais pode ser devido à alta ingestão de alimento pelos animais do grupo DIO. Isto ocorre, pois, o trato digestório dos animais tende a se modificar conforme a alimentação ofertada. Portanto o estudo da morfologia intestinal pode indicar a adaptação dos peixes a alimentação a longo prazo (HONORATO *et al.*, 2013).

O fígado é outro órgão essencial e realiza várias atividades vitais, como metabolização, síntese e armazenamento, sendo considerado um bom indicador de patologia devido à sua função em metabolizar produtos provenientes do trato digestivo. (OLIVEIRA, 2015; RASKOVIC *et al.*, 2011). A avaliação histológica do fígado é muitas vezes necessária para vários fins, como o diagnóstico de hepatite induzida por drogas e doença hepática gordurosa não alcoólica, ou para avaliar a gravidade dos danos na hepatite crônica (MARCOS *et al.*, 2012).

O zebrafish é constantemente usado para investigações das alterações hepáticas causadas pela obesidade. Foi observado que os machos e as fêmeas do grupo DIO apresentaram aumento na vacuolização dos hepatócitos. Esse resultado sugere que a vacuolização pode ter ocorrido devido ao acúmulo de gordura no citoplasma dessas células. Uma hipótese para esse resultado é o fato da resistência insulínica, causada pelo aumento da glicemia que foi encontrada também nos animais do grupo DIO, desempenhar um papel central no acúmulo de triglicérides dentro dos hepatócitos (FESTI *et al.*, 2004). Essa resistência é o principal fator de risco na patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) (CORDEIRO *et al.*, 2015).

A histopatologia é um ótimo padrão para avaliar a severidade de danos no fígado com NAFLD (LEVENE; GOLDIN, 2012). Estudo realizado em humanos observou, por biopsia hepática, que 30% dos indivíduos obesos apresentavam NAFLD (CORDEIRO *et al.*, 2015). No estudo realizado por Oka *et al.* (2010) constatou que a superalimentação no zebrafish acarreta esteatose hepática corroborando com nossos resultados.

Já o pâncreas é o órgão que controla a homeostase dos níveis de açúcar circulante no sangue. A alta ingestão de açúcar, em um quadro de obesidade, resulta na disfunção da insulina e das células β pancreáticas, causando assim um quadro de hiperglicemia e diabetes melitus (BONORA, 2008).

A conservação da estrutura do pâncreas e do sistema de homeostase de glicose tornam o zebrafish útil para identificar novos alvos no pâncreas e doenças relacionadas, como diabetes (ZANG *et al.*, 2018).

As células β possuem característica de plasticidade, ou seja, uma capacidade de adaptação em resposta a condições fisiológicas e fisiopatológicas do aumento da demanda hormonal (MADDISON; CHEN, 2017). O aumento das ilhotas pancreáticas encontradas nas fêmeas do grupo DIO pode ser uma resposta a essa capacidade.

Outra hipótese para o aumento das ilhotas observado nas fêmeas do grupo DIO, foi devido ao hiperinsulinismo, sugerindo que, em condições pré-diabéticas, as células β ainda têm capacidade de responder a demandas funcionais aumentando sua proliferação (KLOUPPEL *et al.*, 1985).

Zang *et al.* (2017) estabeleceu um modelo para induzir a diabetes melitus e observou o aumento da glicemia e da massa de células β . Esses resultados também foram achados em roedores, Frantz *et al.* (2013) observou que as ilhotas pancreáticas eram afetadas pelo consumo da dieta de alto teor calórico.

No que se refere ao crescimento ovariano, as descrições sobre a foliculogênese e a vitelogênese em zebrafish mostraram os diferentes estágios do desenvolvimento do ovário e

também a deposição de vitelo nas fases mais desenvolvidas (DESHPANDE; PANCHARATNA, 2013).

O aumento do tamanho dos folículos mais desenvolvidos (fase IV e V), observados neste experimento, sugere que a ingestão calórica afeta principalmente a taxa de crescimento de oócitos, ao invés de números totais de oócitos (LEIBOLD; HAMMERSCHMIDT, 2015). Isso ocorre, pois, fêmeas reprodutoras necessitam de altas concentrações de ácidos graxos para produzir um maior número de ovócitos (KOLB *et al.*, 2018). Para isso há o estímulo da síntese hepática de vitelogenina, que é responsável pela vitelogênese ou acúmulo de vitelo nos oócitos (ALMEIDA, 2013).

Já o crescimento observado da desova resulta do desenvolvimento ovariano, uma vez que a reprodução feminina é priorizada sobre o crescimento somático e sobre o armazenamento de gordura (LEIBOLD; HAMMERSCHMIDT, 2015).

Resultados semelhantes foram encontrados por Leibold; Hammerschmidt, (2015), que observaram em zebrafish uma relação entre o aumento de peso e o tamanho dos oócitos devido a incorporação progressiva do vitelo produzido no fígado.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo foram observadas alterações no organismo do zebrafish causadas pela alimentação excessiva. A histologia permitiu compreender as desordens causadas por essa doença a nível microscópico do tecido adiposo, intestino, fígado, pâncreas, e gônadas femininas. Desta forma pôde-se afirmar que esta espécie é um modelo promissor para entender as consequências da obesidade, sendo necessários ainda, estudos futuros para compreender melhor as vias patológicas dessa desordem metabólica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMA, R. S.; LAZAR, M. A. The Health Risk of Obesity-Better Metrics Imperative. **Science**, v. 341, n. 6148, p. 856-858, 2013.

ALMEIDA, F.L. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 37, n. 2, p. 174-180, 2013.

BONORA, Enzo. Protection of pancreatic beta-cells: Is it feasible?, **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 18, n. 1, p. 74-83, 2008.

CASTRO, T. F. D. *et al.* Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult *Danio rerio* exposed to tebuconazole-based commercial product. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 62, p. 140-146, 2018.

CEREZUELA, R. *et al.* Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. **Cell and Tissue Research**, v. 350, n. 3, p. 477-489, 2012.

CORDEIRO, A.; PEREIRA, S. E.; SABOYA, C. J. *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease Relationship with Metabolic Syndrome in Class III Obesity Individuals. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-7, 2015.

COSTA, Ana Paula Ribeiro *et al.* Indicadores quantitativos da biologia reprodutiva de fêmeas de piau-vermelho no Rio Paraíba do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 8, p. 789-795, 2005.

COUTINHO, Walmir; DUALIB, Patrícia. Etiologia da obesidade. **Revista da ABESO**, v. 7, n. 30, p. 1-14, 2007.

DAMMSKI, A. P. *et al.* Zebrafish - Manual de criação em Biotério. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, p. 20-1, 2011.

DESHPANDE, Prasad A.; PANCHARATNA, Katti. Oogonial Proliferation, Oogenesis, Folliculogenesis And Vitellogenesis In The Ovary Of Zebrafish (*Danio rerio*): A Histological

And Histochemical Analysis. **International Journal of Current Research**, v. 5, n. 6, p. 1565-1567, 2013.

FESTI, D.; COLECCHIA, A.; SACCO, T. *et al.* Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. **Obesity Reviews**, v. 5, n. 1, p. 27-42, 2004.

FRANTZ, E.; MASCARENHAS, C.; Barreto, A. V.; AGUILA, M.; LACERDA, C. M. Renin-Angiotensin System Blockers Protect Pancreatic Islets against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Mice. **Plos One**, v. 8, p. 67192, 2013.

FUGGETTA, Maria Pia; ZONFRILLO, Manuela; VILLIVÀ, Cristina *et al.* Inflammatory Microenvironment and Adipogenic Differentiation in Obesity: The Inhibitory Effect of Theobromine in a Model of Human Obesity In Vitro. **Mediators of Inflammation**, p. 1-10, 2019.

GALINDO-VILLEGAS, J. G. *et al.* Regulation of immunity and disease resistance by commensal microbes and chromatin modifications during zebrafish development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 39, p. E2605-E2614, 2012.

HONORATO, Cláudia A.; ASSANO, Marcelo; CRUZ, Claudinei da *et al.* Histologia do intestino de tilápia do nilo alimentados com dietas contendo diferentes fontes de proteína. **Nucleus Animalium**, v. 5, n. 1, p. 103-111, 2013.

IMRIE, DRUSADLER, KIRSTEN C. White adipose tissue development in zebrafish is regulated by both developmental time and fish size. **Developmental Dynamics**, v. 239, n. 11, p. 3013-3023, 2010.

KLOUPPEL, Gunter; LOHR, Matthiashabich *et al.* Islet Pathology and the Pathogenesis of Type 1 and Type 2 Diabetes mellitus Revisited. **Pathology and Immunopathology Research**, v. 4, n. 2, p. 110-125, 1985.

KOLB, Amy; HILDEBRANDT, Friedhelm; LAWRENCE, Christian. Effects of Diet and Social Housing on Reproductive Success in Adult Zebrafish, *Danio rerio*. **Zebrafish**, v. 15, n. 5, p. 445-453, 2018.

LANDGRAF, Kathrin; SCHUSTER, Susanne; MEUSEL, Andrej *et al.* Short-term overfeeding of zebrafish with normal or high-fat diet as a model for the development of metabolically healthy versus unhealthy obesity. **BMC Physiology**, v. 17, n. 1, 2017.

LEIBOLD, Sandra; HAMMERSCHMIDT, Matthias. Long-Term Hyperphagia and Caloric Restriction Caused by Low-or High-Density Husbandry Have Differential Effects on Zebrafish Postembryonic Development, Somatic Growth, Fat Accumulation and Reproduction. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. e0120776, 2015.

LEVENE, Adam P; GOLDIN, Robert D. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. **Histopathology**, v. 61, n. 2, p. 141-152, 2012.

MADDISON, L.A.; CHEN, W. Modeling Pancreatic Endocrine Cell Adaptation and Diabetes in the Zebrafish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, 2017.

MARCOS, R.; MONTEIRO, ROGÉRIO R.A. *et al.* The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. **Journal of Anatomy**, v. 220, n. 4, p. 303-317, 2012.

MEGURO, Shinichi; HASUMURA, Takahiro; HASE, Tadashi. Body fat accumulation in zebrafish is induced by a diet rich in fat and reduced by supplementation with green tea extract. **PlosOne**, v. 10, n. 3, p. e0120142, 2015.

MENKE, Aswin L.; SPITSBERGEN, Jan M.; WOLTERBEEK, Andre P. M. *et al.* Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. **Toxicologic Pathology**, v. 39, n. 5, p. 759-775, 2011.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. (2010). Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. Guidelines for the Testing of Chemicals.

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.

OLIVEIRA, Letícia Batelli de. Descrições macro e microestruturais do fígado de zebrafish (*Danio Rerio*). 2015. 18p. Tese (Mestrado Em Saúde Animal) - UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, Brasília, 2015.

RASKOVIC, Bozidar; STANKOVIC, Marko; MARKOVIC, Zoran *et al.* Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. **Journal of Agricultural Sciences**, Belgrade, v. 56, n. 1, p. 87-100, 2011.

SCHULTZ, Rüdiger W.; MIURA, Takeshi. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 43-56, 2002.

SCIENCE IN THE NEWS. The Big Eater: How the immune system alters the pancreas during obesity. **ScienceintheNews**, Disponível em: <<http://sitn.hms.harvard.edu/flash/2019/the-big-eater-how-the-immune-system-alters-the-pancreas-during-obesity/>>. Acesso em: 18 out. 2019.

VAN DER VEN, Leo T. M.; WESTER, Piet W.; VOS, Jeff G. Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 908-913, 2003.

VAZZOLER, A. E. A. M. *et al.* Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. **Maringá: Eduem**, v. 169, 1996.

WALLACE, Kenneth N.; AKHTER, Shafinaz; SMITH, Erin M. *et al.* Intestinal growth and differentiation in zebrafish. **Mechanisms of Development**, v. 122, n. 2, p. 157-173, 2005.

WANG, Zhengyuan; DU, Jianguo; LAM, Siew *et al.* Morphological and molecular evidence for functional organization along the rostrocaudal axis of the adult zebrafish intestine. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 392, 2010.

YE, Cheng; LIU, Ling; MA, Xiao *et al.* Obesity Aggravates Acute Pancreatitis via Damaging Intestinal Mucosal Barrier and Changing Microbiota Composition in Rats. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

ZANG, Liqing; SHIMADA, Yasuhito; NISHIMURA, Norihiro. Development of a novel zebrafish model for Type 2 diabetes mellitus. **Scientificreports**, v. 7, n. 1, p. 1461, 2017.

ZANG, Liqing; MADDISON, Lisette A.; CHEN, Wenbiao. Zebrafish as a model for obesity and diabetes. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 6, p. 91, 2018.