

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Neurogénese em *Danio rerio*: Ação da obesidade e da genisteína

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Marta Elisabete Pinto Figueiredo

Orientadores: Ana Rita Álvaro
Sandra Mariza Monteiro



Vila Real, 2015

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Neurogénese em *Danio rerio*: Ação da obesidade e da genisteína

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Marta Elisabete Pinto Figueiredo

Orientadores: Ana Rita Álvaro
Sandra Mariza Monteiro

Composição do Júri:

Vila Real, 2015

AGRADECIMENTOS

Muitas foram as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. A todas, expresso o meu reconhecimento e gratidão pelo papel importante, direto ou indireto, no desenvolvimento deste estudo.

Ao Magnífico Reitor da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho prático.

Quero agradecer às Professoras Ana Rita Álvaro e Sandra Mariza Monteiro, por terem sido minhas orientadoras e me terem proposto este tema para a realização da minha dissertação. Obrigada pelo vosso tempo e pela vossa preciosa ajuda na realização deste trabalho, pelas horas passadas no laboratório, sempre muito animadas, e pela enorme partilha de conhecimento e paciência que tiveram comigo.

O meu agradecimento também à Doutora Ana Coimbra pelo apoio que me prestou sempre que foi preciso, e à Prof Doutora Manuela Matos pela ajuda disponibilizada e por permitir a utilização do equipamento para realizar as reações de qRT-PCR.

À D. Ana Fraga, técnica do laboratório de histologia, por toda a disponibilidade, boa disposição e carinho que me proporcionou durante todas as horas passadas no laboratório.

À Ana Luzio pelo conhecimento que me transmitiu, por toda a disponibilidade mostrada, pela ajuda incansável e conversas animadas que tivemos. À Marisa Mendonça que esteve sempre por perto para me ouvir a falar da minha dissertação e pelas horas intermináveis que passamos juntas no laboratório e fora dele. À Marisa Ribeirinho por estar sempre disponível para me receber em sua casa sempre que necessitei.

E não poderia terminar sem agradecer a toda a minha família e amigos, em especial ao meu Pai, à minha Irmã e ao meu namorado, por todo o amor, carinho e paciência que tiveram comigo durante todo este tempo.

RESUMO

A neurogênese é um processo que ocorre ao longo da vida, tendo já sido demonstrado na retina e cérebro da maioria dos vertebrados, e em particular nos peixes teleósteos. A obesidade pode afetar a neurogênese através da redução da capacidade de proliferação das células estaminais. Por outro lado, a genisteína, um fitoestrogênio que compete com os recetores de estrogênio, quando administrada exogenamente pode comprometer ou modular a neurogênese.

Este trabalho teve como principal objetivo a validação do peixe-zebra como um modelo para o estudo dos efeitos da obesidade, contribuindo simultaneamente, para esclarecer os efeitos da genisteína e da obesidade na neurogênese da retina e cérebro, deste modelo. Para tal, a proliferação celular e a presença de células estaminais foram avaliadas através da análise da expressão génica e imuno-marcação do antigénio nuclear de proliferação celular (PCNA) e fator de transcrição sox-2 (Sox-2).

A análise histológica da retina e cérebro revelou que as suas estruturas morfológicas não sofreram alterações devido à indução de obesidade ou à presença de genisteína. Na retina, a obesidade e a genisteína promoveram uma redução da expressão génica e uma diminuição de marcação positiva de PCNA e Sox-2. Contudo, no grupo de animais sujeitos em simultâneo a obesidade e genisteína, esta isoflavona revelou-se protetora promovendo um aumento da expressão do gene Sox-2. No cérebro, detetou-se uma diminuição da expressão génica e da marcação positiva para PCNA e Sox-2, em todas as condições de estudo.

Em conclusão, com o delineamento experimental utilizado neste trabalho podemos afirmar que a dieta hipercalórica fornecida aos animais, induz obesidade nos peixes-zebra. Adicionalmente, em conjunto, os dados sugerem que a obesidade reduz a neurogênese na retina e no cérebro de peixes-zebra e que a genisteína poderá contribuir para a atenuação dos efeitos provocados pela dieta hipercalórica, na retina.

Palavras-chave: Neurogênese; Obesidade; Genisteína; Retina; Cérebro; *Danio rerio*

ABSTRACT

Neurogenesis is a process that occurs throughout life and it has been demonstrated in vertebrate retina and brain, particularly in teleost fish. Obesity can affect neurogenesis by reducing the proliferation ability of stem cells. On the other hand, genistein, a phytoestrogen that, when administered exogenously, competes with estrogen receptors, potentially affecting or modulating neurogenesis.

The main aim of this study was the validation of zebrafish as a model to study the obesity effects, simultaneously contributing to clarify the effects of genistein and obesity in neurogenesis of the retina and brain, in this model. To this end, the cell proliferation and the presence of stem cells were evaluated through the analysis of gene expression and immunolabeling of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and sox transcription factor-2 (Sox-2).

Histological examination of the retina and the brain revealed that the morphological structures have not changed due to the induction of obesity and the presence of genistein. In the retina, obesity and genistein promoted a reduction in gene expression and a decrease in the positive labeling for PCNA and Sox-2. However, in the group of animals subjected simultaneously obesity and genistein, the isoflavone has proved to be protective promoting an increased expression of Sox-2 gene. In brain, a decrease of gene expression and positive labeling of PCNA and Sox-2 were detected, in all study conditions.

In conclusion, with the experimental design used in this work we can affirm that the high-calorie diet assigned to animals, induces obesity in zebrafish. Additionally, the data suggest that obesity reduces neurogenesis in the retina and brain of zebrafish and that genistein may contribute to reduce the effects of the high-calorie diet in the retina.

Keywords: Neurogenesis; Obesity; Genistein; Retina; Brain; *Danio rerio*.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
ABREVIATURAS	XV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Caraterização da espécie (<i>Danio rerio</i>)	1
1.1.1. Importância como modelo biológico.....	1
1.2. Retina.....	3
1.2.1. Morfologia.....	3
1.3. Cérebro.....	5
1.3.1. Morfologia.....	5
1.4. Neurogénese.....	7
1.4.1. Células estaminais/progenitoras	7
1.4.1.1. Nichos neurogénicos e células estaminais/progenitoras na retina	9
1.4.1.2. Nichos neurogénicos e células estaminais/progenitoras no cérebro .	10
1.4.2. Antigénio nuclear de proliferação celular (PCNA).....	11
1.4.3. Fator de transcrição Sox-2.....	11
1.5. Obesidade.....	12
1.5.1. Factores biológicos envolvidos na obesidade.....	13
1.5.2. Efeitos da obesidade na neurogénese	13
1.5.3. Recetor activador de proliferação do peroxissoma γ (PPAR- γ).....	14
1.6. Genisteína	15
1.6.1. Mecanismos de ação da genisteína na célula.....	16
1.6.2. Efeitos da genisteína na neurogénese	16
1.7. Objetivos.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS	19

2.1.	Delineamento experimental	19
2.2.	Recolha do material de estudo	20
2.3.	Preparação histológica	20
2.3.1.	Imunofluorescência	21
2.4.	Extração de RNA total de amostras de tecidos	22
2.4.1.	Verificação da integridade e quantificação de RNA	23
2.5.	Transcrição reversa	23
2.6.	Reação de polimerização em cadeia	24
2.7.	Reação de Polimerização em Cadeia em Tempo Real	25
2.8.	Tratamento estatístico	27
3.	RESULTADOS	29
3.1.	Indução de obesidade em <i>Danio rerio</i>	29
3.1.1.	Evolução do peso	29
3.1.2.	Análises histológicas do fígado	30
3.1.3.	Presença de PPAR- γ no fígado	31
3.1.4.	Avaliação da expressão génica de PPAR- γ no fígado	33
3.2.	Avaliação da neurogénese na retina	34
3.2.1.	Análise histológica da retina	34
3.2.2.	PCNA e Sox-2 na retina	35
3.2.3.	Avaliação da expressão génica de PCNA na retina	38
3.2.4.	Avaliação da expressão génica de Sox-2 na retina	39
3.3.	Cérebro	40
3.3.1.	Análise histológica do cérebro	40
3.3.2.	PCNA e Sox-2 no cérebro	41
3.3.3.	Avaliação da expressão génica de PCNA no cérebro	44
3.3.4.	Avaliação da expressão génica de Sox-2 no cérebro	45
4.	DISCUSSÃO	47
5.	CONCLUSÃO	53
6.	BIBLIOGRAFIA	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da organização da retina de vertebrados.....	4
Figura 2 – Esquema do cérebro de peixe zebra	5
Figura 3 – Esquema do Bolbo olfativo	6
Figura 4 – Classificação das células estaminais	8
Figura 5 – Esquema representativo da divisão de células estaminais	8
Figura 6 – Representação de uma secção sagital da região da margem ciliar.....	9
Figura 7 – Representação das áreas neurogênicas no cérebro.....	10
Figura 8 – Estrutura da genisteína (4,5,7 – trihidroxiisoflavona) e do 17 β -estradiol.....	15
Figura 9 – Gráfico representativo da evolução do peso dos animais durante 9 semanas de ensaio experimental (g de peixe por aquário).....	29
Figura 10 – Imagens representativas de fígado de <i>Danio rerio</i>	31
Figura 11 – Presença de PPAR- γ no fígado	32
Figura 12 – Expressão génica relativa do mRNA de PPAR- γ no fígado	33
Figura 13 – Cortes histológicos de retina	34
Figura 14 –Imunomarcção de PCNA e Sox-2 na retina dos grupos controlo e obesidade	36
Figura 15 – Imunomarcção de PCNA e Sox-2 dos grupos genisteína e obesidade + genisteína.....	37
Figura 16 – Expressão génica relativa do mRNA de PCNA na retina	38
Figura 17 – Expressão génica relativa do mRNA de Sox-2 na retina	39
Figura 18 – Cortes histológicos de cérebro	40
Figura 19 – Imunomarcção de PCNA e Sox-2 no cérebro dos grupos controlo e obesidade.....	42
Figura 20 – Imunomarcção de PCNA e Sox-2 no cérebro nos grupos genisteína e obesidade + genisteína.....	43
Figura 21 – Expressão génica relativa do mRNA de PCNA no cérebro.....	44
Figura 22 – Expressão génica relativa do mRNA de Sox-2 no cérebro	45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes e respetivos volumes utilizados para a síntese de cDNA	24
Tabela 2 – Sequência de nucleótidos utilizados na RT-PCR	25
Tabela 3 – Condições das reações de polimerização.....	25
Tabela 4 – Reagentes e quantidades necessárias, por amostra, para a reação de qRT-PCR com EVAGreen®	26
Tabela 5 – Diluições utilizadas para a construção de retas padrão	26

ABREVIATURAS

- ALA** – Ácido Linolénico
- ANOVA** – Análise de variância
- APS** – Peroxodissulfato de diamónio (*Ammonium peroxodisulfate*)
- BDNF** – Fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor*)
- bp** – Pares de bases (*base pairs*)
- BSA** – Albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*)
- cDNA** – DNA complementar (*complementary DNA*)
- CGZ** – Zona germinal circunferencial (*Circumferential Germinal Zone*)
- CMZ** – Margem ciliar (*Ciliary Marginal Zone*)
- C_t** – Ciclo limiar (*Threshold cycle*)
- CZ** – Zona central (*Central Zone*)
- DAPI** – 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DHA** – Ácido docosa-hexaenóico
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)
- dNTP** – Nucléotido trifosfato (*deoxynucleotide triphosphate*)
- DO** – Densidade ótica
- DWZ** – Zona branca interna (*Deep White Zone*)
- ECL** – Camada celular externa (*External Cellular Layer*)
- GL** – Camada glomerular (*Glomerular Layer*)
- ICL** – Camada celular interna (*Internal Cellular Layer*)
- MDB** – Tampão de dessalinização da membrana (*Membrane Desalting Buffer*)
- mRNA** – Ácido ribonucleico mensageiro (*messenger RNA*)
- Ómega-3EPA** – Ácido eicosapentaenóico
- PBS** – Tampão salino de fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)
- PBS-T** – Tampão salino de fosfato com Tween 20
- PCNA** – Antígeno nuclear de proliferação celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)
- PCR** – Reação de polimerização em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)
- PGZ** – Zona periventricular cinzenta (*Periventricular Grey Zone*)
- POF** – Camada primária de fibras olfatórias (*Primary Olfactory Layer*)
- POMC** – Neuropeptido proopiomelanocortina (*Neuropeptide proopiomelanocortin*)
- PPAR** – Recetor activador de proliferação do peroxissoma (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*)
- PTK** – Proteína tirosina cinase (*Protein Tyrosin Kinase*)
- qRT-PCR** – Reação de polimerização em cadeia em tempo real quantitativa (*quantitative Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction*)
- RNA** – Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)
- RT** – Transcrição reversa (*Reverse transcriptase*)
- Sox-2** – Fator de transcrição Sox-2 (*SRY-like HMG-box gene*)
- SGWZ** – Zona superficial cinzenta e branca (*Superficial Grey and White Zone*)
- TAE** – Tampão Tris-Acetato-EDTA
- TNF α** – Fator de necrose tumoral α (*Tumor Necrosis Factor α*)
- β -ME** – β -Mercaptoetanol

1. INTRODUÇÃO

1.1. Caracterização da espécie (*Danio rerio*)

O *Danio rerio*, de nome comum peixe-zebra, é um pequeno teleósteo (Briggs, 2002; Filby et al, 2010; Gerhard, 2003; Lele & Krone, 1996) que pertence à ordem dos *Cypriniformes*, um grande grupo de peixes de água doce. Apresenta uma distribuição ampla ao longo da Eurásia (Gerhard, 2003; Mayden et al, 2007; Tang et al, 2010), e foi descrito pela primeira vez por Hamilton, em 1822.

Esta espécie apresenta dimensões reduzidas, variando entre os 2,5 a 5 cm. Possui um tempo de desenvolvimento curto (3 a 5 meses), podendo viver até 5 anos (Gerhard, 2003; Gerhard et al, 2002; Kishi et al, 2003; Lele & Krone, 1996; Mayden et al, 2007; Segner, 2009; Speedie & Gerlai, 2008). A sua descendência é elevada, com postura de 50 a 200 ovos por fêmea, em cada desova. Sob condições laboratoriais adequadas, pode reproduzir-se durante o ano inteiro (Gerhard, 2003; Kishi et al, 2003; Segner, 2009; Speedie & Gerlai, 2008). O peixe-zebra vive em ambientes com águas calmas e com baixa turbidez, com um pH ligeiramente alcalino (pH≈8) e alimenta-se de uma grande variedade de crustáceos bentônicos e plantônicos, vermes e larvas de insetos (Lawrence, 2007).

1.1.1. Importância como modelo biológico

A utilização de *D. rerio* como modelo biológico teve como principal impulsionador George Streisinger e a sua equipa, no início da década de 80 (Briggs, 2002; Gerhard, 2003). Desde então, o peixe-zebra tem sido utilizado em diversos estudos e em diferentes áreas, como a toxicologia ambiental (Keller & Murtha, 2004), doenças humanas de origem cardíaca, neurológica e oftalmológica (Keller & Murtha, 2004; Segner, 2009), desenvolvimento biológico e genético (Segner, 2009), estudos de evolução, estudos de aquacultura (Lawrence et al, 2012), de comportamento animal (Filby et al, 2010; Kishi et al, 2003) e estudos sobre organismos transgênicos (Lele & Krone, 1996), entre outros.

A utilização desta espécie em áreas de estudo tão diversas deve-se, em grande parte, às suas características favoráveis de cultura, uma vez que não necessita de muito espaço, a sua manutenção requer um custo reduzido, possui um curto período de geração, consegue produzir um elevado número de descendentes e os ovos eclodem em 2-3 dias (Kishi et al, 2003; Lele & Krone, 1996). A fertilização externa e a transparência dos ovos e dos embriões permitem que seja possível a monitorização de alterações fenotípicas (Briggs, 2002; Keller & Murtha, 2004; Lawrence, 2007; Segner, 2009; Shin & Fishman, 2002), o que é uma grande vantagem comparativamente aos modelos de roedores (Segner, 2009). As suas dimensões, apesar de pequenas, permitem que se realize a recolha isolada de diversos tecidos (Gerhard, 2003), e os órgãos dos peixe-zebra são morfológica e funcionalmente semelhantes aos dos humanos (Gerhard, 2003; Shin & Fishman, 2002).

O peixe-zebra constitui também um excelente modelo para estudos de neurogénese no cérebro (Centanin et al, 2011; Diotel et al, 2013) e na retina (Centanin et al, 2011; Otteson & Hitchcock, 2003), uma vez que a neurogénese persiste no animal adulto (Diotel et al, 2013). Adicionalmente, diversos estudos demonstraram que o peixe-zebra pode ser utilizado como modelo alternativo em ensaios de obesidade, uma vez que apresenta os mesmos sintomas fisiopatológicos que os mamíferos obesos (Oka et al, 2010; Seth et al, 2013). Contudo, este modelo biológico também apresenta algumas desvantagens. A falta de conhecimentos veterinários e o facto de serem alojados em grandes colónias, para reduzir os seus custos de produção, pode levar ao desenvolvimento de doenças infecciosas, difíceis de tratar e de erradicar (Segner, 2009). É ainda importante realçar que a utilização do peixe-zebra como modelo é recente, pelo que a aplicação de algumas técnicas seja complicada, como é o caso de recolha de amostras de sangue, injeções intraperitoniais e intracerebroventriculares, entre outras (Seth et al, 2013). Porém, estas desvantagens não comprometem a sua eficácia como modelo na realização deste trabalho.

1.2. Retina

A retina dos vertebrados forma-se, durante o desenvolvimento embrionário, a partir do tubo neural (Santos-Carvalho et al, 2014; Shin & Fishman, 2002; Yang, 2004). Apesar da sua complexidade, não tem sofrido muitas alterações evolutivas, como são exemplo os principais tipos celulares da retina e a sua organização, características que apenas variaram no número e subtipos de células. Assim, pode afirmar-se que a retina, em primatas e peixes teleósteos, mantém as semelhanças entre si (Malicki et al, 2002).

1.2.1. Morfologia

Nos vertebrados em geral, e no peixe-zebra em particular, a retina apresenta uma estrutura organizada e estratificada onde se encontram diferentes tipos de células, como as células da glia (célula de Müller, astrócitos e células da microglia) e neurónios (Fig. 1). As células neuronais são de diferentes tipos: ganglionares, amácrinas, bipolares, horizontais e fotorreceptores, como os cones e os bastonetes (Menke et al, 2011; Santos-Carvalho et al, 2014; Tarboush et al, 2012).

A retina madura do peixe-zebra é estruturalmente muito semelhante à dos seres humanos uma vez que, em ambos os casos, é possível observar 3 camadas nucleares e 2 camadas plexiformes (Shin & Fishman, 2002). As camadas nucleares são designadas por nuclear externa, nuclear interna e camada de células ganglionares. Por sua vez, às camadas plexiformes foi atribuída a designação de plexiforme externa e plexiforme interna (Bilotta & Saszik, 2001; Santos-Carvalho et al, 2014; Seeley et al, 2011; Tarboush et al, 2012). Cada camada nuclear é formada por diferentes tipos celulares: a camada nuclear externa possui os corpos celulares dos fotorreceptores (cones e bastonetes), a camada nuclear interna contém os corpos celulares das células horizontais, bipolares, amácrinas e de Müller, e a camada de células ganglionares inclui os corpos celulares das células ganglionares e, por vezes, algumas células amácrinas deslocadas (Santos-Carvalho et al, 2014; Seeley et al, 2011; Tarboush et al, 2012). As camadas plexiformes localizam-se entre as camadas nucleares, e é nelas que ocorrem as ligações sinápticas entre os vários neurónios da retina (Seeley et al, 2011). Na camada plexiforme externa ocorrem as ligações entre os fotorreceptores, células bipolares e células horizontais, e na camada plexiforme interna ocorrem as ligações entre células

bipolares, células amácrinas e células ganglionares (Bilotta & Saszik, 2001; Santos-Carvalho et al, 2014; Tarboush et al, 2012).

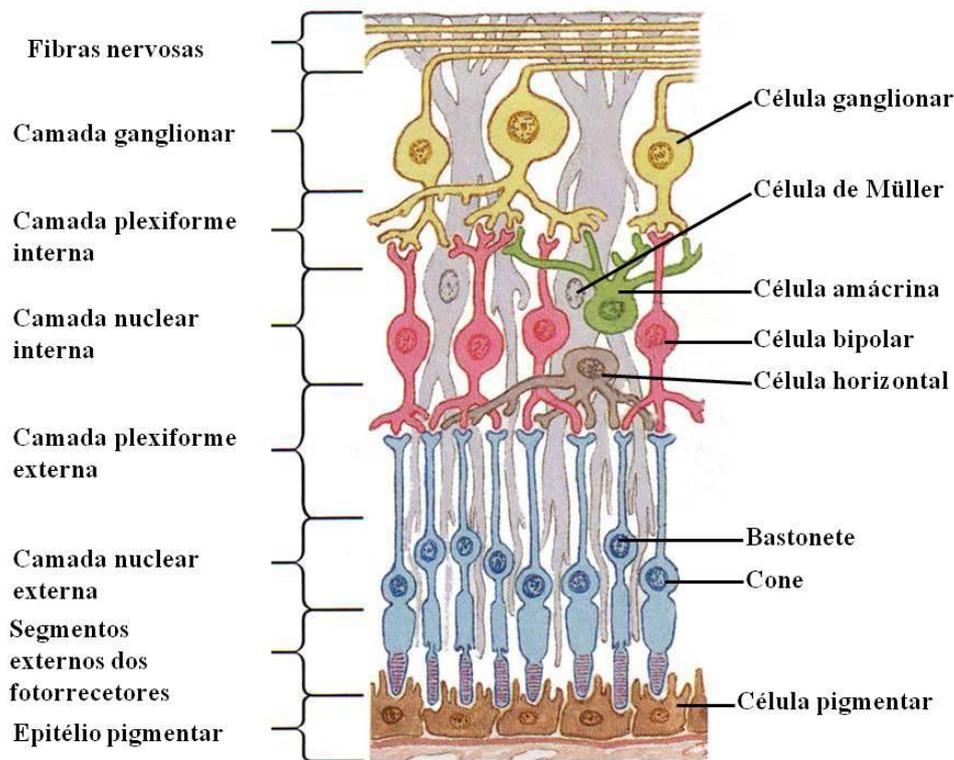


Figura 1 – Esquema da organização da retina de vertebrados

É possível observar, em detalhe, a organização dos diferentes tipos de células, dispostas em camadas diferentes: a camada nuclear externa, onde se localizam os corpos celulares dos fotorreceptores (cones e bastonetes); a camada nuclear interna, contém os corpos celulares das células horizontais, bipolares, amácrinas e de Müller; a camada de células ganglionares, inclui os corpos celulares das células ganglionares e células amácrinas deslocadas; a camada plexiforme externa, onde ocorrem as ligações entre os fotorreceptores, células bipolares e células horizontais; e na camada plexiforme interna ocorrem as ligações entre células bipolares, células amácrinas e células ganglionares (Adaptado de Netter’s Neuroscience Flash Cards, 2nd Edition)

1.3. Cérebro

O cérebro dos peixes teleósteos, e em particular o do peixe-zebra, é muito semelhante ao cérebro de animais superiores, nos seus componentes básicos, variando apenas na sua forma e complexidade (Menke et al, 2011; Yamamoto, 2009), que foi descrito em pormenor, pela primeira vez, por Wullimann e colaboradores em 1996 (Ikenaga, 2013; Wullimann et al, 1996).

A nível cerebral existem dois tipos de células: os neurónios, que possuem a função de conduzir os impulsos nervosos, e células da glia (astrócitos e oligodendrócitos), com função de suporte e nutrição, entre outras (Menke et al, 2011; Seeley et al, 2011).

1.3.1. Morfologia

O cérebro do peixe-zebra é dividido em 5 regiões (Fig. 2): o telencéfalo, o diencéfalo, o mesencéfalo, o metencéfalo (ou cerebelo) e o mielencéfalo (ou bolbo raquidiano), sendo cada região responsável por diferentes funções (Grandel et al, 2006; Menke et al, 2011; Yamamoto, 2009). O telencéfalo é subdividido em bolbo olfativo, *pallium* e *subpallium*, o diencéfalo é subdividido em tálamos e hipotálamo, e o mesencéfalo é subdividido em *tectum* ótico e *tegumentum* (Menke et al, 2011; Yamamoto, 2009).

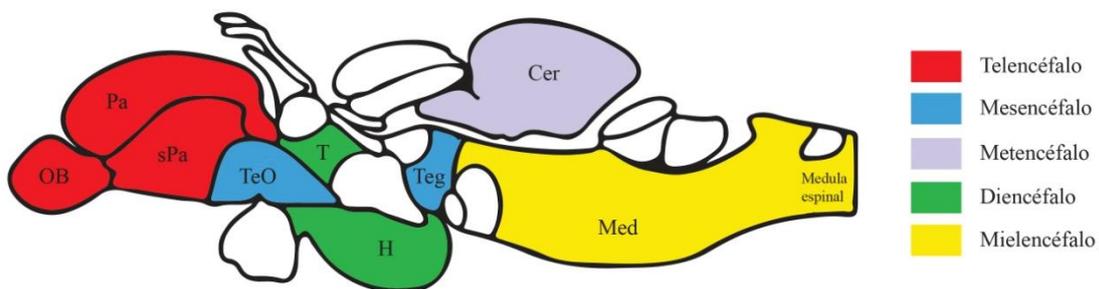


Figura 2 – Esquema do cérebro de peixe zebra

Imagem representativa das diferentes regiões que constituem o cérebro do peixe zebra: o telencéfalo (bolbo olfativo, *pallium* e *subpallium*), o diencéfalo (tálamo e hipotálamo), o mesencéfalo (*tectum* ótico e *tegumentum*), o metencéfalo (ou cerebelo) e o mielencéfalo (ou bolbo raquidiano). OB – Bolbo olfativo; Pa – *Pallium*; sPa – *Subpallium*; TeO – *Tectum* ótico; T – Tálamo; H – Hipotálamo; Teg – *Tegumentum*; Cer – Cerebelo; Med – Bolbo raquidiano (Adaptado de (Toledo-Ibarra et al, 2013))

A organização celular básica do sistema nervoso central dos teleósteos, e em particular do peixe-zebra, é bastante semelhante ao dos outros vertebrados, tendo sido descrita em pormenor, pela primeira vez, por Wullimann e colaboradores em 1996 (Ikenaga, 2013; Wullimann et al, 1996). Histologicamente, no cérebro é possível observar-se células piramidais, entre outros neurónios, e células da neurógliia (astrócitos e oligodentrócitos) (Leake, 1975). Estes tipos celulares encontram-se dispostos em camada e em núcleos específicos ao longo de cada região cérebro (Leake, 1975).

Histologicamente, no bulbo olfativo as células encontram-se dispostas em diversas camadas (Fig. 3), observando-se uma camada primária de fibras olfativas (**POF** – *Primary Olfactory Layer*), uma camada glomerular (**GL** – *Glomerular Layer*), uma camada celular externa (**ECL** – *External Cellular Layer*) e uma camada celular interna (**ICL** – *Internal Cellular Layer*) (Wullimann et al, 1996).

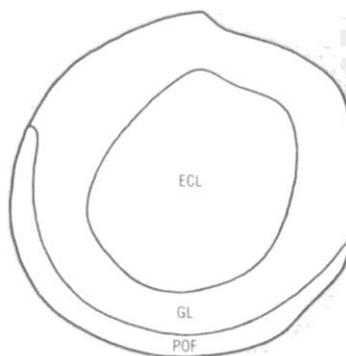


Figura 3 – Esquema do Bulbo olfativo

Representa as diferentes camadas no qual o Bulbo olfativo se encontra organizado, camada primária de fibras olfativas (**POF**), uma camada glomerular (**GL**), uma camada celular externa (**ECL**) (Adaptado de (Wullimann et al, 1996)).

A organização do *pallium* e *subpallium* são baseados na localização das células no telencéfalo. No *pallium* é possível distinguirem-se a zona medial, a zona dorsal, a zona lateral, a zona posterior e a zona central. No *subpallium* observam-se um núcleo dorsal, um núcleo ventral, um núcleo central, um núcleo lateral, um núcleo supracomissural e um núcleo posterior (Wullimann et al, 1996).

No *tectum* ótico é observam-se 4 regiões distintas: a zona periventricular cinzenta (**PGZ** – *Periventricular Grey Zone*), a zona branca interna (**DWZ** – *Deep White Zone*), a zona central (**CZ** – *Central Zone*), e zona superficial cinzenta e branca (**SGWZ** – *Superficial Grey and White Zone*), as quais podem ser subdivididas em 15 camadas diferentes (Wullimann et al, 1996).

1.4. Neurogênese

A ocorrência de neurogênese no cérebro de mamíferos adultos foi demonstrada em 1960, por Joseph Altman e a sua equipa, no Instituto de Tecnologia de Massachusetts. Até então pensava-se que a produção de novos neurónios no cérebro dos vertebrados parava, sensivelmente, após o nascimento (Altman, 1962; Kohman & Rhodes, 2013; Zupanc & Zupanc, 2006).

A formação de novos neurónios na idade adulta já foi observada na maioria dos vertebrados, nomeadamente, em mamíferos (Cheng, 2013; Gage, 2002; Rakic, 2002), aves (Cheng, 2013; Nottebohm, 2002), répteis (Cayre et al, 2002; Font et al, 2001), anfíbios (Polenov & Chetverukhin, 1993) e peixes teleósteos (Hitchcock et al, 2004; Zupanc & Zupanc, 2006). Contudo, é conhecido que, comparativamente aos mamíferos, os peixes teleósteos adultos apresentam uma capacidade superior de neurogênese e regeneração de neurónios. Este facto permite-lhes uma fácil substituição de células danificadas (Cameron, 2000), mantendo a capacidade de regenerar neurónios em dezenas de regiões do cérebro (Ekdahl et al, 2009; Zupanc et al, 2005) e da retina (Centanin et al, 2011; Otteson & Hitchcock, 2003).

1.4.1. Células estaminais/progenitoras

As células estaminais poderão ser definidas como células com capacidade de originar todos os tipos celulares diferentes, associados ao tecido de origem. Estas células possuem a capacidade de se autorrenovar, isto é, conseguem gerar um elevado número de células idênticas à célula progenitora multipotente, através de clonagem amplificadora (Ahmad, 2001; Centanin et al, 2011).

De acordo com a sua capacidade de diferenciação, as células estaminais podem classificar-se em totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes (Fig. 4). Neste caso, o tipo celular anterior possui uma maior capacidade de pluripotência do que o que se segue, isto é, as células estaminais totipotentes têm a capacidade de originar todo o tipo de células, enquanto que, as células estaminais do

tipo unipotente já são mais restritas quanto à capacidade de diferenciação em mais do que um tipo de células (Gage, 2000; Wagers & Weissman, 2004).

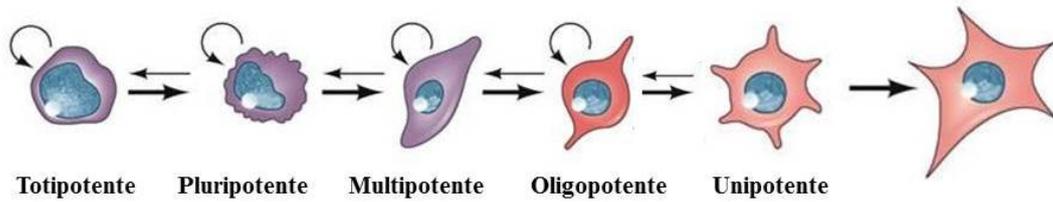


Figura 4 – Classificação das células estaminais

É possível classificar as células estaminais em totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes, com a anterior a possuir maior capacidade de pluripotência do que da que se segue. (Adaptado de (Gilbert, 2010)).

A divisão das células estaminais pode ocorrer através de uma de duas formas: assimetricamente, dando origem a uma célula estaminal e uma célula progenitora (Fig. 5a) que, eventualmente, começa a sofrer diferenciação e substitui uma célula perdida no tecido, ou simetricamente, resultando em duas células filhas diferenciadas (Fig. 5b) (Doe, 2008).

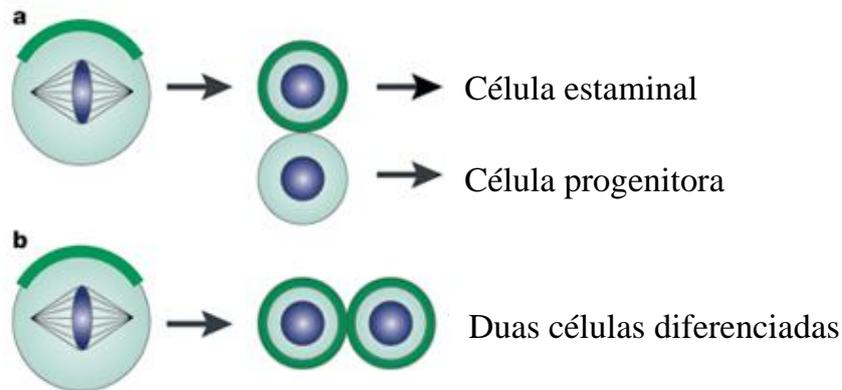


Figura 5 – Esquema representativo da divisão de células estaminais

a – Divisão assimétrica, da qual resultam uma célula estaminal e uma célula progenitora que, eventualmente, começa a sofrer diferenciação e substitui uma célula perdida no tecido; **b** – Divisão simétrica, da qual resultam duas células filhas diferenciadas. (Adaptado de (Knoblich, 2001))

No tecido nervoso, as novas células estaminais geradas acumulam-se em zonas especializadas, designadas por nichos neurogênicos (Centanin et al, 2011; Mochizuki et al, 2014). Estes nichos são responsáveis por regular a autorrenovação e diferenciação

celular (Taupin, 2006). Um mau funcionamento do nicho pode resultar numa produção excessiva de células estaminais e/ou células progenitoras, levando à formação de tumores, ou numa escassez de células progenitoras, resultando numa desintegração do tecido (Holtmann & Dorn, 2009).

1.4.1.1. Nichos neurogénicos e células estaminais/progenitoras na retina

Na retina de diferentes espécies de vertebrados é possível encontrar várias fontes de neurogénese e regeneração que incluem células estaminais neuronais e do epitélio pigmentado, na periferia da retina, e células de Müller, na região central da retina (Centanin et al, 2011; Fischer, 2005; Otteson & Hitchcock, 2003).

Na retina dos peixes teleósteos, o principal local de neurogénese é na margem ciliar (**CMZ** – “*Ciliary Marginal Zone*”), localizada entre o epitélio pigmentado da retina/íris e a retina neuronal propriamente dita (Fig. 6) (Fischer, 2005; Fischer et al, 2013; Otteson & Hitchcock, 2003). Nesta margem ciliar persiste um resto de retina embrionária que dá origem a uma zona germinal circunferencial (**CGZ** – “*Circumferential Germinal Zone*”) que acrescenta, continuamente, novos neurónios à margem da retina existente (Otteson & Hitchcock, 2003).

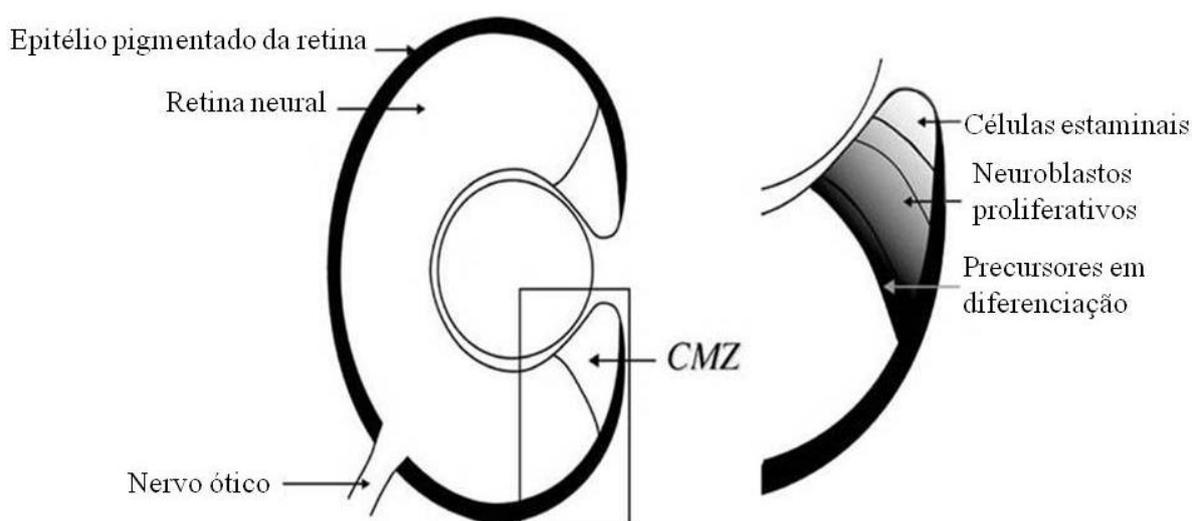


Figura 6 – Representação de uma secção sagital da região da margem ciliar

A margem ciliar (CMZ) corresponde à zona ampliada do esquema. É constituída por um conjunto de células progenitoras multipotentes da retina, localizada entre o epitélio pigmentado da retina/íris e a retina neuronal. Esta zona é constituída por células estaminais, neuroblastos proliferativos e precusores em diferenciação. (Adaptado de (Perron & Harris, 2000))

1.4.1.2. Nichos neurogênicos e células estaminais/progenitoras no cérebro

No cérebro de mamíferos adultos, está descrito que a neurogênese se encontra na zona subventricular do telencéfalo, na zona subgranular do hipocampo e no hipotálamo (Bowers et al, 2010; Brock et al, 2010; Diotel et al, 2013; Sousa-Ferreira et al, 2014). Porém, no cérebro dos peixes teleósteos, e em particular no peixe-zebra, é possível detetar neurogênese ao longo do eixo rostro-caudal (Ito et al, 2010; Kaslin et al, 2008), tendo já sido descritos 16 nichos diferentes (Fig. 7) (Grandel et al, 2006; Hinsch & Zupanc, 2006). É possível identificar estes nichos no telencéfalo dorsal, hipotálamo, *tectum* ótico, cerebello, área pré-ótica e bolbo olfativo (Adolf et al, 2006; Grandel et al, 2006).

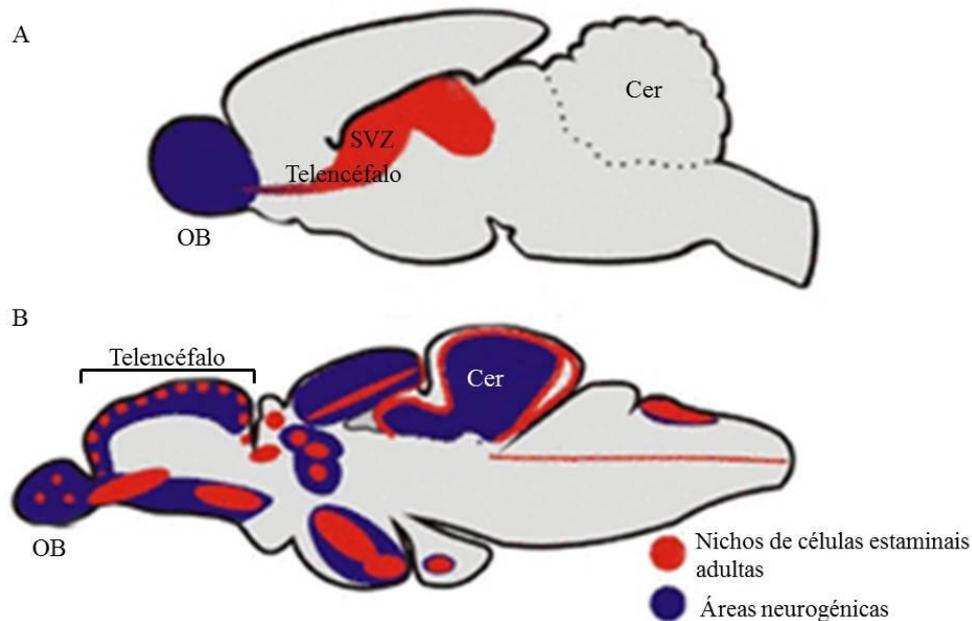


Figura 7 – Representação das áreas neurogênicas no cérebro

Identificação das áreas onde ocorre a neurogênese, bem como onde se encontram localizados os nichos de células estaminais adultas, sendo possível efetuar uma comparação entre o cérebro dos mamíferos adultos (A) e do peixe-zebra (B). OB – Bolbo olfativo; Cer – Cerebello; SVZ – Zona subventricular (Adaptado de (Kizil et al, 2012))

Apesar de existirem diversos nichos neurogênicos, a maioria das novas células é gerada nas diversas subdivisões do cerebello e na zona lateral e posterior do telencéfalo dorsal. Estas últimas regiões são de especial interesse, uma vez que se consideram homólogas ao hipocampo dos mamíferos podendo, deste modo, afirmar-se que a

ocorrência de neurogênese no hipocampo de adultos é uma característica que foi conservada ao longo da evolução dos vertebrados (Hinsch & Zupanc, 2006; Zupanc, 2006). Mais ainda, apesar de apresentar uma taxa mais reduzida de produção de células, o bulbo olfativo, nos teleósteos, é também uma região na qual o estudo da neurogênese apresenta bastante interesse, visto que em região análoga dos mamíferos também se verifica a existência de neurogênese na fase adulta (Hansel et al, 2001; Zupanc, 2006).

1.4.2. Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA – “*Proliferating Cell Nuclear Antigen*”) é uma proteína nuclear envolvida na síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA - *deoxyribonucleic acid*) (Zhao et al, 2012). O PCNA é produzido na fase G1 e início da fase S do ciclo celular (Raucci et al, 2006). Atinge uma concentração máxima durante a fase S e vai diminuindo ao longo das fases G2 e M (Ino & Chiba, 2000). Esta proteína foi identificada como acessória da DNA polimerase δ , encontrando-se a sua quantidade diretamente relacionada com a taxa de proliferação celular e síntese de DNA (Ino & Chiba, 2000; Zhao et al, 2012).

1.4.3. Fator de transcrição Sox-2

O Sox-2 é um membro da família de fatores de transcrição SOX (*SRY-like HMG-box gene*) (Lefebvre et al, 2007; Rex et al, 1998), que é expresso durante a neurogênese adulta (Germana et al, 2011; Ma et al, 2009; Pevny & Nicolis, 2010). Diversos estudos, realizados em vertebrados, incluindo o peixe-zebra, demonstraram que o fator de transcrição Sox-2 se encontra ativo no sistema nervoso embrionário, identificando assim, a maioria das células precursoras indiferenciadas que poderão originar neurónios e astrócitos funcionais (Bani-Yaghoub et al, 2006; Ma et al, 2009; Pevny & Nicolis, 2010).

1.5. Obesidade

Estudos recentes revelam que cerca de 1 bilhão de pessoas adultas apresentam excesso de peso. Destas, 300 milhões são obesas, e pelo menos 2,6 milhões de pessoas morrem, por ano, devido ao excesso de peso e/ou obesidade (Behloul & Wu, 2013).

A obesidade, caracterizada pela acumulação excessiva de lípidos nas células, é uma doença com origem variada, destacando-se os fatores genéticos, comportamentais e ambientais (Newbold et al, 2009; Oka et al, 2010; Tingaud-Sequeira et al, 2011). A causa mais comum para a origem de obesidade é o consumo excessivo de calorias, associado a um estilo de vida sedentário (Newbold et al, 2009). Adicionalmente, a obesidade constitui um fator de risco para o aparecimento de diversas patologias, das quais são de referir a diabetes do tipo 2, a resistência à insulina, doenças cardíacas, hipertensão, doenças hepáticas, asma e outras doenças pulmonares, problemas reprodutivos, alguns tipos de cancro (Kramarova et al, 2009; Newbold et al, 2009; Park et al, 2009) e doenças relacionadas com a visão, como cataratas, retinopatia diabética, glaucoma, *retinis pigmentosa* e degenerescência macular relacionada com a idade (Cheung & Wong, 2007; Gupta et al, 2003).

O consumo de dietas ricas em lípidos aumenta o risco de doenças cardiovasculares, obesidade e problemas neuronais. Além disso, estas dietas influenciam o desenvolvimento normal do sistema nervoso central e afetam as funções cognitivas (Karimi et al, 2013). Sabe-se também que afetam a plasticidade sináptica do hipocampo e as capacidades cognitivas, tais como a aprendizagem e memória, e contribuem para doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e de Parkinson (Karimi et al, 2013; Park et al, 2010). Contudo, apesar da conotação negativa associada aos lípidos da alimentação, a presença de ácidos gordos, como por exemplo do ácido eicosapentaenóico (ómega-3 EPA), o ácido docosa-hexaenóico (DHA) e o ácido linolénico (ALA), apresentam uma elevada importância para o organismo, nomeadamente para o sistema nervoso, pois a sua única forma de obtenção é através da alimentação (Beltz et al, 2007).

1.5.1. Factores biológicos envolvidos na obesidade

Como referido atrás, uma das causas mais comuns da obesidade associa um consumo excessivo de calorias a um estilo de vida sedentário. Porém, também é possível identificar diversas hormonas e neuropéptidos que influenciam esta doença, atuando a diferentes níveis, no organismo (Kopelman, 2000; Wilborn et al, 2005). De entre estas, é possível destacar a leptina, o neuropéptido Y (NPY), a insulina, o fator de necrose tumoral α (**TNF α** – *Tumor Necrosis Factor α*), o cortisol, a noradrenalina, a serotonina, a interleucina – 6, o estrogénio e a testosterona, entre outros (Qatanani & Lazar, 2007; Wilborn et al, 2005).

1.5.2. Efeitos da obesidade na neurogénese

A obesidade afeta a plasticidade sináptica do hipocampo e as capacidades cognitivas, promovendo também a redução da neurogénese no hipocampo e induzindo stresse oxidativo devido à elevada peroxidação lipídica (Karimi et al, 2013; Park et al, 2010; Purkayastha & Cai, 2013; Sousa-Ferreira et al, 2014). Na realidade, um estudo prévio, realizado em murganhos (C57BL/6) por Park e colaboradores (2010), demonstra que a obesidade induzida por uma dieta rica em lípidos prejudica a neurogénese no hipocampo e a proliferação de células neuronais progenitoras, devido à ocorrência de peroxidação lipídica e à diminuição dos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (**BDNF** – *brain-derived neurotrophic factor*) (Park et al, 2010). Noutro estudo, foi demonstrado que a obesidade provoca uma redução na formação de novos neurónios, incluindo os neurónios que expressam os neuropéptidos proopiomelanocortina (**POMC** – *neuropeptide proopiomelanocortin*) e neuropéptido Y (**NPY** – *neuropeptide Y*) (Purkayastha & Cai, 2013). Esta redução da capacidade proliferativa das células neuronais progenitoras do hipotálamo, que são responsáveis pelo controlo do equilíbrio energético, poderá por sua vez, ter efeitos na regulação do apetite e, conseqüentemente, implicações na indução de obesidade (Sousa-Ferreira et al, 2014).

Recentemente, um estudo realizado em peixe-zebra, demonstrou que em doenças que se caracterizam pelo aparecimento de obesidade, a neurogénese da retina é afetada por mecanismos genéticos relacionados com a função ciliar (Mei et al, 2014). No

entanto, apesar das indicações que este estudo aponta para o efeito da obesidade na neurogênese da retina, a avaliação do efeito direto da obesidade na neurogênese de peixe-zebra ainda é desconhecida. Adicionalmente, estudos sobre o efeito da obesidade na neurogênese de cérebro de peixe-zebra não são igualmente conhecidos. Deste modo, o presente trabalho, tem um papel reforçado no sentido de esclarecer de que modo a neurogênese, na retina e no cérebro de peixe-zebra, poderá ser afetada após a indução de obesidade em peixes-zebra.

1.5.3. Recetor activador de proliferação do peroxissoma γ (PPAR- γ)

O recetor activador de proliferação do peroxissoma γ (**PPAR- γ** - *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) pertence ao grupo dos recetores ativadores da proliferação do peroxissoma e é uma das 3 isoformas existentes, PPAR- γ , PPAR- α e PPAR- β/δ (da Silva et al, 2013; Wang et al, 2014). Cada isoforma tem seu próprio conjunto de genes alvo, que se sobrepõem parcialmente, apresentando níveis de ativação diferencial em resposta a determinados ligandos (Gijbers et al, 2011). Este é um fator regulador chave para a diferenciação dos adipócitos, no metabolismo de ácidos gordos e para o desenvolvimento de esteatose hepática (Shieh et al, 2010; Wang et al, 2014). Sabe-se ainda, que desempenha um papel importante na adipogénese, na sensibilidade à insulina e na resposta a condições nutricionais (Gijbers et al, 2011). Estudos de indução de obesidade através da dieta demonstram que, o PPAR- γ regula a expressão de genes que promovem a absorção e armazenamento de energia sob a forma de triglicéridos e colesterol em grandes gotículas lipídicas (Sugii & Evans, 2011).

1.6. Genisteína

A genisteína (5,7-dihidroxi-3-(4-hidroxifenil) cromen-4-ona) é uma isoflavona, presente em diversas plantas, em especial na soja (Behloul & Wu, 2013; Park et al, 2009). Uma vez que apresenta uma ação no organismo muito semelhante ao 17 β -estradiol, a genisteína é considerada um fitoestrogénio (Fig.8) (Behloul & Wu, 2013; Park et al, 2009), apresentando efeitos pleiotrópicos em diversos órgãos, em particular nas gónadas, no fígado, na estrutura óssea, no sistema cardiovascular e no sistema nervoso (Diotel et al, 2013). Esta isoflavona tem sido muito utilizada em sistemas biológicos para o estudo dos seus efeitos anti-lipogénicos, antioxidantes e estrogénicos (Lee et al, 2006).

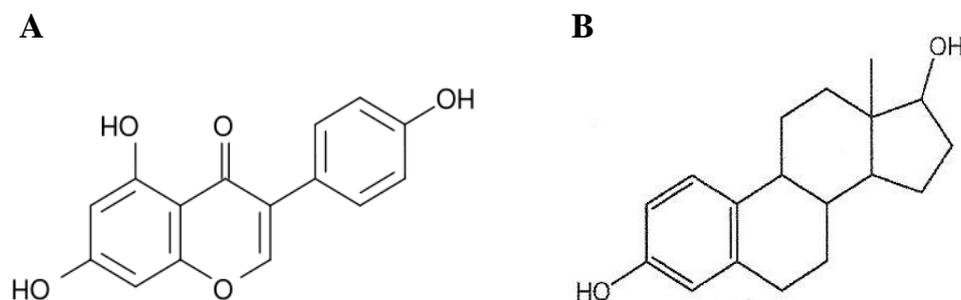


Figura 8 – Estrutura da genisteína (4,5,7 – trihidroxiisoflavona) e do 17 β -estradiol

Dada a semelhança da ação entre a genisteína e o 17 β -estradiol, esta é considerada um fitoestrogénio; A – Genisteína; B - 17 β -estradiol

No organismo humano, a genisteína reduz os efeitos da menopausa (afrontamentos e perda de massa óssea), previne o cancro da mama, diminui o risco de doenças cardiovasculares e afeta a libertação e ação da insulina (Behloul & Wu, 2013; Lee et al, 2006; Polkowski & Mazurek, 2000). Sabe-se, também, que a genisteína possui uma ação protetora neuronal em situações de lesões ocorridas durante a fase de isquémia/ reperfusão, no hipocampo e na retina de ratos (Hayashi et al, 1997; Ibrahim et al, 2010).

Diversos estudos demonstraram que a genisteína provoca uma diminuição na ingestão de alimentos, diminui o peso corporal e a massa gorda, aumenta a apoptose das células adiposas e inibe a acumulação de lípidos (Behloul & Wu, 2013; Kramarova et

al, 2009; Park et al, 2009; Szkudelska et al, 2011). Existem ainda estudos que revelam que a genisteína possui capacidade de reduzir a quantidade de lípidos no plasma sanguíneo e no fígado (Lee et al, 2006).

1.6.1. Mecanismos de ação da genisteína na célula

Apesar de apresentar uma estrutura muito simples, a genisteína está envolvida em diferentes mecanismos celulares bioquímicos, entre os quais, a inibição da proteína tirosina cinase (**PTK** – *protein tyrosin kinase*) e da DNA topoisomerase II, além da sua capacidade de interação com os recetores de estrogénio (Hayashi et al, 1997; Li et al, 2011; Polkowski & Mazurek, 2000; Sarkar et al, 2006; Singletary et al, 2002). É ainda de referir a sua ação na inibição da proliferação celular, os efeitos antioxidantes, a capacidade de induzir diferenciação celular e a participação na regulação da progressão do ciclo celular (Behloul & Wu, 2013; Hayashi et al, 1997; Polkowski & Mazurek, 2000; Rayalam et al, 2008; Sarkar et al, 2006).

1.6.2. Efeitos da genisteína na neurogénese

Apesar de ser consensual que a genisteína atua como protetor neuronal em situações de lesão (Ibrahim et al, 2010), o efeito desta na neurogénese de peixe-zebra ainda não é conhecido, tornando o presente trabalho inovador. Num estudo *in vitro* realizado com a linha celular neuronal H19-7, demonstrou-se que a genisteína, em concentrações de 20 nM e 200 nM, promove um aumento significativo da proliferação celular, verificando-se um aumento na percentagem de células na fase S (Pan et al, 2012). Assim, este estudo poderá sugerir que a genisteína estimula a neurogénese no hipocampo de ratos, sendo, contudo, necessários estudos adicionais para provar este efeito.

Porém, uma vez que não existem estudos neste tema em peixe-zebra, esta pesquisa foi também baseada em estudos realizados com a hormona 17 β -estradiol, uma vez que os efeitos desta na célula são semelhantes aos da genisteína, como ficou demonstrado no trabalho de Pan e colaboradores (2012), no qual os resultados obtidos de genisteína foram semelhantes aos resultados da 17 β -estradiol (Pan et al, 2012).

A hormona 17β -estradiol atua no sistema nervoso central participando na regulação do sistema neuroendócrino e reprodutor. De facto, diversos estudos têm demonstrado que o estradiol regula a expressão de genes relacionados com a sobrevivência neuronal, a diferenciação das células neuronais e da glia e a transmissão sináptica. Mais ainda, sabe-se também que o estradiol apresenta uma ação anti-inflamatória, protetora e reparadora do cérebro (DonCarlos et al, 2009). Por outro lado, o estradiol participa no controlo da migração celular, bem como na sua diferenciação e/ou plasticidade (Diotel et al, 2013).

A neurogénese é um evento celular que pode, igualmente, ser regulado pelo estradiol. Diversos estudos realizados em ratos demonstram que esta hormona está envolvida na proliferação de células na zona subventricular do prosencéfalo e na zona subgranular do giro dentado do hipocampo, promovendo também a neurogénese das mesmas (Barha & Galea, 2010; Bowers et al, 2010).

Contudo, um trabalho realizado por Diotel e colaboradores (2013), em peixe-zebra, revelou que o estradiol influencia negativamente a capacidade de neurogénese adulta, não afetando, porém, a neurogénese reparadora (Diotel et al, 2013). Mais recentemente, um estudo realizado por Makantasi e Dermon (2014), em peixes-zebra fêmeas, demonstrou que tratamentos consecutivos com estradiol afetam a homeostasia da população das células proliferativas tendo-se detetado uma redução da neurogénese adulta no cérebro (Makantasi & Dermon, 2014).

1.7. Objetivos

Estudos prévios, efetuados em mamíferos, demonstraram que a obesidade inibe a neurogênese no cérebro (Park et al, 2010) e que, pelo contrário, a genisteína poderá promover a neurogênese adulta (Barha & Galea, 2010; DonCarlos et al, 2009). Apesar da indução de obesidade em peixe-zebra apresentar sintomas fisiopatológicos semelhantes aos mamíferos (Oka et al, 2010), ainda não existem estudos que relacionem diretamente o efeito da obesidade na neurogênese da retina e do cérebro de peixe-zebra, não se conhecendo igualmente a ação da genisteína na modulação da neurogênese.

Deste modo, o principal objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da obesidade, induzida por um regime alimentar hipercalórico (excesso de *Artemia sp.*), e da genisteína, na neurogênese em peixe-zebra (*Danio rerio*). Para a concretização deste objetivo, estudaram-se o cérebro e a retina de peixes-zebra, obesos e expostos a genisteína, através de análise histológica e de marcação por imunofluorescência, das proteínas PCNA e Sox-2, para avaliar a proliferação celular e analisar a presença de células neuronais progenitoras. Realizou-se ainda uma avaliação quantitativa da expressão dos genes PCNA e Sox-2 por reação de polimerização em cadeia em tempo real (qRT-PCR).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Delineamento experimental

Durante o ensaio, os peixes-zebra, *Danio rerio*, foram mantidos na Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), em aquários com 2L de água recirculada. A composição da água esteve de acordo com as instruções da União Europeia, nomeadamente no que diz respeito ao pH 8, alcalinidade (9,6 mg $\text{HCO}_3\text{L}^{-1}$), condutividade (212 $\mu\text{S cm}^{-1}$), composição iónica, nitratos e nitritos, dureza e oxigénio dissolvido (84/449/EEC, Diretivas, Anexo 5). Os animais foram mantidos a uma temperatura de $28\pm 1^\circ\text{C}$ e com um fotoperíodo de 14:10 (luz: obscuridade).

Para a realização deste trabalho experimental, foram distribuídos aleatoriamente 120 peixes-zebra (60 dias pós-fertilização) por 12 aquários (3 aquários por tratamento). O peso cumulativo médio no início do ensaio foi de $1,63 \pm 0,015\text{g}$ de peixe por aquário. Os animais foram divididos por 4 condições experimentais diferentes: controlo (*grupo controlo*), dieta hipercalórica de *Artemia sp.* (*grupo obesidade*), exposição a genisteína (*grupo genisteína*) e dieta hipercalórica de *Artemia sp.* com exposição simultânea a genisteína (*grupo obesidade + genisteína*). De acordo com trabalhos anteriores foi assumido que 100g de cistos descapsulados de *Artemia sp.* possuem 20g de lípidos (Oka et al, 2010). As quantidades calculadas para as dietas hipercalóricas tiveram como base o peso inicial dos indivíduos e foram ajustadas para uma quantidade igual de lípidos totais (6 vezes superior à dieta controlo). A duração do ensaio foi de 9 semanas e os peixes foram pesados às 3, 5, 7 e 9 semanas. No grupo de controlo e grupo exposto a genisteína, os peixes foram alimentados uma vez por dia, com uma porção equivalente a 2% do seu peso corporal de quistos descapsulados (*Artemia sp.*). Nas restantes condições, os animais foram sujeitos a uma dieta, cujo objetivo era induzir obesidade nos animais, deste modo em 6 aquários os peixes foram alimentados 3 vezes por dia com uma porção equivalente a 12% do seu peso corporal em *Artemia sp.*. Estas quantidades foram ajustadas ao longo do ensaio. Nos grupos expostos a genisteína foram adicionados na água $2 \mu\text{gL}^{-1}$ de genisteína.

Este trabalho seguiu as normas de experimentação animal, uma vez que os ensaios realizados estavam de acordo com o bem-estar animal (manuseamento e

eutanásia), em conformidade com a legislação europeia e nacional (86/609/EEC e 1005/92 de 23 de outubro, respetivamente). O trabalho experimental foi supervisionado por um responsável acreditado pela FELASA (Federation of Laboratory Animal Science Associations).

2.2. Recolha do material de estudo

Os peixes foram amostrados 9 semanas após o início do tratamento. Cada animal foi anestesiado em gelo, registando-se o seu peso e o tamanho e, posteriormente, decapitado. Após o registo, 10 peixes de cada grupo foram escolhidos aleatoriamente e recolhidos para a técnica histológica e outros 10 peixes foram amostrados para o estudo da expressão génica. Para a técnica histológica, foi separada a cabeça e o corpo inteiro do animal e colocados separadamente em formol, para a sua preservação. Para a análise da expressão génica, foram removidos do peixe-zebra ambos os olhos, o cérebro e o fígado e armazenados em RNAlater® (Sigma Chemical, St.Louis, USA) a -80°C.

2.3. Preparação histológica

Após a fixação das amostras em formol, durante cerca de 24 horas, foi efetuada uma desidratação em banhos de álcool com concentrações crescentes (50%, 70%, 90%, 95% e 100%). Seguiu-se o clareamento com xilol, sendo as amostras, posteriormente, impregnadas e incluídas em parafina, obtendo-se um bloco sólido, a partir do qual se efetuaram cortes com espessura de 3 µm, com o auxílio de um micrótomo rotativo (Leica, Nußloch, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas previamente revestidas com APS (peroxodissulfato de diamónio, Sigma, Barcelona, Espanha), seguindo-se a sua coloração com hematoxilina, que é um corante básico que cora as estruturas ácidas de azul/púrpura, e eosina, corante ácido que cora as estruturas básicas em vermelho/rosa. Por fim, a montagem da preparação foi feita utilizando o meio de montagem Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha). As restantes lâminas foram guardadas a 4°C e mantidas sem coloração para a imunofluorescência.

2.3.1. Imunofluorescência

As lâminas com os cortes histológicos de retina, cérebro e fígado de peixe-zebra, de todos os grupos, foram desparafinadas em banhos de xilol (2 passagens durante 15 minutos), hidratadas utilizando concentrações decrescentes de álcool (100%, 95%, 90%, 70% e 50%), durante 10 minutos cada, seguindo-se lavagens sucessivas com água corrente e água destilada (3 lavagens durante 5 minutos). De seguida, os cortes foram lavados num tampão salino de fosfato (**PBS – Phosphate Buffered Saline**¹) com Tween 20 (PBS-T; 3 lavagens durante 2 minutos). Posteriormente, realizou-se a incubação dos cortes com uma solução de albumina de soro bovino (BSA) a 3% para o bloqueio, durante 30 minutos. Seguiu-se a incubação com o anticorpo primário, utilizando-se o anti-antigénio PCNA (1:50; Calbiochem, Darmstadt, Alemanha), durante uma hora, para a retina e cérebro, e o anti-antigénio PPAR- γ (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA), durante a noite, no escuro, a 4°C, para as lâminas de fígado. Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS-T (3 lavagens durante 2 minutos). E seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário complexado com fluorocromo Alexa mouse 488 (1:200; Molecular Probes, Leiden, Holanda) para o fígado e Alexa mouse 647 (1:200; Molecular Probes, Leiden, Holanda) para a retina e o cérebro, ambos durante uma hora no escuro.

De forma a realizar uma marcação dupla, necessária para os cortes de retina e cérebro, procedeu-se a uma marcação sequencial de anticorpos. Após os processos anteriores, seguiu-se uma nova lavagem em PBS-T (3 lavagens durante 2 minutos) e novamente um bloqueio com BSA 3%, durante 30 minutos no escuro. De seguida, realizou-se a incubação com o segundo anticorpo primário (anti-Sox-2 – 1:200; Molecular Probes, Leiden, Holanda) durante a noite, no escuro, a 4°C. Os cortes histológicos foram, novamente, lavados em PBS-T (3 lavagens durante 2 minutos) e, seguiu-se a incubação do segundo anticorpo secundário (Alexa *mouse* 488 – 1:200; Molecular Probes, Leiden, Holanda) no escuro, durante 1 hora.

Posteriormente, efetuaram-se 3 lavagens com PBS-T (2 minutos cada), seguindo-se a incubação com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; 1:1000), marcador nuclear, durante 5 minutos. Por fim, lavagem com PBS-T (3 lavagens durante 2

¹ PBS: 0,2 g/L KCl; 0,2 g/L KH₂PO₄; 8 g/L NaCl; 1,15 g/L Na₂HPO₄; pH 7,2.

minutos), finalizando o processo com a montagem das lâminas com *Hydromount* (National Diagnostics, Atlanta, EUA) e acondicionamento a 4°C, até à sua visualização, num microscópio ótico invertido (Olympus, IX – 51, Japão). A aquisição das imagens foi realizada através do *software Cell*.

2.4. Extração de RNA total de amostras de tecidos

Para a extração do ácido ribonucleico (**RNA** - *ribonucleic acid*) total foi utilizado o *Kit IllustraRNAspin Mini* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). De acordo com as instruções do *kit*, iniciou-se a extração de RNA através da homogeneização e lise, num homogeneizador de vidro contendo tampão de lise e β -mercaptoetanol (β -ME) (350 μ L de RA1: 3,5 μ L de β -ME). Seguiu-se a filtração do homogeneizado numa coluna de filtração para um tubo coletor, centrifugando-se a 11 000 xg durante 1 minuto. De seguida foram adicionados 350 μ L de etanol 70% (v/v) ao homogeneizado, para aumentar a capacidade de absorção do RNA à membrana de sílica. Posteriormente, o homogeneizado foi colocado numa coluna associada a um tubo coletor, procedendo-se à sua centrifugação a 8 000 xg durante 1 minuto e, posterior colocação da coluna num tubo coletor novo. A etapa seguinte ocorreu através da adição de 350 μ L de tampão de dessalinização da membrana (**MDB** - *Membrane Desalting Buffer*), com capacidade de remoção de sais complexados à membrana de sílica, tornando a digestão mais eficaz com a DNase, e posterior centrifugação a 11 000 xg, durante 1 minuto, de modo a secar a membrana. Seguiu-se, a digestão do DNA pela adição de 95 μ L da mistura de reação da DNase (10 μ L de DNase I reconstituída a 90 μ L de tampão de reação da DNase), que ficou a incubar durante 60 minutos à temperatura ambiente (20-25°C). Posteriormente, foram efetuadas lavagens sucessivas da membrana, primeiro com 200 μ L de tampão RA2 (centrifugando-se a 11 000 xg durante 1min) de forma a inativar a DNase I, de seguida com 600 μ L de tampão RA3 (centrifugando-se a 11 000 xg durante 1min) e, por fim, novamente com 250 μ L de RA3 sendo centrifugado durante 2min a 11 000 xg para secar a membrana completamente. Para finalizar o processo de extração de RNA total, procedeu-se à eluição do RNA com 40 μ L de água sem RNases com centrifugação a 11 000 xg, durante 1 minuto. O RNA eluído foi colocado imediatamente a -80°C, de modo a impedir a sua degradação.

2.4.1. Verificação da integridade e quantificação de RNA

Para certificar a integridade do RNA extraído, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA 1x (TAE 1 x) com 0,4 µg/µL de brometo de etídeo. As amostras de RNA foram colocadas nos poços e iniciou-se a eletroforese, por aplicação de uma tensão elétrica de 80 V durante 90 minutos. Após a separação por eletroforese retirou-se o gel do tampão e visualizou-se o RNA através da fluorescência emitida pelo brometo de etídeo a ele associado, quando irradiado com radiação ultravioleta. A observação e análise das bandas foi realizada num transiluminador (Vilber Lourmat, França) através do *software* Biocapt (Vilber Lourmat, França).

A quantificação do RNA realizou-se por medição da absorvância para o comprimento de onda a 260 nm, que deteta a quantidade de ácidos nucleicos e 280 nm que deteta a quantidade de proteína. A pureza do RNA foi determinada pela razão entre as absorvâncias a 260 e 280nm ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) (Power Wave XS2, Biotek). Preparações de RNA puras apresentam uma razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ de 2.

2.5. Transcrição reversa

Utilizando o *kit* iScript™ cDNASynthesis (BioRad, Hercules, CA, USA) sintetizou-se a cadeia simples de DNA complementar (cDNA - *complementary DNA*). Iniciou-se a reação de transcrição reversa com uma concentração final de 200 ng.µL⁻¹ de RNA total para as amostras de retina, 400 ng.µL⁻¹ para as amostras de cérebro e 800 ng.µL⁻¹ para as de fígado, sendo a reação final constituída como descrito na tabela 1. Os volumes de água e de amostra de RNA foram determinados para um volume final de 15 µL, de acordo com a equação seguinte:

$$\text{Volume RNA (X)} = \frac{[\text{final desejada}] \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}}{[\text{amostra}] \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}}$$

Tabela 1 – Componentes e respectivos volumes utilizados para a síntese de cDNA

Componente	Volume por amostra
<i>5x iScript Reaction Mix</i>	4 µL
<i>iScript Reverse Transcriptase</i>	1 µL
H ₂ O livre de nucleases	15 – X µL
RNA	X µL
Volume total de reação	20 µL

A reação seguiu o ciclo de temperaturas indicado pelo fabricante: 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C. As amostras foram devidamente identificadas e armazenadas a -20°C.

2.6. Reação de polimerização em cadeia

A reação de polimerização em cadeia (PCR) foi realizada, utilizando pares de sequências de nucleótidos (*primers*) específicas para os genes do PCNA, Sox-2, PPAR- γ e β – Actina. Os pares de sequências de nucleótidos utilizados e os tamanhos dos respectivos produto estão indicados na tabela 2.

Todas as amplificações ocorreram na presença de um tampão de PCR, contendo 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de sequências aleatórias de nucleótidos (oligo dT), 0,2 µM do par de cada sequência específica de nucleótidos e 2,5 unidades/mL de Taq® da DNA polimerase. As reações de polimerização decorreram como indicado na tabela 3.

Os produtos de PCR obtidos foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1%, contendo 0,4 µg/µL de brometo de etídio. A observação e análise das bandas foi realizada num transiluminador (Vilber Lourmat, França) através do *software* Biocapt (Vilber Lourmat, França).

Tabela 2 – Sequência de nucleótidos utilizados na RT-PCR

Gene	Sequência de nucleótidos	Tamanho do produto (bp)
PCNA ID: 5111	F 5'-GCTCGTCGGGCATTTCT-3' R 3'-CAGAGGAGTGGCTTTGG-5'	633
Sox-2 ID: 20674	F 5'-GCTCAACCAGTACCTCAACATGA-3' R 5'-CGAGTTGGTCATGGAGTTGTACT-3'	347
PPAR- γ ID: 5468	F 5'-GGTTTCATTACGGCGTTCAC-3' R 3'-TGGTTCACGTCACCTGGAGAA-5'	250
β – Actina ID: 60	F 5'-ACTGTATTGTCTGGTGGTAC-3' R 5'-TACTCCTGCTTGCTAATCC-3'	197

bp – pares de bases

Tabela 3 – Condições das reações de polimerização

	PCNA	Sox-2	PPAR – γ	β – Actina
Desnaturação inicial	94°C 1 min	94°C 1 min	94°C 1 min	95°C 1 min
Desnaturação	94°C 20 seg	94°C 20 seg	94°C 10 seg	95°C 15 seg
Emparelhamento dos primers	58°C 30 seg	58°C 30 seg	56°C 15 seg	60°C 20 seg
Extensão	72°C 20 seg	72°C 20 seg	72°C 10 seg	72°C 20 seg
Extensão final	72°C 10 min	72°C 10 min	72°C 10 min	72°C 10 min
Nº de Ciclos	35 Ciclos	35 Ciclos	35 Ciclos	35 Ciclos

2.7. Reação de Polimerização em Cadeia em Tempo Real

A reação de polimerização em cadeia em tempo real realiza uma medição semi-quantitativa ou quantitativa, dependendo do aparelho usado, designando-se, por isso, de qRT-PCR (*quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction*). Neste trabalho prático utilizou-se o *EVAGreen*® (Solis BioDyne, Tartu, Estónia) e os *primers* descritos na tabela 2. A reação foi preparada para um volume final de 20 μ L, e foi realizada usando para cada amostra os volumes descritos na tabela 4, em placas de 96 poços seladas com

filme adesivo ótico. Os volumes de cDNA utilizados (Tabela 4) variam consoante o órgão uma vez que a síntese das mesmas foi feita a partir de concentrações diferentes de RNA. Sendo assim, os volumes das amostras são diferentes para cada órgão optando-se por serem todas diluídas para um volume final de 5 µL para minimizar os erros de pipetagem. Foi realizado um controlo negativo (branco) substituindo o cDNA por água. As reações de polimerização decorreram como indicado na tabela 3, iniciando-se sempre a reação com uma desnaturação inicial de 15 min a 95°C, durante 1 ciclo, para ativar a enzima.

Tabela 4 – Reagentes e quantidades necessárias, por amostra, para a reação de qRT-PCR com EVAGreen®

Componente	Volume (Retina e Cérebro)	Volume (Fígado)
<i>EVAGreen®</i>	4 µL	4 µL
<i>Primers (Forward + Reverse)</i>	0,2 µL + 0,2 µL	0,4 µL + 0,4 µL
<i>H₂O</i>	10.6 µL	10.2 µL
cDNA	5 µL*	5 µL**
Volume final	20 µL	20 µL

* Retina: 2,5µL de amostra original + 2,5µL de H₂O; Cérebro: 1,25µL de amostra original + 3,75µL de H₂O; ** Fígado: β-Actina – 2,5µL de amostra original + 2,5µL de H₂O para amostras; PPAR- γ – 5µL de amostra original.

O controlo positivo foi realizado através de uma série de diluições sucessivas de cDNA's, como indicado na tabela 5, que foram utilizadas para a construção de retas padrão e para a determinação das eficiências de reação e coeficiente de determinação (r^2). A expressão dos genes foi determinada pelo método da variação da linha basal de amplificação (*cycle threshold*, ΔC_T) e os valores normalizados para a média dos controlos. Os valores obtidos nos grupos em estudo foram então avaliados comparativamente ao gene de controlo β-actina.

Tabela 5 – Diluições utilizadas para a construção de retas padrão

	Retina	Cérebro	Fígado
β – Actina	-	-	1:4
PCNA	1:2	1:2	-
Sox-2	1:2	1:2	-
PPAR – γ	-	-	1:2

Para os resultados de uma reação de qRT-PCR serem considerados válidos, a eficiência do gene em estudo e do controle têm de estar entre os 90% e 110% (*Applied Biosystems*), o que foi verificado nas nossas reações.

Se a eficiência do gene de amplificação em estudo e do gene de referência é comparável, o método do ΔC_T pode ser usado. Para tal efetuou-se a diferença da média dos C_T do gene em estudo de cada amostra com a média dos C_T do gene de referência (β -actina) calculando assim o valor ΔC_T , através da seguinte equação:

$$\Delta C_T = 2^{-(\text{média } C_T \text{ do gene alvo} - \text{média } C_T \text{ da } \beta\text{-actina})}$$

Obtidos os valores de ΔC_T de cada amostra, efetuou-se a calibração relativamente ao grupo de controlo, através da seguinte fórmula:

$$\text{Normalização para controlo} = \frac{\Delta C_T}{\text{Média } \Delta C_T \text{ grupo controlo}}$$

A leitura dos resultados foi realizada no *software* do programa *Stratagene Mx3005P QPCR System* (CA, EUA).

2.8. Tratamento estatístico

A análise estatística dos dados foi efetuada com o programa SigmaStat (Statistical software, SPSS Inc.). Foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) de uma entrada, seguida do teste de comparação múltipla de Fisher LSD. Os dados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS

O presente trabalho teve como principal objetivo testar a utilização de peixe-zebra como um modelo vertebrado para o estudo dos efeitos da obesidade na neurogênese. Pretendeu-se, adicionalmente, testar o efeito da genisteína nas respostas à obesidade bem como diretamente na neurogênese. Após a indução de obesidade e exposição a genisteína, a retina e o cérebro dos animais foram alvo de um estudo histológico e de expressão génica.

3.1. Indução de obesidade em *Danio rerio*

3.1.1. Evolução do peso

A partir da 5ª semana de ensaio experimental observou-se um aumento significativo do peso dos animais do grupo obesidade e do grupo obesidade + genisteína em comparação com os do grupo controlo ($p < 0,001$) e do grupo genisteína ($p < 0,001$), que se mantiveram praticamente constantes ao longo de todo o ensaio (Fig. 9). O ligeiro aumento de peso observado no controlo e no grupo genisteína deve-se ao normal crescimento dos animais ao longo do ensaio experimental total (9 semanas).

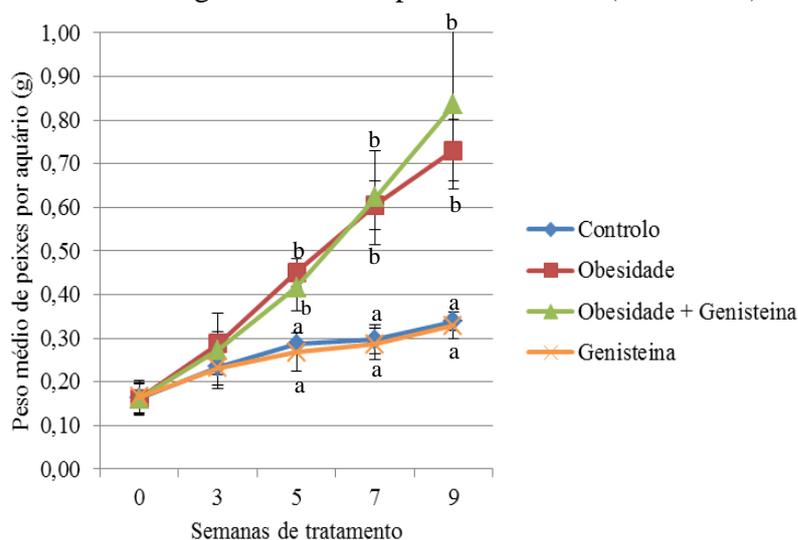


Figura 9 – Gráfico representativo da evolução do peso dos animais durante 9 semanas de ensaio experimental (g de peixe por aquário)

Os valores apresentados representam a média \pm desvio padrão ($n=7$); As letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,001$); ANOVA de uma entrada com teste Fisher LSD *à posteriori*.

3.1.2. Análises histológicas do fígado

A análise histológica demonstrou que no fígado de peixes-zebra do grupo controle, os hepatócitos evidenciavam citoplasma abundante, com morfologia normal e poucas gotículas lipídicas visíveis (Fig. 10A). No grupo de animais expostos a genisteína também foi possível observar hepatócitos com citoplasma eosinófilo abundante, morfologia normal e gotículas lipídicas escassas (Fig. 10B). Por outro lado, no fígado de peixes-zebra submetidos a dieta hipercalórica foi possível observar-se a acumulação de gotículas lipídicas de diferentes tamanhos que ocupavam grande parte do citoplasma dos hepatócitos, causando uma deslocação dos núcleos para a sua periferia (Fig. 10C). A presença destas gotículas lipídicas foi observada de forma generalizada por todo o parênquima hepático, tendo conduzido ao desenvolvimento de esteatose hepática. Porém, no grupo exposto simultaneamente a suplemento calórico e a genisteína, apesar de ter sido possível observar a existência de gotículas lipídicas de diferentes tamanhos, estas eram, na sua maioria, de pequenas dimensões. Adicionalmente, e ao contrário do observado no grupo obesidade, a maioria dos hepatócitos apresentaram um citoplasma abundante e com morfologia normal (Fig. 10D).

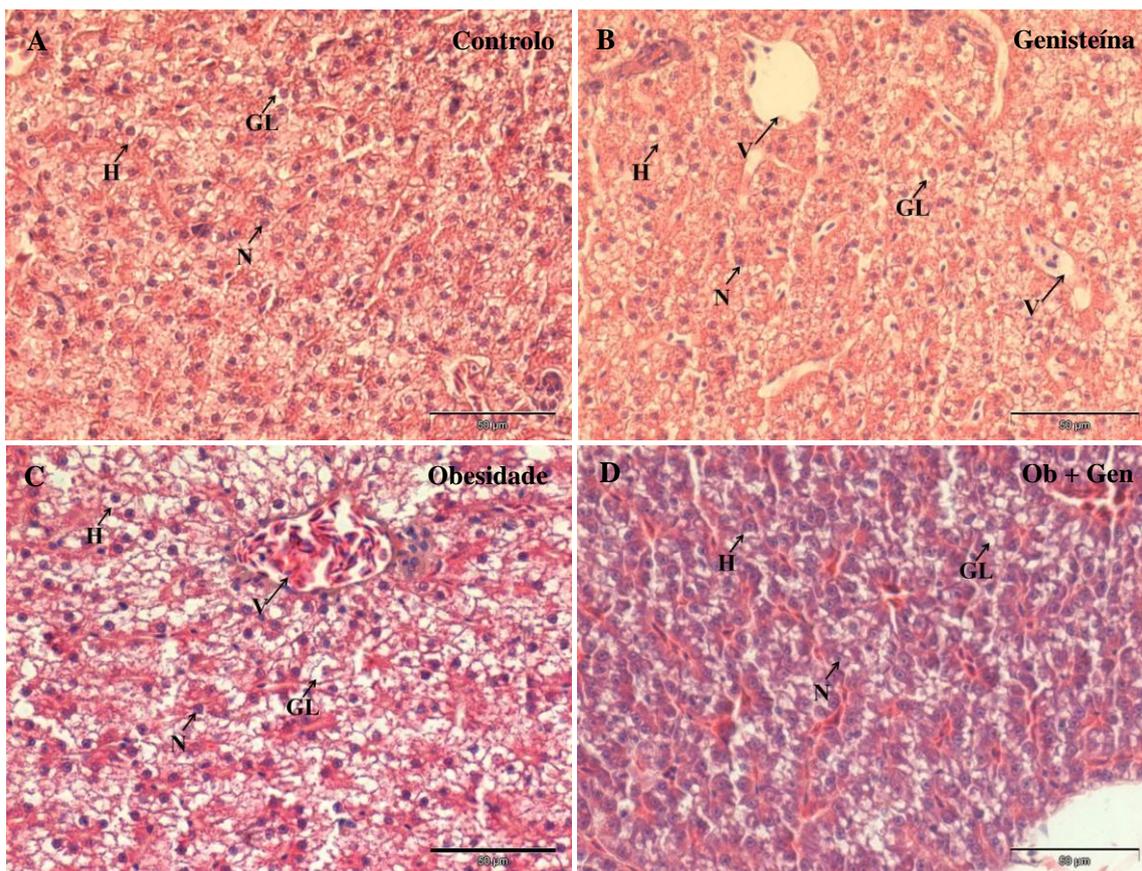


Figura 10 – Imagens representativas de fígado de *Danio rerio*

As imagens representam a histologia do fígado de animais do grupo controlo (A), do grupo genisteína (B), do grupo obesidade (C), e animais do grupo obesidade + genisteína (Ob + Gen) (D). Nas fotos é evidente a presença de hepatócitos (H) com os respetivos núcleos (N) e gotículas lipídicas (GL). Vasos sanguíneos (V). A barra corresponde a 50 µm

3.1.3. Presença de PPAR- γ no fígado

A análise das imagens de imuno-histoquímica demonstrou a presença de PPAR- γ no fígado de peixes-zebra de todos os grupos de estudo (Fig. 11). Contudo, nos animais sujeitos a uma dieta indutora de obesidade (grupo obesidade e grupo obesidade + genisteína) (Fig. 11F e 11L), aparentemente, a marcação anti-PPAR- γ foi visível num maior número de células em comparação com o grupo de controlo (Fig. 11C) e com o grupo genisteína (Fig. 11I).

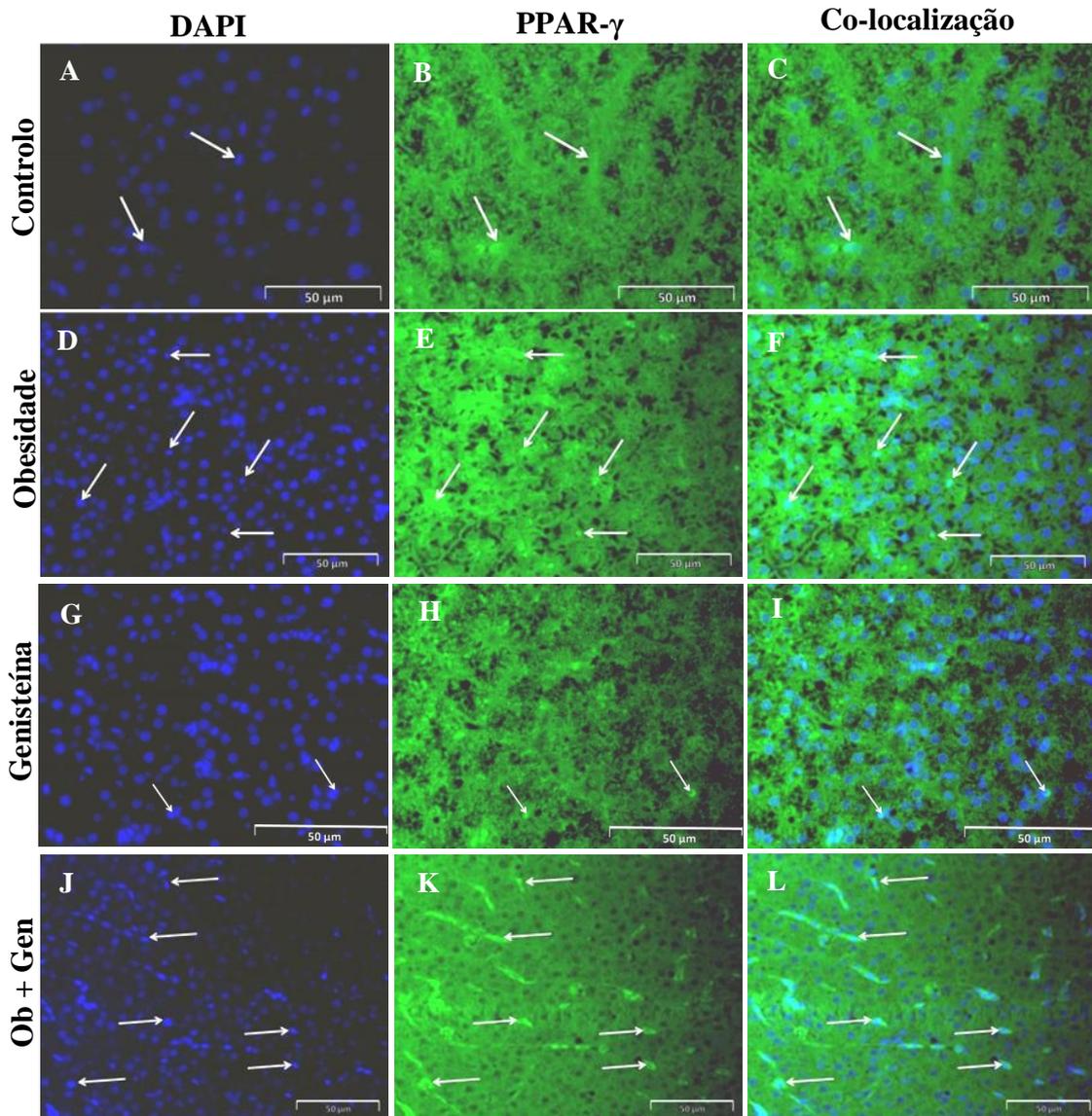


Figura 11 – Presença de PPAR- γ no fígado

As imagens representam a marcação obtida por imuno-histoquímica de PPAR- γ no fígado de peixe-zebra do grupo controlo (A-C), do grupo obesidade (D-F), do grupo genisteína (G-I) e do grupo obesidade + genisteína (Ob + Gen) (J-L). Podem observar-se os núcleos (azul) evidenciados pelo marcador nuclear DAPI (A, D, G e J) e marcação específica para PPAR- γ (verde) conseguida com o anticorpo anti-PPAR- γ (B, E, H e K). A co-localização (C, F, I e L) corresponde à sobreposição dos dois marcadores (DAPI e PPAR- γ). As setas indicam marcação positiva. A barra corresponde a 50 μ m.

3.1.4. Avaliação da expressão gênica de PPAR- γ no fígado

Pela análise dos resultados obtidos por qRT-PCR, detetou-se a expressão de mRNA de PPAR- γ no fígado de peixe-zebra, em todas as condições de estudo (Fig. 12). Verificou-se que ocorreu uma diminuição significativa da sua expressão no grupo de animais expostos a genisteína em comparação com o grupo de controlo ($p = 0,004$). Por outro lado, detetou-se um aumento significativo da expressão de PPAR- γ no grupo obesidade comparativamente, aos animais controlo ($p = 0,042$) e ao grupo genisteína ($p < 0,001$). Observou-se ainda, um aumento significativo na expressão do PPAR- γ no fígado dos animais do grupo obesidade + genisteína (Ob + Gen) em comparação com o grupo genisteína ($p < 0,001$) (Fig. 11).

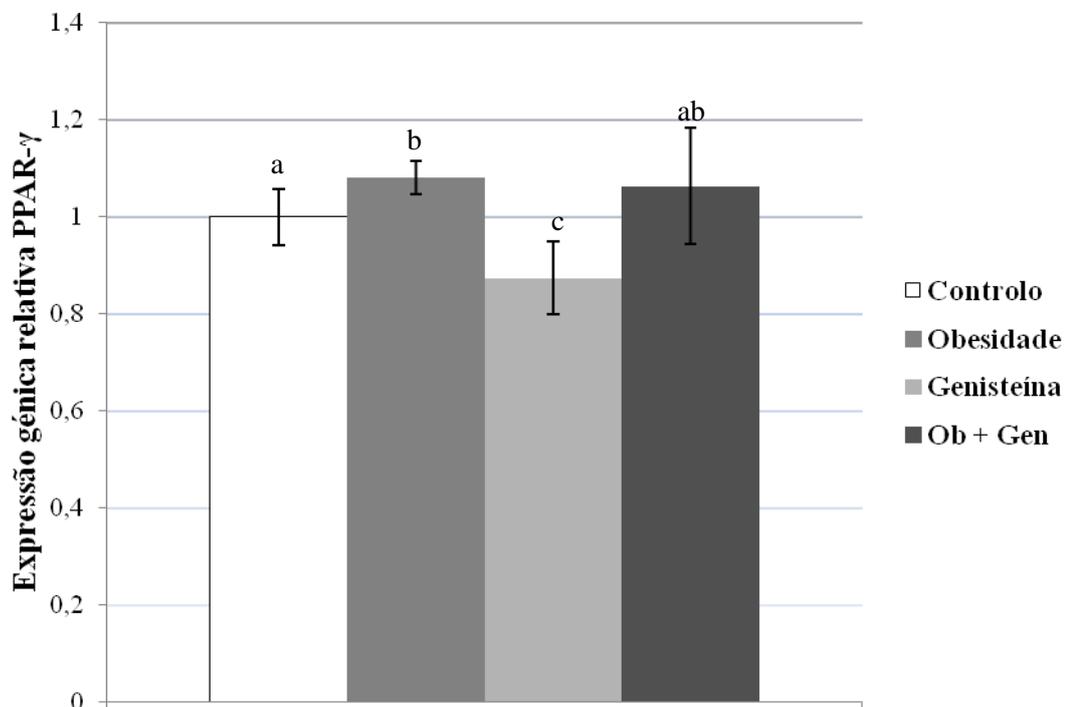


Figura 12 – Expressão gênica relativa do mRNA de PPAR- γ no fígado

Expressão gênica de PPAR- γ nos diferentes grupos em estudo através de q-RT-PCR. O gráfico representa a média \pm desvio padrão ($n=4$). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$); ANOVA de uma entrada com teste Fisher LSD à *posteriori*.

3.2. Avaliação da neurogênese na retina

3.2.1. Análise histológica da retina

A análise das preparações de retina de peixe-zebra permitiu observar as camadas histológicas típicas, em todos os grupos em estudo (Fig. 13). De facto, foi possível distinguir claramente, em todas as situações, o epitélio pigmentado, a camada de fotorreceptores, a nuclear externa, a plexiforme externa, a nuclear interna, a plexiforme interna e a camada de células ganglionares. Estes resultados sugerem que a obesidade, no peixe-zebra, não provoca alterações estruturais profundas na retina.

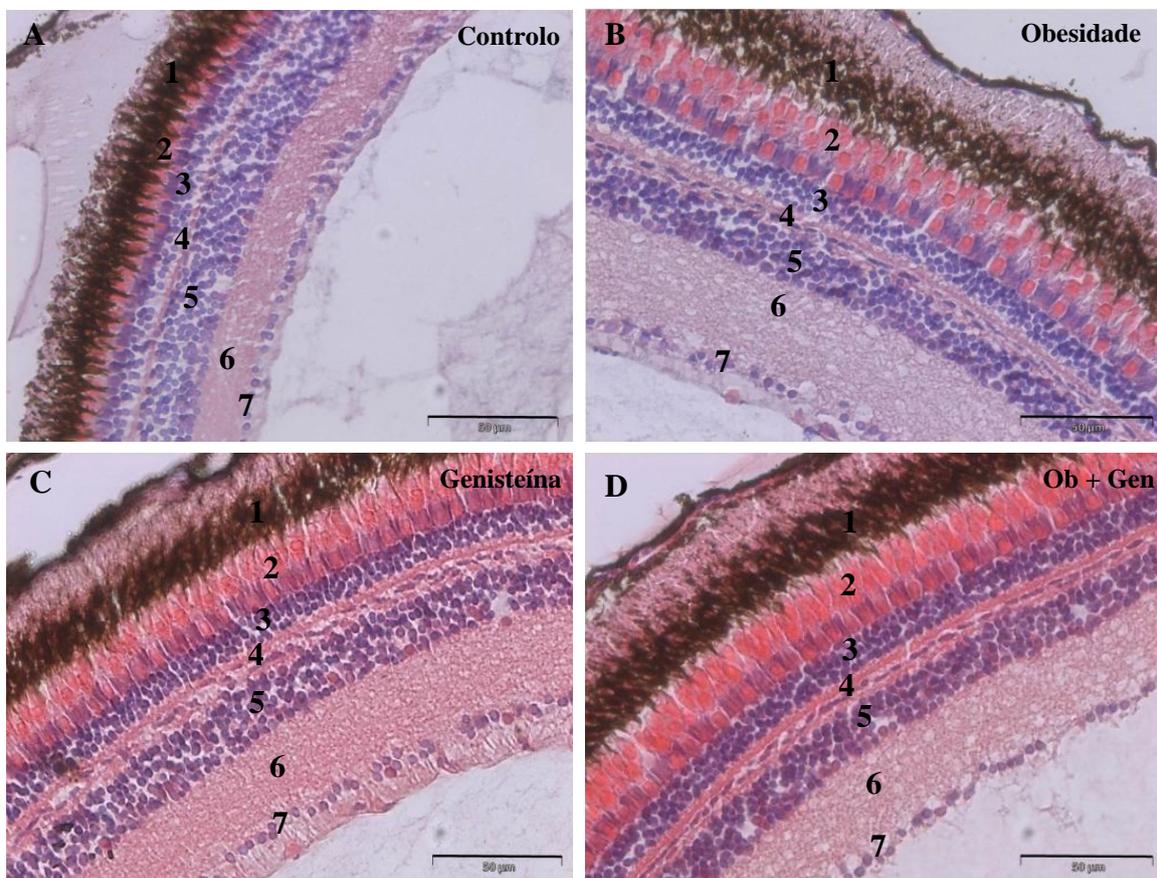


Figura 13 – Cortes histológicos de retina

As imagens apresentadas representam a histologia da retina dos animais controlo (A), animais do grupo obesidade (B), do grupo genisteína (C), e animais do grupo obesidade + genisteína (Ob + Gen) (D). Nas imagens é possível distinguir, em todos os grupos, as diferentes camadas da retina: (1) epitélio pigmentado, (2) camada de fotorreceptores, (3) camada nuclear externa, (4) camada plexiforme externa, (5) camada nuclear interna, (6) camada plexiforme interna e (7) camada de células ganglionares. Coloração com hematoxilina e eosina. A barra corresponde a 50 µm.

3.2.2. PCNA e Sox-2 na retina

A análise das imagens de imuno-histoquímica demonstrou a presença, em todos os grupos em estudo, de células em proliferação, identificadas pelo anticorpo anti-PCNA (vermelho) e de células progenitoras marcadas pelo anticorpo anti-Sox-2 (verde). Mais ainda, verificou-se que em grande parte das células em proliferação são células progenitoras, comprovado pela co-localização (marcação a amarelo) entre as marcações de PCNA e Sox-2 (Figs. 14 e 15).

No grupo de controlo foi possível observar marcação evidente para a Sox-2 (Fig. 14B) e para PCNA (Fig. 14C), sugerindo a presença de células progenitoras, bem como a existência de proliferação celular, respetivamente. Nos animais dos grupos obesidade (Fig. 14E-H), genisteína (Fig. 15A-D) e obesidade + genisteína (Fig. 15E-H), foi detetada uma redução aparente na marcação positiva de células progenitoras (Fig. 14F; Fig. 15B e 15F) e de células em proliferação (Fig. 14G; Fig. 15C e 15G), quando comparados com o grupo de controlo.

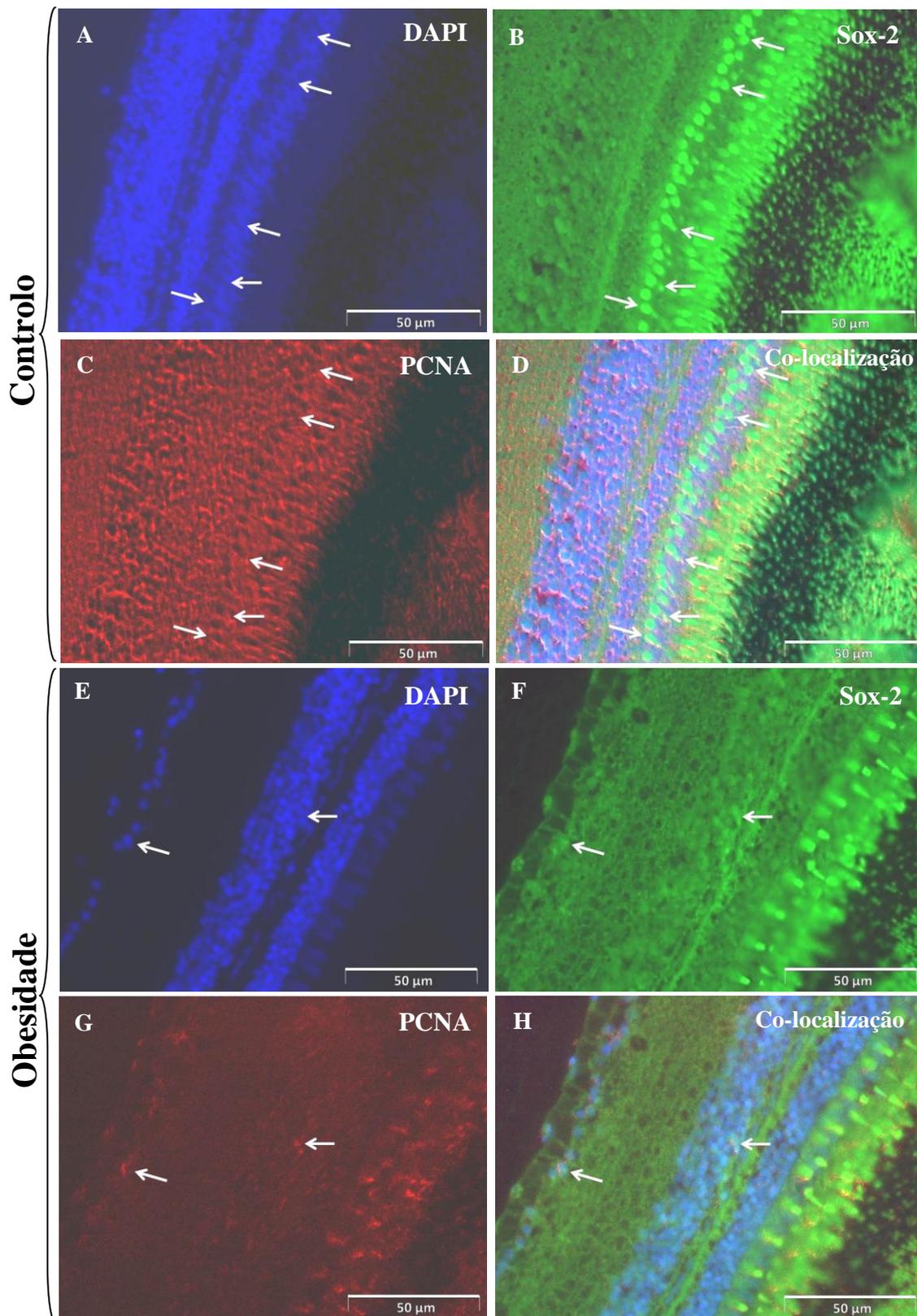


Figura 14 –Imunomarcção de PCNA e Sox-2 na retina dos grupos controlo e obesidade

As imagens representam a marcação de retinas de animais do grupo controlo (A-D) e de animais do grupo obesidade (E-H). Pelas imagens observam-se núcleos (azul) detetados através do marcador nuclear DAPI (A e E); células progenitoras marcadas pelo anticorpo anti-Sox-2 (B e F); e células em proliferação identificadas pelo anticorpo anti-PCNA (C e G). A co-localização corresponde à sobreposição dos três marcadores (DAPI, PCNA e Sox-2), evidenciando-se a marcação a amarelo que demonstra que as células progenitoras se encontram em proliferação (D e H).

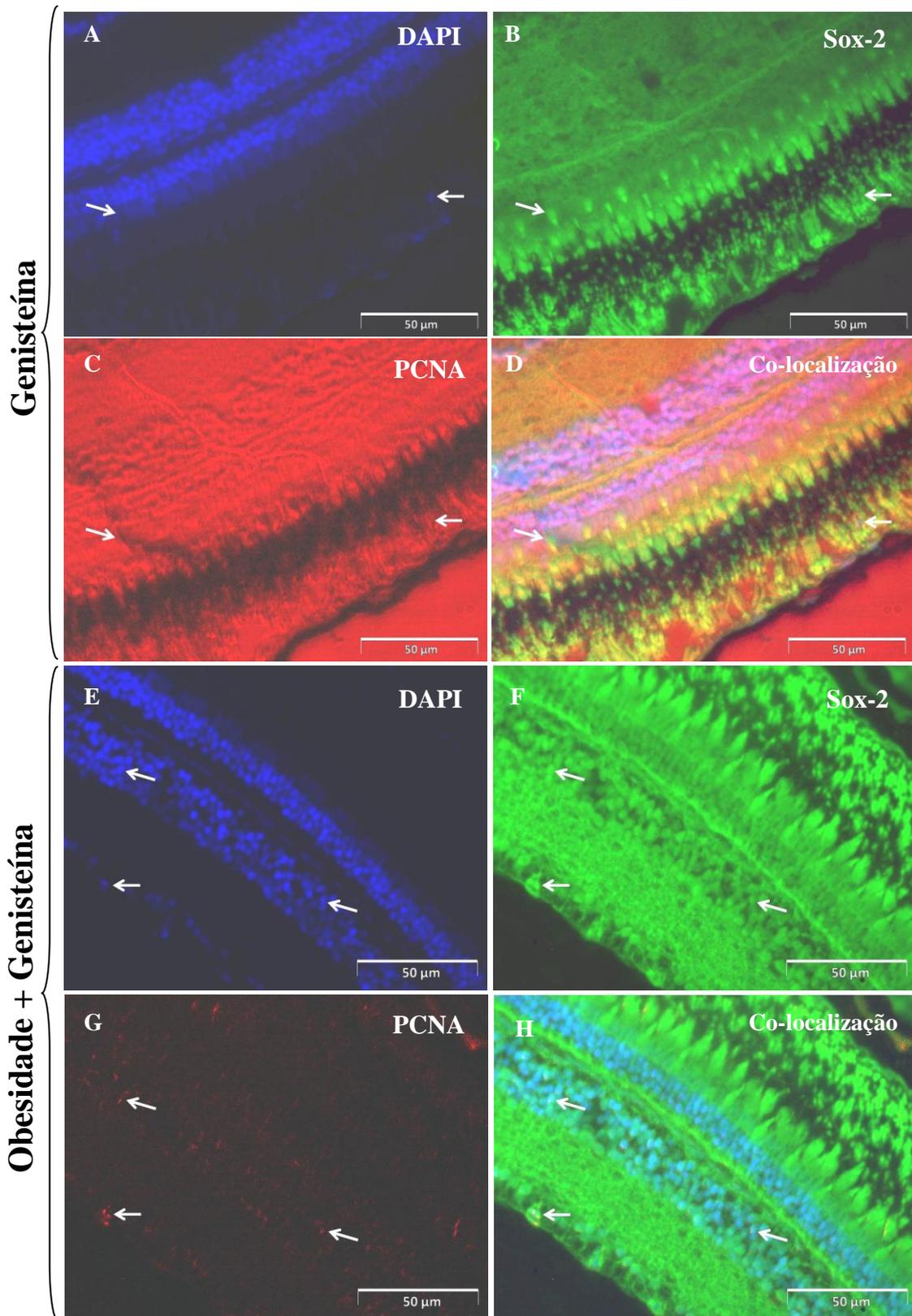


Figura 15 – Imunomarcção de PCNA e Sox-2 dos grupos genisteína e obesidade + genisteína

As imagens representam a marcação de retinas de animais do grupo genisteína (A-D) e do grupo obesidade + genisteína (E-H). Podem observar-se núcleos (azul) detetados através do marcador nuclear DAPI (A e E); células progenitoras marcadas pelo anticorpo anti-Sox-2 (B e F); e células em proliferação identificadas pelo anticorpo anti-PCNA (C e G). A co-localização corresponde à sobreposição dos três marcadores (DAPI, PCNA e Sox-2), evidenciando-se a marcação a amarelo que demonstra que as células progenitoras se encontram em proliferação (D e H).

3.2.3. Avaliação da expressão gênica de PCNA na retina

Os resultados obtidos através do qRT-PCR, demonstram a existência de expressão de PCNA na retina de peixes-zebra, em todas as condições de estudo (Fig. 16). Adicionalmente, verificou-se uma diminuição significativa na expressão do PCNA no grupo de animais de obesidade ($p = 0,01$), expostos a genisteína ($p = 0,011$), e no grupo obesidade + genisteína ($p = 0,034$) em comparação com o grupo controle.

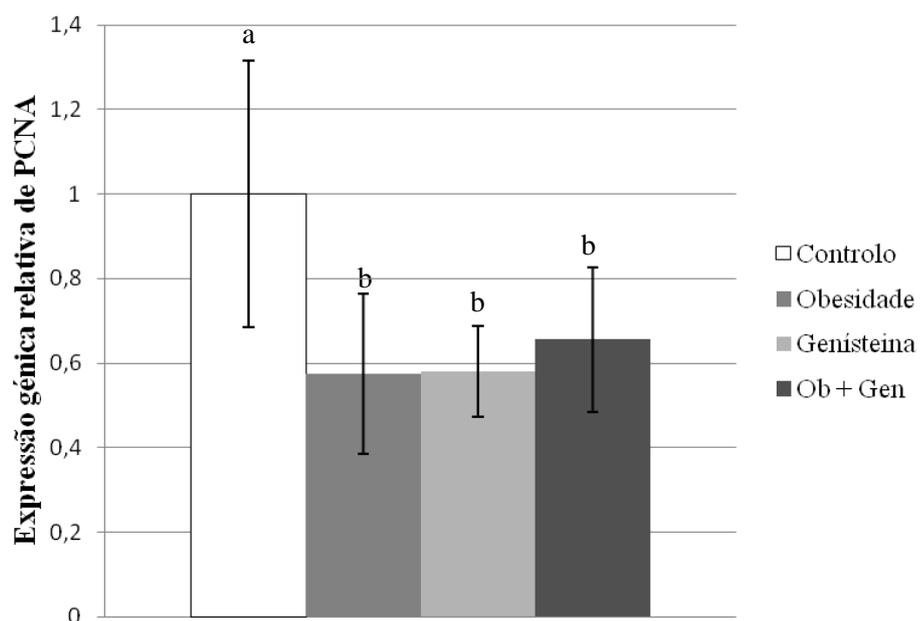


Figura 16 – Expressão gênica relativa do mRNA de PCNA na retina

Expressão gênica de PCNA nos grupos controle, genisteína, obesidade e obesidade + genisteína (Ob + Gen). O gráfico representa a média \pm desvio padrão ($n=4$). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$); ANOVA de uma entrada com teste Fisher LSD *à posteriori*.

3.2.4. Avaliação da expressão gênica de Sox-2 na retina

A expressão do mRNA de Sox-2 foi detetada na retina de peixe-zebra em todas as condições de estudo (Fig. 17). Contudo, verificou-se uma diminuição significativa na expressão deste gene no grupo obesidade em comparação com o grupo de controlo ($p = 0,025$). Por outro lado, verificou-se um aumento significativo na expressão de Sox-2 no grupo obesidade + genisteína em comparação com o grupo obesidade ($p = 0,002$).

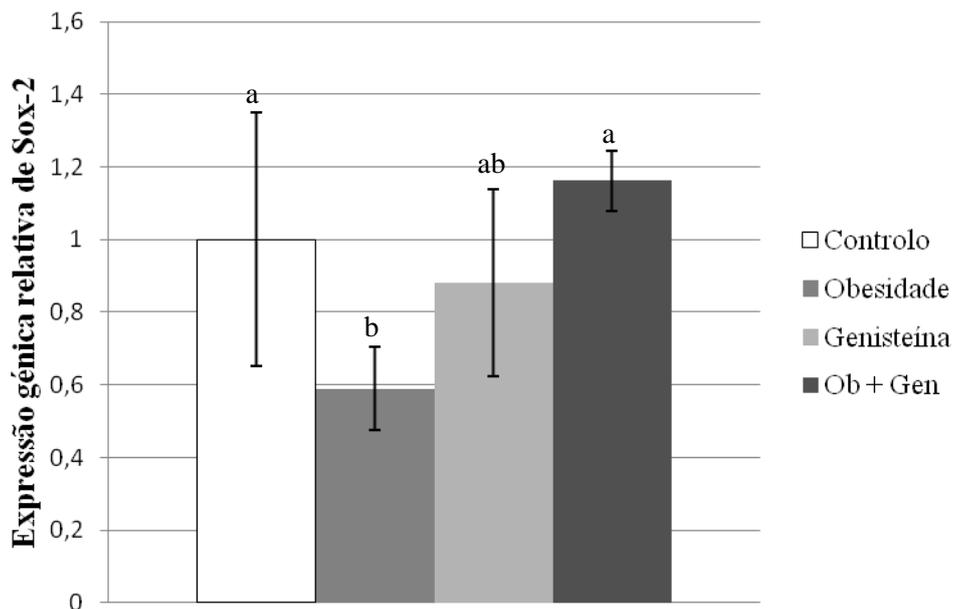


Figura 17 – Expressão gênica relativa do mRNA de Sox-2 na retina

Expressão gênica relativa do Sox-2 nos grupos controlo, genisteína, obesidade e obesidade + genisteína (Ob + Gen). O gráfico representa a média±desvio padrão (n=4). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$); ANOVA de uma entrada com teste Fisher LSD à *posteriori*.

3.3. Cérebro

3.3.1. Análise histológica do cérebro

Pela análise dos cortes de cérebro de peixe-zebra, do grupo controle (Fig. 18A), do grupo obesidade (Fig. 18B), do grupo genisteína (Fig. 18C) e do grupo obesidade + genisteína (Ob + Gen) (Fig. 18D) observou-se que, histologicamente, o cérebro não sofreu alterações evidentes com nenhum dos tratamentos utilizados durante o ensaio experimental.

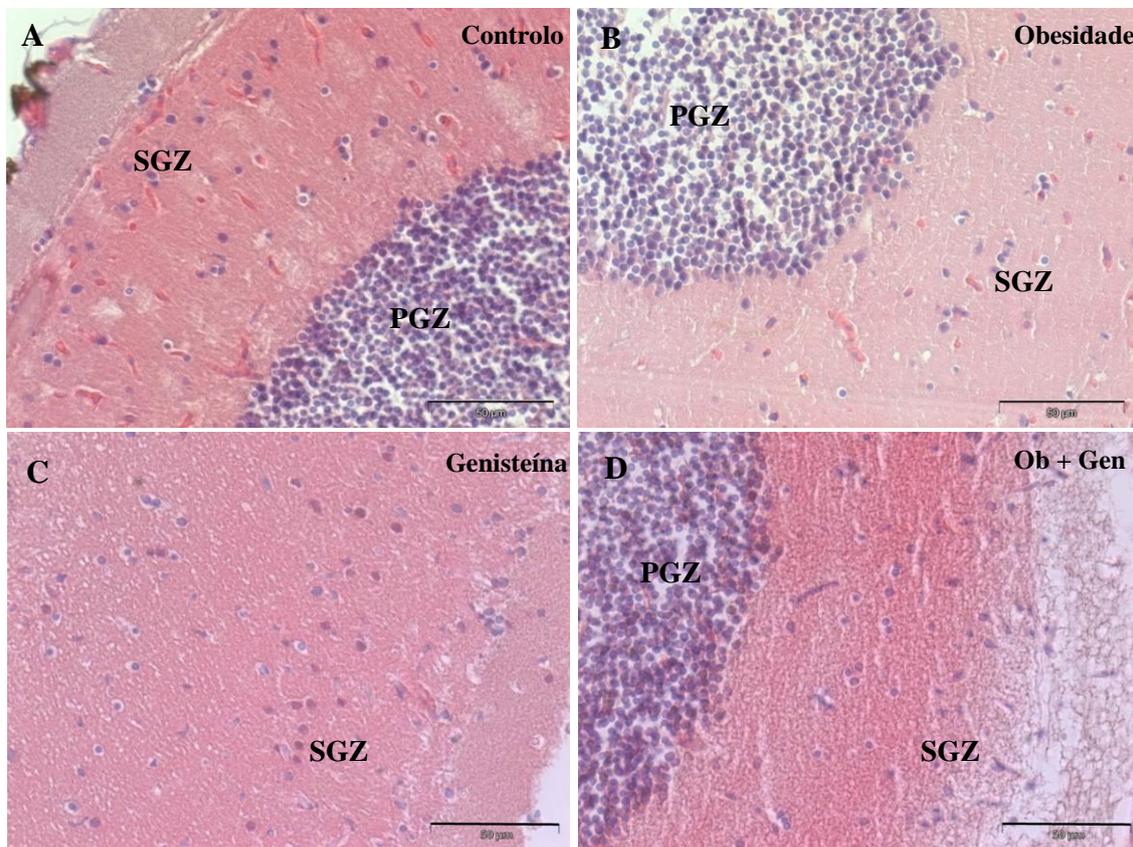


Figura 18 – Cortes histológicos de cérebro

As imagens histológicas apresentadas são representativas do cérebro dos animais do grupo controlo (A), de obesidade (B), de genisteína (C), e de obesidade + genisteína (D). Coloração com hematoxilina e eosina. SGZ – Zona superficial cinzenta; PGZ – Zona periventricular cinzenta. A barra corresponde a 50 µm

3.3.2. PCNA e Sox-2 no cérebro

A análise das imagens de imuno-histoquímica demonstrou que o cérebro de peixe-zebra, em todos os grupos de estudo, apresentou células em proliferação, identificadas pelo anticorpo anti-PCNA (vermelho) e células progenitoras, marcadas pelo anticorpo anti-Sox-2 (verde). Mais ainda, foi possível comprovar que grande parte das células em proliferação eram células progenitoras, dada a co-localização (marcação a amarelo) entre as marcações de PCNA e Sox-2.

Observou-se marcação evidente de Sox-2 (Fig. 19B) e PCNA (Fig. 19C) nos cérebros dos animais do grupo controle, sugerindo a existência de células progenitoras, bem como a presença de proliferação celular, respectivamente. Contudo, nos animais dos grupos obesidade (Fig. 19 E-H), genisteína (Fig. 20A-D) e obesidade + genisteína (Fig. 20E-H), observou-se uma redução aparente na marcação positiva de células progenitoras (Fig.19F; Fig. 20B e 20F) e de células em proliferação (Fig. 19G; Fig. 20C e 20G), quando comparados com o grupo controle.

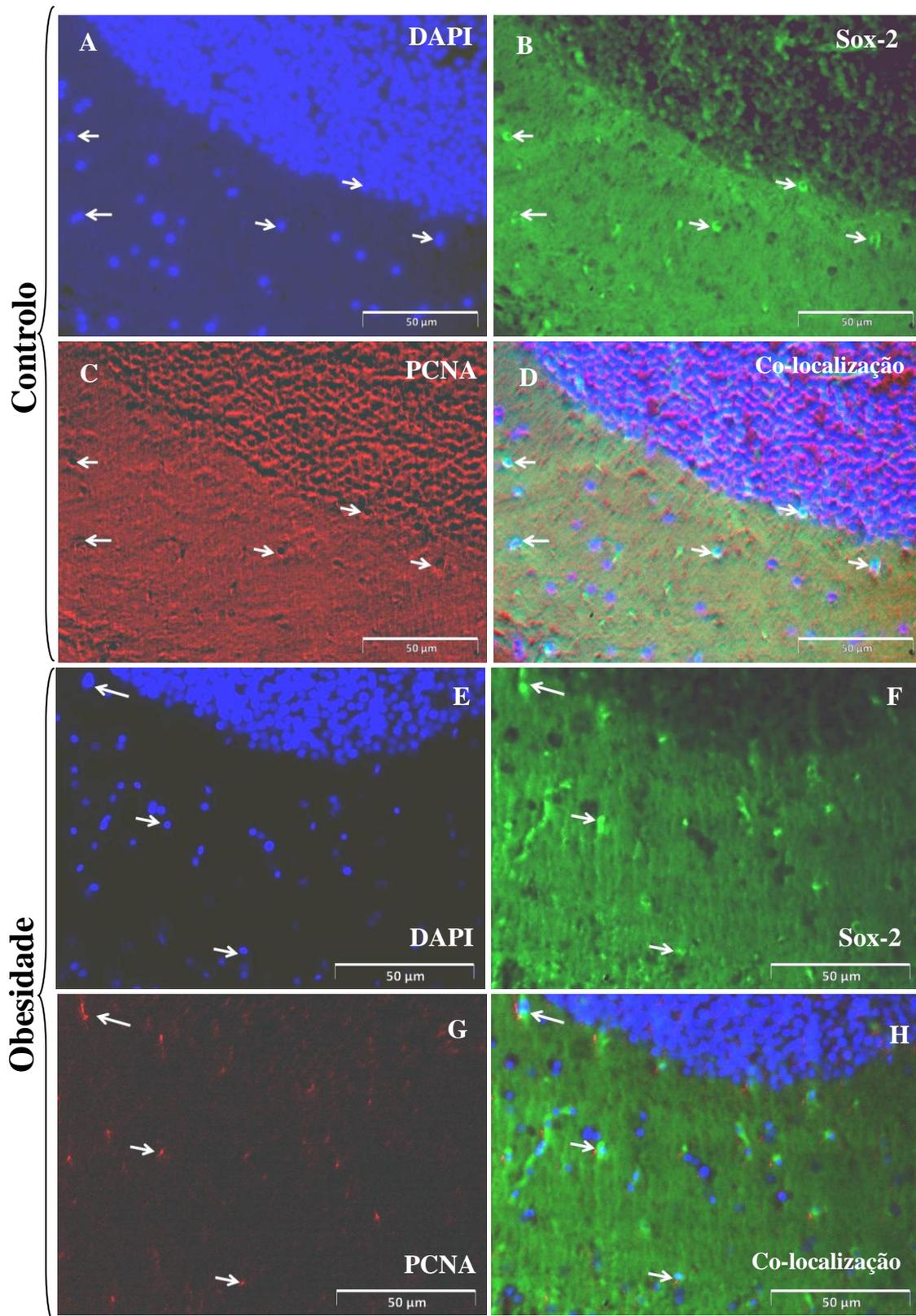


Figura 19 – Imunomarcação de PCNA e Sox-2 no cérebro dos grupos controlo e obesidade.

As imagens demonstram a imunomarcação em cérebro de animais do grupo controlo (A-D) e do grupo obesidade (E-H). Podem observar-se núcleos (azul) detetados através do marcador nuclear DAPI (A e E); células progenitoras marcadas pelo anticorpo anti-Sox-2 (B e F); e células em proliferação identificadas pelo anticorpo anti-PCNA (C e G). A co-localização corresponde à sobreposição dos três marcadores (DAPI, PCNA e Sox-2), evidenciando-se a marcação a amarelo que demonstra que as células progenitoras se encontram em proliferação (D e H).

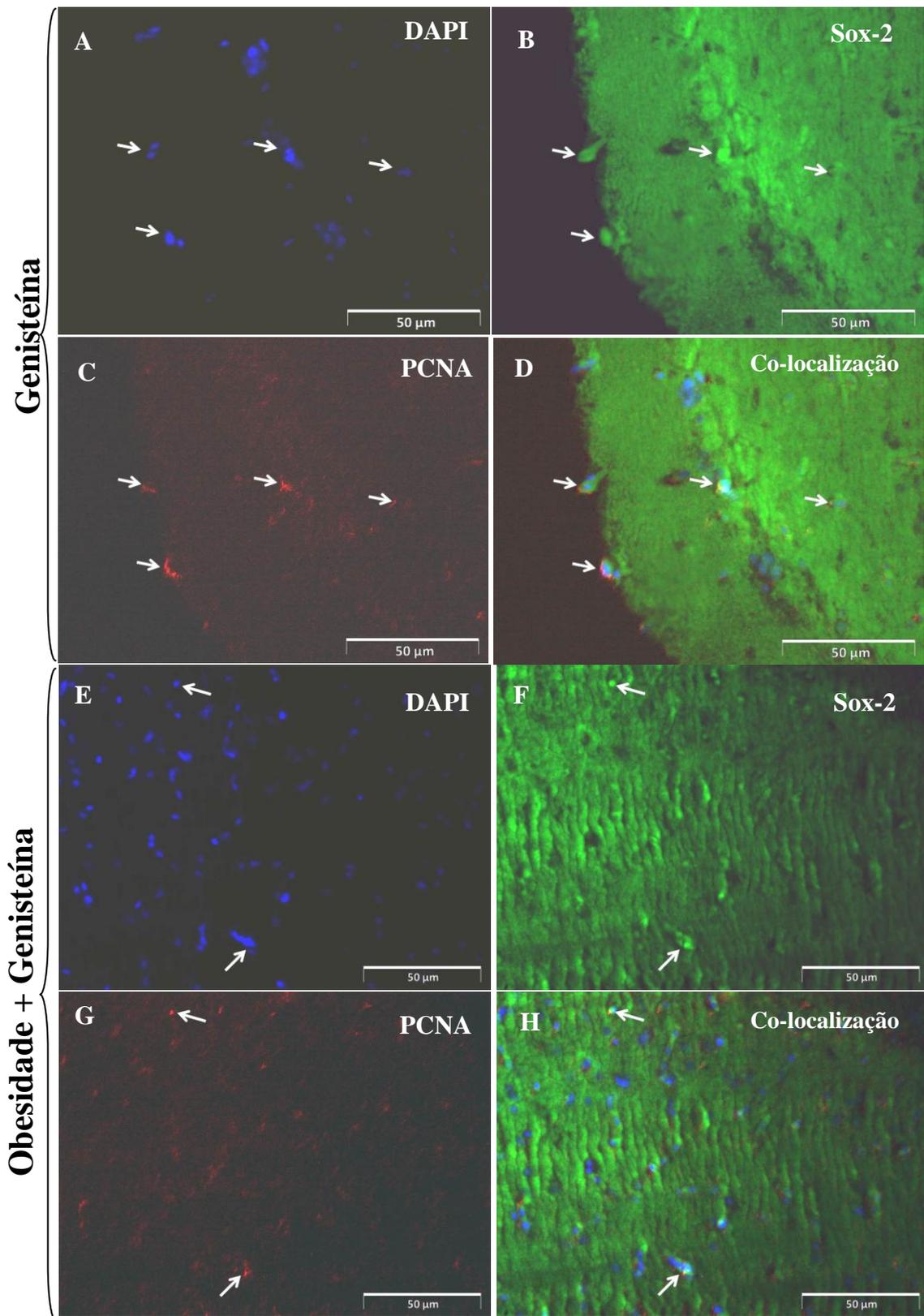


Figura 20 – Imunomarcção de PCNA e Sox-2 no cérebro nos grupos genisteína e obesidade + genisteína

As imagens representam a marcação de cérebros de animais do grupo genisteína (A-D) e do grupo obesidade + genisteína (E-H). Podem observar-se núcleos (azul) detetados através do marcador nuclear DAPI (A e E); células progenitoras marcadas pelo anticorpo anti-Sox-2 (B e F); e células em proliferação identificadas pelo anticorpo anti-PCNA (C e G). A co-localização corresponde à sobreposição dos três marcadores (DAPI, PCNA e Sox-2), evidenciando-se a marcação a amarelo que demonstra que as células progenitoras se encontram em proliferação (D e H).

3.3.3. Avaliação da expressão gênica de PCNA no cérebro

A expressão do mRNA de PCNA foi detetada em cérebros de peixe-zebra de todas as condições de estudo (Fig. 21). Contudo, foi possível detetar-se uma diminuição significativa na expressão do PCNA no grupo genisteína ($p = 0,047$), no grupo obesidade ($p < 0,001$) e no grupo obesidade + genisteína ($p < 0,001$) em relação ao grupo controlo. Adicionalmente, observou-se também uma diminuição significativa na expressão do PCNA no grupo obesidade + genisteína ($p < 0,001$) e no grupo obesidade ($p = 0,009$) relativamente ao grupo genisteína. E ainda, observou-se uma diminuição significativa da expressão do PCNA no grupo obesidade + genisteína relativamente ao grupo obesidade ($p = 0,047$).

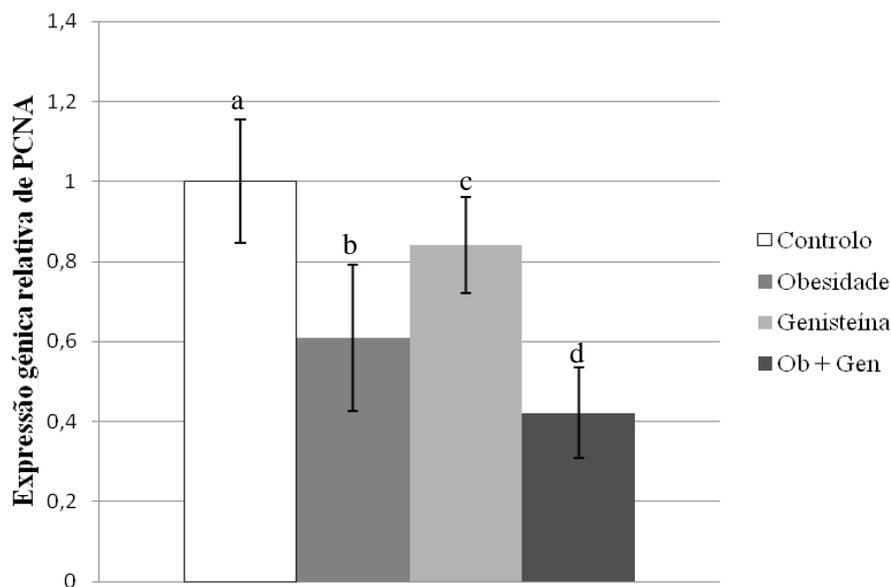


Figura 21 – Expressão gênica relativa do mRNA de PCNA no cérebro

Expressão gênica relativa de PCNA nos grupos controlo, genisteína, obesidade e obesidade + genisteína (Ob + Gen) avaliada por qRT-pCR. O gráfico representa a média \pm desvio padrão ($n=5$). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$); ANOVA de uma entrada com teste Fisher LSD *à posteriori*.

3.3.4. Avaliação da expressão gênica de Sox-2 no cérebro

Tal como observado para o PCNA, a expressão do mRNA de Sox-2 foi detetada em cérebro de peixe-zebra, em todas as condições de estudo (Fig. 22). À semelhança dos resultados obtidos anteriormente, observou-se uma diminuição significativa da expressão do Sox-2 no grupo genisteína ($p < 0,001$), no grupo obesidade ($p < 0,001$) e no grupo obesidade + genisteína ($p < 0,001$) em relação ao grupo controlo. Também foi evidente a existência de uma diminuição significativa na expressão do Sox-2 no grupo obesidade + genisteína ($p < 0,001$) e no grupo obesidade ($p < 0,001$) em comparação com o grupo genisteína.

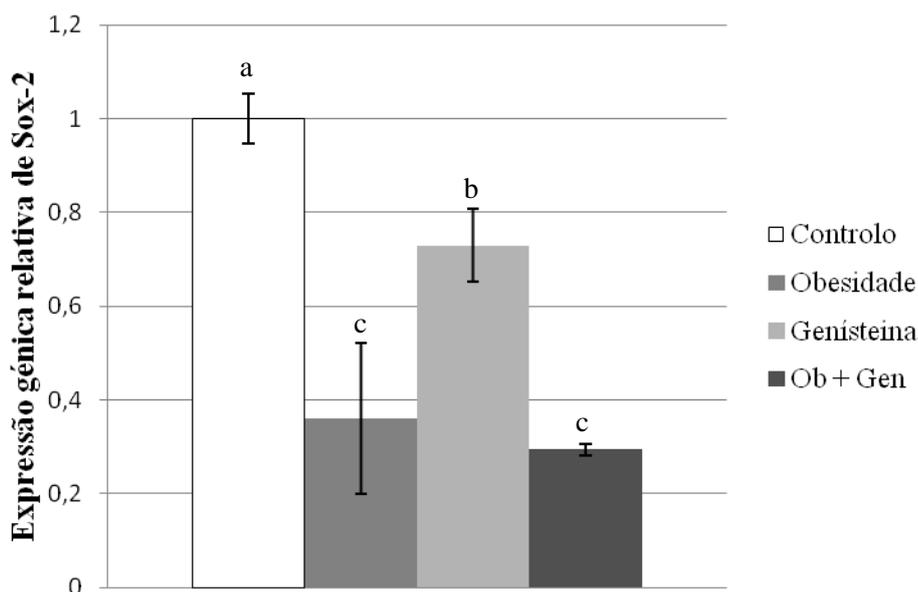


Figura 22 – Expressão gênica relativa do mRNA de Sox-2 no cérebro

Expressão gênica de Sox-2 nos grupos controlo, genisteína, obesidade e obesidade + genisteína (Ob + Gen) avaliada por qRT-PCR. O gráfico representa a média ± desvio padrão ($n=5$). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$); ANOVA de uma entrada com teste Fisher LSD à posteriori.

4. DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença que afeta cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo (Behloul & Wu, 2013). É caracterizada pela acumulação excessiva de lípidos nas células (Oka et al, 2010; Tingaud-Sequeira et al, 2011), sendo o consumo exagerado de calorias, associado a um estilo de vida sedentário, a sua principal causa (Newbold et al, 2009). Diferentes estudos têm vindo a comprovar que a obesidade afeta negativamente a neurogênese no cérebro, provocando uma redução na capacidade de proliferação das células neuronais progenitoras (Park et al, 2010; Sousa-Ferreira et al, 2014). Contudo, embora o peixe-zebra seja um modelo animal cada vez mais utilizado em estudos laboratoriais, os efeitos da obesidade na neurogênese, neste modelo, ainda não foram muito explorados, comparativamente com estudos realizados em mamíferos.

De acordo com o exposto e por apresentar sintomas fisiopatológicos semelhantes aos mamíferos (Oka et al, 2010), no presente trabalho foi escolhido o peixe-zebra como modelo biológico. A obesidade foi induzida pela administração de uma dieta hipercalórica (excesso de *Artémia* sp.) que, para além de ter provocado um aumento significativo no peso dos animais (Fig. 9), também induziu alterações histológicas do fígado (Fig. 10). A análise histológica do fígado permitiu observar a ocorrência de uma grande quantidade de gotículas lipídicas, de diferentes tamanhos, distribuídas por todo o parênquima hepático dos animais do grupo de obesidade. O aumento significativo do peso dos animais e a acumulação de gotículas lipídicas nos hepatócitos dos animais submetidos a uma dieta hipercalórica comprova a indução de obesidade nestes animais, o que está em concordância com trabalhos realizados anteriormente (Oka et al, 2010; Tainaka et al, 2011). A acrescentar à avaliação do peso e da microestrutura do fígado, a indução de obesidade foi também comprovada através da expressão génica e proteica do PPAR- γ . No presente trabalho, a marcação proteica evidenciada e um aumento significativo da expressão génica do PPAR- γ , vêm confirmar a indução de obesidade nos peixes submetidos a dieta hipercalórica (Figs. 11 e 12). Por outro lado, apesar dos grupos expostos à genisteína, histologicamente, se apresentarem semelhantes aos animais do grupo de controlo, comparando o grupo obesidade com o grupo obesidade + genisteína evidenciam-se algumas diferenças. Em concreto, no grupo obesidade + genisteína as gotículas lipídicas, apesar de presentes no citoplasma dos hepatócitos,

apresentaram dimensões bastante mais reduzidas possuindo, deste modo, hepatócitos com morfologia normal e citoplasma abundante. Este resultado vai ao encontro de um trabalho realizado por Lee e colaboradores (2006) em murganhos C57BL/6J, que demonstrou que concentrações elevadas de genisteína (4g/Kg) na dieta diminuem a acumulação de lípidos no fígado, possivelmente pelo aumento da oxidação dos ácidos gordos e o desacoplamento das mitocôndrias (Lee et al, 2006). A expressão génica e imunomarcação do PPAR- γ corrobora os resultados histológicos. Na realidade, os grupos de animais obesos apresentaram valores de expressão génica significativamente superiores aos não obesos. Por outro lado, nos animais expostos a genisteína a expressão do PPAR- γ sofreu diminuições face ao grupo controlo, o que poderá dever-se ao facto da genisteína poder atuar como ligando do PPAR- γ inibindo a sua expressão (Dang et al, 2003; Jeong & Yoon, 2011). Num estudo realizado em fêmeas de ratos ovariectomizadas e na linha celular de adipócitos 3T3-L1, Jeong e Yoon (2011) demonstraram que, tanto em estudos *in vivo* como *in vitro*, a genisteína e o estradiol interferem na expressão do PPAR- γ , inibindo os genes responsáveis pela sua ativação, reduzindo assim a sua expressão (Jeong & Yoon, 2011).

A neurogénese é um processo caracterizado pela produção de novos neurónios e que ocorre ao longo de toda a vida (Altman, 1962; Kohman & Rhodes, 2013; Zupanc & Zupanc, 2006). A ocorrência de neurogénese na fase adulta foi já observada na maioria dos vertebrados, e em particular nos peixes teleósteos (Hitchcock et al, 2004; Zupanc & Zupanc, 2006). Comparativamente aos mamíferos, os peixes teleósteos adultos apresentam uma capacidade superior de neurogénese e de regeneração de neurónios em dezenas de regiões do cérebro (Ekdahl et al, 2009; Zupanc et al, 2005) e na retina (Centanin et al, 2011; Otteson & Hitchcock, 2003). No presente trabalho, em peixe-zebra, após a análise da expressão génica e imunomarcação de PCNA e Sox-2 confirmámos a presença de células progenitoras em proliferação o que poderá indicar a ocorrência de neurogénese na retina e no cérebro.

Estudos realizados em mamíferos referem que a obesidade causa uma diminuição na taxa de proliferação das células progenitoras neuronais, devido a inflamação dos tecidos, a peroxidação lipídica e uma diminuição da expressão de BDNF resultando, deste modo, numa redução da neurogénese no cérebro (Park et al, 2010; Purkayastha & Cai, 2013). Mais ainda, num estudo realizado em ratos Sprague-Dawley, Lindqvist e colaboradores (2006) demonstraram que uma dieta rica em lípidos provoca

uma diminuição da neurogénese no hipocampo (Lindqvist et al, 2006). Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que, tanto na retina como no cérebro, a indução da obesidade provoca numa diminuição significativa na expressão génica do PCNA e Sox-2, bem como uma diminuição aparente na marcação de células positivas para PCNA e Sox-2 nos dois tecidos em estudo. Deste modo, os resultados do presente trabalho demonstram que a resposta neurogénica do peixe-zebra à obesidade é semelhante à previamente observada em cérebro de mamíferos (McNay et al, 2012; Park et al, 2010).

Com o presente estudo pretendemos, além de avaliar o efeito da obesidade, testar também a ação da genisteína, individualmente e em simultâneo com a indução da obesidade, na modulação da neurogénese na retina e no cérebro de peixe-zebra. Os animais expostos individualmente a genisteína, e em simultâneo, a genisteína e à dieta hipercalórica, não sofreram alterações histológicas evidentes na retina e no cérebro de peixe-zebra, observando-se uma morfologia idêntica em todas as condições. Este resultado poderá dever-se ao facto das dietas hipercalóricas apresentarem um efeito mais severo quando administradas durante um longo período de tempo. Um estudo realizado por Thaler e colaboradores (2012), demonstrou que o consumo de dietas hipercalóricas durante um longo período de tempo (20 semanas) provoca a perda de neurónios e inflamação crónica no cérebro de ratos (Thaler et al, 2012).

Analisando os resultados obtidos na retina, e em particular os resultados dos dois grupos expostos a genisteína, foi possível verificar uma diminuição significativa na expressão génica e de marcação positiva de PCNA em comparação ao grupo de controlo. Contrariamente, no que diz respeito à expressão do gene Sox-2 não se detetou uma variação significativa deste gene em comparação ao controlo, apesar de ser evidente uma tendência para uma redução na expressão génica e da marcação proteica. Estes resultados poderão dever-se ao facto da genisteína, isoladamente, possuir a capacidade de atuar em diferentes mecanismos celulares bioquímicos, inibindo a proteína tirosina cinase (Akiyama et al, 1987; Sarkar et al, 2006) e os seus recetores (Annenkov, 2014). Estes recetores são responsáveis pela transmissão de sinais importantes para as células estaminais e células neuronais progenitoras, tais como o crescimento, a proliferação, o desenvolvimento e a migração celular (Annenkov, 2014). Por outro lado, no grupo obesidade + genisteína foi visível um aumento significativo da expressão do gene Sox-2 quando comparado com o grupo de animais exposto à dieta

hipercalórica, o que poderá sugerir que a genisteína atua como protetor das células neuronais progenitoras contra as lesões causadas pela obesidade (Fig. 17). Na realidade, um estudo realizado por Hayashi e colaboradores (1997), demonstrou que a genisteína possui uma ação protetora neuronal, através da inibição da tirosina cinase, em situações de lesões ocorridas durante a fase de isquemia, prevenindo assim a ocorrência de degeneração neuronal da retina interna de ratos (Hayashi et al, 1997).

Relativamente aos resultados obtidos no cérebro de peixe-zebra, e em particular para os dois grupos expostos à genisteína, verificou-se uma diminuição significativa da expressão génica do PCNA e Sox-2, tal como uma redução na imunomarcação positiva, comparativamente ao grupo controlo. À semelhança do demonstrado para o estradiol, estes resultados comprovam que, em peixe-zebra, a genisteína influencia negativamente a neurogénese adulta e afeta a homeostasia da população de células proliferativas (Diotel et al, 2013; Makantasi & Dermon, 2014). Na realidade, Diotel e colaboradores (2013), demonstraram que o estradiol reduz a capacidade de neurogénese adulta em peixe-zebra, não afetando, contudo, a neurogénese reparadora (Diotel et al, 2013). Resultados semelhantes foram descritos por Makantasi e Dermon (2014), em peixe-zebra do género feminino, demonstrando que tratamentos consecutivos com estradiol promovem uma redução da neurogénese adulta no cérebro e afetam a homeostasia da população de células proliferativas (Makantasi & Dermon, 2014). Dada a homologia entre a hormona 17β -estradiol e a genisteína, pensamos que os resultados previamente descritos para o estradiol corroboram os nossos, obtidos após exposição a genisteína. Efetivamente esta homologia foi anteriormente comprovada pelo trabalho de Pan e colaboradores (2012), no qual os resultados obtidos com a genisteína e o 17β -estradiol foram semelhantes. Por sua vez, a ação combinada da genisteína com a obesidade provocou uma diminuição ainda mais acentuada na expressão do PCNA e do Sox-2 comparativamente ao grupo de animais expostos apenas a genisteína. Como referido anteriormente a obesidade e a genisteína atuam na diminuição da taxa de proliferação das células progenitoras neuronais (Diotel et al, 2013; Park et al, 2010), observando-se que o efeito combinado induz uma ação cumulativa, ainda mais severa.

Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que a obesidade reduz significativamente a neurogénese na retina e cérebro de peixe-zebra, indo ao encontro de estudos anteriores realizados em mamíferos (Lindqvist et al, 2006; Park et al, 2010). Mais ainda, foi possível demonstrar que em peixe-zebra o efeito isolado da genisteína

possui uma ação negativa na neurogênese. No entanto, foi possível observar que, nos animais obesos e expostos, simultaneamente, a genisteína, a retina e o cérebro reagem de maneira diferente, sugerindo que diferentes vias de sinalização possam estar envolvidas em cada tecido e/ ou órgão.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, com a realização deste trabalho verificámos que o peixe-zebra é, de facto, um bom modelo animal para o estudo dos efeitos da obesidade e da genisteína na neurogénese de retina e cérebro. Assim, com este trabalho podemos afirmar que a dieta hipercalórica (*Artemia* sp. em excesso) é capaz de contribuir para a indução de obesidade nos animais, como se verificou pelas alterações histológicas e de expressão génica e imunomarcção do PPAR- γ . Por outro lado, concluímos também que a obesidade afeta de forma negativa a proliferação celular bem como a presença de células progenitoras, na retina e cérebro de peixe-zebra, dada a diminuição da expressão génica e imunomarcção de PCNA e Sox-2, o que sugere uma redução da neurogénese em ambos.

Por outro lado, foi possível concluir que a genisteína, quando associada à obesidade, apresenta uma ação de proteção neuronal na retina, tendo sido verificado um aumento da expressão dos genes PCNA e Sox-2, indiciando uma possível contribuição para o aumento de neurogénese. Contudo, no cérebro dos animais obesos, a presença de genisteína causou uma diminuição mais acentuada da expressão génica do PCNA e Sox-2, o que aponta para o envolvimento de outros mecanismos de ação da genisteína na neurogénese em condições de obesidade.

Em estudos futuros, de forma a complementar e esclarecer algumas questões deixadas em aberto neste trabalho, poderia ser realizada uma quantificação proteica do PCNA e Sox-2, recorrendo à técnica de *western blot*. A acrescentar, seria também importante, realizar-se um estudo para avaliar as diferentes vias de sinalização envolvidas, para ajudar a elucidar o mecanismo de ação da genisteína na retina e no cérebro de peixe-zebra. Por outro lado, em termos de delineamento experimental poderia recorrer-se à estratégia de aumentar o tempo de exposição com genisteína, bem como utilizar diferentes concentrações, para se analisar se existem diferenças na expressão de PCNA e Sox-2 nestas condições.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adolf B, Chapouton P, Lam CS, Topp S, Tannhauser B, Strahle U, Gotz M, Bally-Cuif L (2006) Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Developmental biology* **295**: 278-293
- Ahmad I (2001) Stem cells: new opportunities to treat eye diseases. *Investigative ophthalmology & visual science* **42**: 2743-2748
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *Journal of biological chemistry* **262**: 5592-5595
- Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* **135**: 1127-1128
- Annenkov A (2014) Receptor tyrosine kinase (RTK) signalling in the control of neural stem and progenitor cell (NSPC) development. *Molecular neurobiology* **49**: 440-471
- Bani-Yaghoob M, Tremblay RG, Lei JX, Zhang D, Zurakowski B, Sandhu JK, Smith B, Ribocco-Lutkiewicz M, Kennedy J, Walker PR, Sikorska M (2006) Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. *Developmental biology* **295**: 52-66
- Barha CK, Galea LAM (2010) Influence of different estrogens on neuroplasticity and cognition in the hippocampus. *Biochimica et biophysica acta (BBA) - General Subjects* **1800**: 1056-1067
- Behloul N, Wu G (2013) Genistein: A promising therapeutic agent for obesity and diabetes treatment. *European journal of pharmacology* **698**: 31-38
- Beltz BS, Tlusty MF, Benton JL, Sandeman DC (2007) Omega-3 fatty acids upregulate adult neurogenesis. *Neuroscience letters* **415**: 154-158
- Bilotta J, Saszik S (2001) The zebrafish as a model visual system. *International journal of developmental neuroscience* **19**: 621-629
- Bowers JM, Waddell J, McCarthy MM (2010) A developmental sex difference in hippocampal neurogenesis is mediated by endogenous oestradiol. *Biology of sex differences* **1**: 8
- Briggs JP (2002) The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *American journal of physiology regulatory, integrative and comparative physiology* **282**: R3-9
- Brock O, Keller M, Veyrac A, Douhard Q, Bakker J (2010) Short term treatment with estradiol decreases the rate of newly generated cells in the subventricular zone and main olfactory bulb of adult female mice. *Neuroscience* **166**: 368-376
- Cameron DA (2000) Cellular proliferation and neurogenesis in the injured retina of adult zebrafish. *Visual neuroscience* **17**: 789-797
- Cayre M, Malaterre J, Scotto-Lomassese S, Strambi C, Strambi A (2002) The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **132**: 1-15
- Centanin L, Hoeckendorf B, Wittbrodt J (2011) Fate Restriction and Multipotency in Retinal Stem Cells. *Cell Stem Cell* **9**: 553-562

- Cheng M-F (2013) Hypothalamic neurogenesis in the adult brain. *Frontiers in neuroendocrinology* **34**: 167-178
- Cheung N, Wong TY (2007) Obesity and Eye Diseases. *Survey of ophthalmology* **52**: 180-195
- da Silva FMC, dos Santos JC, Campos JLO, Mafud AC, Polikarpov I, Figueira ACM, Nascimento AS (2013) Structure-based identification of novel PPAR gamma ligands. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **23**: 5795-5802
- Dang ZC, Audinot V, Papapoulos SE, Boutin JA, Löwik CWGM (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *Journal of biological chemistry* **278**: 962-967
- Diotel N, Vaillant C, Gabbero C, Mironov S, Fostier A, Gueguen M-M, Anglade I, Kah O, Pellegrini E (2013) Effects of estradiol in adult neurogenesis and brain repair in zebrafish. *Hormones and behavior* **63**: 193-207
- Doe CQ (2008) Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation. *Development* **135**: 1575-1587
- DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2009) Neuroprotective actions of selective estrogen receptor modulators. *Psychoneuroendocrinology* **34**, **Supplement 1**: S113-S122
- Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O (2009) Brain inflammation and adult neurogenesis: The dual role of microglia. *Neuroscience* **158**: 1021-1029
- Filby AL, Paull GC, Bartlett EJ, Van Look KJW, Tyler CR (2010) Physiological and health consequences of social status in zebrafish (*Danio rerio*). *Physiology & behavior* **101**: 576-587
- Fischer AJ (2005) Neural regeneration in the chick retina. *Progress in retinal and eye research* **24**: 161-182
- Fischer AJ, Bosse JL, El-Hodiri HM (2013) The ciliary marginal zone (CMZ) in development and regeneration of the vertebrate eye. *Experimental Eye Research* **116**: 199-204
- Font E, Desfilis E, Perez-Canellas MM, Garcia-Verdugo JM (2001) Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain, behavior and evolution* **58**: 276-295
- Gage FH (2000) Mammalian Neural Stem Cells. *Science* **287**: 1433
- Gage FH (2002) Neurogenesis in the adult brain. *The Journal of neuroscience* **22**: 612-613
- Gerhard GS (2003) Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. *Experimental gerontology* **38**: 1333-1341
- Gerhard GS, Kauffman EJ, Wang X, Stewart R, Moore JL, Kasales CJ, Demidenko E, Cheng KC (2002) Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Experimental gerontology* **37**: 1055-1068
- Germana A, Montalbano G, Guerrero MC, Amato V, Laura R, Magnoli D, Campo S, Suarez-Fernandez E, Ciriaco E, Vega JA (2011) Developmental changes in the expression of Sox2 in the zebrafish brain. *Microscopy research and technique* **74**: 347-354
- Gijsbers L, Man HY, Kloet SK, de Haan LH, Keijer J, Rietjens IM, van der Burg B, Aarts JM (2011) Stable reporter cell lines for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma)-mediated modulation of gene expression. *Analytical biochemistry* **414**: 77-83
- Gilbert SF (2010) *Developmental biology*, 9th edn. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.

- Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M (2006) Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: Origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Developmental biology* **295**: 263-277
- Gupta N, Brown KE, Milam AH (2003) Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Experimental eye research* **76**: 463-471
- Hansel DE, Eipper BA, Ronnett GV (2001) Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. *Nature* **410**: 940-944
- Hayashi A, Weinberger AW, Kim HC, de Juan E, Jr. (1997) Genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor, ameliorates retinal degeneration after ischemia-reperfusion injury in rat. *Investigative ophthalmology & visual science* **38**: 1193-1202
- Hinsch K, Zupanc GKH (2006) Isolation, cultivation, and differentiation of neural stem cells from adult fish brain. *Journal of neuroscience methods* **158**: 75-88
- Hitchcock P, Ochocinska M, Sieh A, Otteson D (2004) Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Progress in retinal and eye research* **23**: 183-194
- Holtmann M, Dorn A (2009) Midgut pseudotumors and the maintenance of tissue homeostasis: studies on aging and manipulated stick insects. *Journal of morphology* **270**: 227-240
- Ibrahim AS, El-Shishtawy MM, Pena A, Jr., Liou GI (2010) Genistein attenuates retinal inflammation associated with diabetes by targeting of microglial activation. *Molecular vision* **16**: 2033-2042
- Ikenaga T (2013) Teleost Fish. In *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*, Manto M, Schmahmann J, Rossi F, Gruol D, Koibuchi N (eds), 64, pp 1463-1480. Springer Netherlands
- Ino H, Chiba T (2000) Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the adult and developing mouse nervous system. *Molecular brain research* **78**: 163-174
- Ito Y, Tanaka H, Okamoto H, Ohshima T (2010) Characterization of neural stem cells and their progeny in the adult zebrafish optic tectum. *Developmental biology* **342**: 26-38
- Jeong S, Yoon M (2011) 17[beta]-Estradiol inhibition of PPAR[gamma]-induced adipogenesis and adipocyte-specific gene expression. *Acta Pharmacologica Sinica* **32**: 230-238
- Karimi SA, Salehi I, Komaki A, Sarihi A, Zarei M, Shahidi S (2013) Effect of high-fat diet and antioxidants on hippocampal long-term potentiation in rats: An in vivo study. *Brain research* **1539**: 1-6
- Kaslin J, Ganz J, Brand M (2008) Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences* **363**: 101-122
- Keller ET, Murtha JM (2004) The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. *Comparative biochemistry and physiology toxicology & pharmacology : CBP* **138**: 335-341
- Kishi S, Uchiyama J, Baughman AM, Goto T, Lin MC, Tsai SB (2003) The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence. *Experimental gerontology* **38**: 777-786

- Kizil C, Kaslin J, Kroehne V, Brand M (2012) Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. *Developmental neurobiology* **72**: 429-461
- Knoblich JA (2001) Asymmetric cell division during animal development. *Nature reviews molecular cell biology* **2**: 11-20
- Kohman RA, Rhodes JS (2013) Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain, behavior, and immunity* **27**: 22-32
- Kopelman PG (2000) Obesity as a medical problem. *Nature* **404**: 635-643
- Kramarova TV, Dahlman Wright K, Pongratz I (2009) The role of the estrogen receptors in obesity. *Drug discovery today: disease mechanisms* **6**: e49-e54
- Lawrence C (2007) The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* **269**: 1-20
- Lawrence C, Best J, James A, Maloney K (2012) The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture* **368-369**: 103-108
- Leake LD (1975) *Comparative histology: an introduction to the microscopic structure of animals*: Academic Press.
- Lee YM, Choi JS, Kim MH, Jung MH, Lee YS, Song J (2006) Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed high-fat diets. *Nutrition* **22**: 956-964
- Lefebvre V, Dumitriu B, Penzo-Méndez A, Han Y, Pallavi B (2007) Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**: 2195-2214
- Lele Z, Krone PH (1996) The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology advances* **14**: 57-72
- Li J, Siegel M, Yuan M, Zeng Z, Finnucan L, Persky R, Hurn PD, McCullough LD (2011) Estrogen enhances neurogenesis and behavioral recovery after stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* **31**: 413-425
- Lindqvist A, Mohapel P, Bouter B, Frielingsdorf H, Pizzo D, Brundin P, Erlanson-Albertsson C (2006) High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *European journal of neurology* **13**: 1385-1388
- Lu J, Tsai T, Choo S, Yeh S, Tang R, Yang A, Lee H (2011) Induction of apoptosis and inhibition of cell growth by tbx5 knockdown contribute to dysmorphogenesis in Zebrafish embryos. *Journal of biomedical science* **18**: 73
- Ma W, Yan RT, Li X, Wang SZ (2009) Reprogramming retinal pigment epithelium to differentiate toward retinal neurons with Sox2. *Stem cells* **27**: 1376-1387
- Makantasi P, Dermon CR (2014) Estradiol treatment decreases cell proliferation in the neurogenic zones of adult female zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Neuroscience* **271**: 306-320
- Malicki J, Jo H, Wei X, Hsiung M, Pujic Z (2002) Analysis of gene function in the zebrafish retina. *Methods* **28**: 427-438
- Mayden RL, Tang KL, Conway KW, Freyhof J, Chamberlain S, Haskins M, Schneider L, Sudkamp M, Wood RM, Agnew M, Bufalino A, Sulaiman Z, Miya M, Saitoh K, He S (2007) Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: a framework for

comparative and evolutionary studies of a model species. *Journal of experimental zoology Part B, Molecular and developmental evolution* **308**: 642-654

McNay DEG, Brian, xE, on N, Kokoeva MV, Maratos-Flier E, Flier JS (2012) Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *The journal of clinical investigation* **122**: 142-152

Mei X, Westfall TA, Zhang Q, Sheffield VC, Bassuk AG, Slusarski DC (2014) Functional characterization of Prickle2 and BBS7 identify overlapping phenotypes yet distinct mechanisms. *Developmental biology* **392**: 245-255

Menke AL, Spitsbergen JM, Wolterbeek APM, Woutersen RA (2011) Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. *Toxicologic pathology* **39**: 759-775

Mochizuki H, Choong C-J, Yasuda T (2014) The promises of stem cells: stem cell therapy for movement disorders. *Parkinsonism & related disorders* **20, Supplement 1**: S128-S131

Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN (2009) Environmental estrogens and obesity. *Molecular and cellular endocrinology* **304**: 84-89

Nottebohm F (2002) Neuronal replacement in adult brain. *Brain research bulletin* **57**: 737-749

Oka T, Nishimura Y, Zang L, Hirano M, Shimada Y, Wang Z, Umemoto N, Kuroyanagi J, Nishimura N, Tanaka T (2010) Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC physiology* **10**: 21

Okuda Y, Ogura E, Kondoh H, Kamachi Y (2010) B1 SOX coordinate cell specification with patterning and morphogenesis in the early zebrafish embryo. *PLoS genetics* **6**: e1000936

Otteson DC, Hitchcock PF (2003) Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. *Vision research* **43**: 927-936

Pan M, Han H, Zhong C, Geng Q (2012) Effects of genistein and daidzein on hippocampus neuronal cell proliferation and BDNF expression in H19-7 neural cell line. *The journal nutrition health aging* **16**: 389-394

Park HJ, Della-Fera MA, Hausman DB, Rayalam S, Ambati S, Baile CA (2009) Genistein inhibits differentiation of primary human adipocytes. *The journal of nutritional biochemistry* **20**: 140-148

Park HR, Park M, Choi J, Park K-Y, Chung HY, Lee J (2010) A high-fat diet impairs neurogenesis: Involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience letters* **482**: 235-239

Perron M, Harris WA (2000) Retinal stem cells in vertebrates. *BioEssays* **22**: 685-688

Pevny LH, Nicolis SK (2010) Sox2 roles in neural stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**: 421-424

Polenov AL, Chetverukhin VK (1993) Ultrastructural radioautographic analysis of neurogenesis in the hypothalamus of the adult frog, *Rana temporaria*, with special reference to physiological regeneration of the preoptic nucleus. II. Types of neuronal cells produced. *Cell and tissue research* **271**: 351-362

Polkowski K, Mazurek AP (2000) Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta poloniae pharmaceutica* **57**: 135-155

- Purkayastha S, Cai D (2013) Disruption of Neurogenesis by Hypothalamic Inflammation in Obesity or Aging. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* **14**: 10.1007/s11154-11013-19279-z
- Qatanani M, Lazar MA (2007) Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & development* **21**: 1443-1455
- Rakic P (2002) Neurogenesis in adult primates. *Progress in brain research* **138**: 3-14
- Rauci F, Di Fiore MM, Pinelli C, D'Aniello B, Luongo L, Polese G, Rastogi RK (2006) Proliferative activity in the frog brain: A PCNA-immunohistochemistry analysis. *Journal of chemical neuroanatomy* **32**: 127-142
- Rayalam S, Della-Fera MA, Ambati S, Yang JY, Park HJ, Baile CA (2008) Enhanced effects of 1,25(OH)(2)D(3) plus genistein on adipogenesis and apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity* **16**: 539-546
- Rex M, Church R, Tointon K, Ichihashi RMA, Mokhtar S, Uwanogho D, Sharpe PT, Scotting PJ (1998) Granule cell development in the cerebellum is punctuated by changes in Sox gene expression. *Molecular brain research* **55**: 28-34
- Santos-Carvalho A, Álvaro AR, Martins J, Ambrósio AF, Cavadas C (2014) Emerging novel roles of neuropeptide Y in the retina: From neuromodulation to neuroprotection. *Progress in neurobiology* **112**: 70-79
- Sarkar FH, Adsule S, Padhye S, Kulkarni S, Li Y (2006) The role of genistein and synthetic derivatives of isoflavone in cancer prevention and therapy. *Mini reviews in medicinal chemistry* **6**: 401-407
- Seeley RR, VanPutte CL, Regan J, Russo A (2011) *Seeley's anatomy & physiology*, 9th edn. New York, NY: McGraw-Hill.
- Segner H (2009) Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative biochemistry and physiology toxicology & pharmacology : CBP* **149**: 187-195
- Seth A, Stemple DL, Barroso I (2013) The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. *Disease models & mechanisms* **6**: 1080-1088
- Shieh YS, Chang YS, Hong JR, Chen LJ, Jou LK, Hsu CC, Her GM (2010) Increase of hepatic fat accumulation by liver specific expression of Hepatitis B virus X protein in zebrafish. *Biochimica et biophysica acta* **1801**: 721-730
- Shin JT, Fishman MC (2002) From Zebrafish to human: modular medical models. *Annual review of genomics and human genetics* **3**: 311-340
- Singletary KW, Frey RS, Li JY (2002) Differential effects of genistein on cell proliferation, cyclin B1, and p34cdc2 in transformed and nontransformed human breast cells. *Pharmaceutical biology* **40**: 35-42
- Soares J, Castro LF, Reis-Henriques MA, Monteiro NM, Santos MM (2012) Zebrafish (*Danio rerio*) life-cycle exposure to chronic low doses of ethinylestradiol modulates p53 gene transcription within the gonads, but not NER pathways. *Ecotoxicology* **21**: 1513-1522
- Sousa-Ferreira L, Almeida LPd, Cavadas C (2014) Role of hypothalamic neurogenesis in feeding regulation. *Trends in endocrinology & metabolism* **25**: 80-88

- Speedie N, Gerlai R (2008) Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural brain research* **188**: 168-177
- Sugii S, Evans RM (2011) Epigenetic codes of PPARgamma in metabolic disease. *FEBS letters* **585**: 2121-2128
- Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T (2011) Resveratrol and genistein as adenosine triphosphate-depleting agents in fat cells. *Metabolism* **60**: 720-729
- Tainaka T, Shimada Y, Kuroyanagi J, Zang L, Oka T, Nishimura Y, Nishimura N, Tanaka T (2011) Transcriptome analysis of anti-fatty liver action by Campari tomato using a zebrafish diet-induced obesity model. *Nutrition & metabolism* **8**: 88
- Tang KL, Agnew MK, Hirt MV, Sado T, Schneider LM, Freyhof J, Sulaiman Z, Swartz E, Vidhayanon C, Miya M, Saitoh K, Simons AM, Wood RM, Mayden RL (2010) Systematics of the subfamily Danioninae (Teleostei: Cypriniformes: Cyprinidae). *Molecular phylogenetics and evolution* **57**: 189-214
- Tarboush R, Chapman GB, Connaughton VP (2012) Ultrastructure of the distal retina of the adult zebrafish, *Danio rerio*. *Tissue and cell* **44**: 264-279
- Taupin P (2006) Adult neural stem cells, neurogenic niches, and cellular therapy. *Stem Cell Review* **2**: 213-219
- Thaler JP, Yi C-X, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, Nguyen HT, Fischer JD, Matsen ME, Wisse BE, Morton GJ, Horvath TL, Baskin DG, Tsch, xF, p MH, Schwartz MW (2012) Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The journal of clinical investigation* **122**: 153-162
- Tingaud-Sequeira A, Ouadah N, Babin PJ (2011) Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity. *Journal of lipid research* **52**: 1765-1772
- Toledo-Ibarra GA, Rojas-Mayorquín AE, Girón-Pérez MI (2013) Influence of the Cholinergic System on the Immune Response of Teleost Fishes: Potential Model in Biomedical Research. *Clinical and developmental immunology* **2013**: 9
- Velasco-Santamaria YM, Korsgaard B, Madsen SS, Bjerregaard P (2011) Bezafibrate, a lipid-lowering pharmaceutical, as a potential endocrine disruptor in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology* **105**: 107-118
- Wagers AJ, Weissman IL (2004) Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell* **116**: 639-648
- Wang L, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig E-M, Blunder M, Liu X, Malainer C, Blazevic T, Schwaiger S, Rollinger JM, Heiss EH, Schuster D, Kopp B, Bauer R, Stuppner H, Dirsch VM, Atanasov AG (2014) Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review. *Biochemical pharmacology* **92**: 73-89
- Wilborn C, Beckham J, Campbell B, Harvey T, Galbreath M, La Bounty P, Nassar E, Wismann J, Kreider R (2005) Obesity: prevalence, theories, medical consequences, management, and research directions. *Journal of the international society of sports nutrition* **2**: 4-31
- Wullimann MF, Rupp B, Reichert H (1996) *Neuroanatomy of Zebrafish Brain*, 1st edn. Basel: Birkhäuser Basel.
- Yamamoto N (2009) Studies on the teleost brain morphology in search of the origin of cognition. *Japanese psychological research* **51**: 154-167

- Yang XL (2004) Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Progress in neurobiology* **73**: 127-150
- Zhao H, Ho PC, Lo YH, Espejo A, Bedford MT, Hung MC, Wang SC (2012) Interaction of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) with c-Abl in cell proliferation and response to DNA damages in breast cancer. *PloS one* **7**: e29416
- Zupanc GK (2006) Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *Journal of comparative physiology A* **192**: 649-670
- Zupanc GK, Hinsch K, Gage FH (2005) Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *The Journal of comparative neurology* **488**: 290-319
- Zupanc GK, Zupanc MM (2006) New neurons for the injured brain: mechanisms of neuronal regeneration in adult teleost fish. *Regenerative medicine* **1**: 207-216