



**ISABELA MIRANDA GUIMARÃES**

**INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE FÍSICA  
VOLUNTÁRIA EM PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS NO ZEBRAFISH (*DANIO  
RERIO*)**

**LAVRAS – MG**

**2022**

**ISABELA MIRANDA GUIMARÃES**

**INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE FÍSICA  
VOLUNTÁRIA EM PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS NO ZEBRAFISH  
(*DANIO RERIO*)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado do Curso de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Orientador

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Coorientador

Prof. MSc. Moises Silvestre de Azevedo Martins

**LAVRAS – MG**

**2022**

**ISABELA MIRANDA GUIMARÃES**

**INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE FÍSICA  
VOLUNTÁRIA EM PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS NO ZEBRAFISH  
(*DANIO RERIO*)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado do Curso de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

APROVADA em 22 de abril de 2022.

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas UFLA

Prof. Msc. Moises Silvestre de Azevedo Martins UFLA

Prof. Dr. William Franco Carneiro UFLA

Dr. Luis David Solis Murgas

Orientador

Msc. Moises Silvestre de Azevedo Martins

Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2022**

*Dedico este trabalho à mulher mais especial  
da minha vida, a minha mãe Maria Regina,  
pelo exemplo de mulher forte e batalhadora.*

*Tudo o que eu sou, é graças a você.*

*Que sorte grande eu tenho!*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à Deus, por ter me concedido a oportunidade, me dado forças, acreditado em mim e ter colocado em meu caminho, pessoas tão especiais. À São Francisco de Assis, protetor dos animais, e a todos os animais submetidos a pesquisas.

À minha mãe Regina, por ser uma mãe incrível e ter acreditado tanto em mim. Por sempre me apoiar em meus sonhos sem nunca medir esforços, você é minha melhor parte! Ao meu pai Walmir, pelo exemplo de trabalho, força, e humildade proporcionado, além da confiança depositada em mim por todos esses anos de formação acadêmica.

Ao meu irmão Rodrigo, por ser meu melhor exemplo e incentivo. Você é a razão da minha vida e de todas as minhas conquistas. Te amo!

Ao meu namorado Guilherme, pela enorme parceria, por fazer dos meus sonhos, os nossos. Por toda ajuda, compreensão, carinho e amor. Estou aqui por você também. Te amo!

Ao melhor afilhado do mundo, Lucas. Minha maior felicidade é ser sua madrinha, tenho muito orgulho de você! Obrigada por cada momento feliz e único ao seu lado!

As minhas amigas de graduação, Juliana, Luma, Paula e Júlia. Vocês foram fundamentais em meus dias, deixaram a graduação mais leve, e fazem parte de todas as minhas conquistas acadêmicas, sem exceção.

As minhas amigas Ludmila e Letícia, um grande presente que a UFLA me proporcionou. Vocês são exemplos de que todas as nossas experiências de vida valem a pena. Obrigada!

A todos os familiares e amigos que me apoiaram diretamente ou indiretamente nessa caminhada e por compreenderem quando não pude estar presente. Obrigada!

Ao meu coorientador Moises Martins, por todo apoio, ajuda e paciência nesta reta final. Além de sempre se manter presente. Obrigada por ter confiado em mim!

Ao meu professor e orientador Luis Murgas, um exemplo de pessoa e profissional! Agradeço por ter estado de portas abertas todas as vezes em que precisei, por me conceder oportunidades e ajuda sem medir esforços. Sou imensamente grata pela confiança e por fazer com que a relação de aluno e orientador fosse leve. Muito obrigada!

À Universidade Federal de Lavras, por todas as oportunidades e experiências proporcionadas que sem dúvidas ajudaram na minha formação pessoal e profissional.

Sem vocês nada disso seria possível. Muito obrigada!

## RESUMO

A atividade física voluntária promove benefícios tanto na saúde física quanto mental, sendo um importante fator no tratamento de várias doenças relacionadas a alterações metabólicas. Existem vários modelos utilizados para estudar essas alterações. Dentre eles destaca-se o *Zebrafish* (*Danio rerio*), devido a sua similaridade genética com os seres humanos, seu manejo facilitado e seu baixo custo de manutenção. O estudo tem por objetivo avaliar o potencial do *Zebrafish* como um modelo para estudos da atividade física voluntária, viável, de baixo custo e que possa ser aplicado em estudos relacionados ao comportamento. Utilizou-se 40 *zebrafish*, machos, distribuídos aleatoriamente em dois grupos, atividade física voluntária (AFV) (N=20) e controle (CT) (N=20). O modelo consistia em dois tanques regulares, ligados a um sistema de recirculação de água e conectados por um tubo translúcido e uma câmera de vídeo lateral, para medir os parâmetros de atividade física dos animais. Um dos grupos foi submetido ao sistema de atividade física voluntária por uma semana. As variáveis foram peso, comprimento padrão, IMC (índice de massa corporal), parâmetros comportamentais relacionados ao teste de tanque novo, aceleração máxima, e velocidade máxima. A normalidade e homogeneidade foram analisadas respectivamente pelos testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene*. As comparações foram realizadas através do teste T de *student* ( $p < 0,05$ ) e pelo teste U de Mann-Whitney. Os resultados indicaram redução do peso final. Os animais apresentaram maior aceleração e velocidade máxima de natação e maior frequência de atividade no período de luz. Observamos melhor desempenho físico no teste de avaliação locomotora, que não foi acompanhado de aumento da ansiedade. Os demais parâmetros mantiveram-se inalterados. Portanto, pode-se concluir que o *zebrafish* respondeu positivamente a atividade física voluntária, mostrando ser um modelo promissor para estudos futuros.

Palavras-chave: Teste de tanque novo. Velocidade Máxima. Ansiedade.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 8  |
| 1.1 Objetivo geral .....                                     | 9  |
| 1.2 Objetivos específicos.....                               | 9  |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO.....                                  | 10 |
| 2.1 Diferença entre atividade física e exercício físico..... | 10 |
| 2.2 Atividade Física Voluntária.....                         | 12 |
| 2.3 Zebrafish.....   | 13 |
| 2.4 Exercício e Zebrafish.....                               | 14 |
| 2.5 Zebrafish como modelo de comportamento .....             | 17 |
| 3. METODOLOGIA .....   | 20 |
| 3.1 Apreciação Ética.....                                    | 20 |
| 3.2 Animais Experimentais .....                              | 20 |
| 3.3 Sistema de Atividade Física Voluntária .....             | 21 |
| 3.4 Parâmetros biométricos .....                             | 22 |
| 3.5 Locomoção em um tanque regular .....                     | 22 |
| 3.6 Teste de Tanque Novo.....                                | 22 |
| 3.7 Análise Estatística .....                                | 23 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                              | 23 |
| 5. CONCLUSÃO.....  | 27 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                          | 28 |

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, têm-se aumentado consideravelmente o uso do zebrafish (*Danio rerio*) como um modelo animal em estudos como genética, biologia do desenvolvimento, doenças humanas e ecotoxicologia (BROWN et al., 2017; FAZIO et al., 2020; FREIFELD et al., 2017; FUKUSHIMA et al., 2020; KAWAKAMI et al., 2016; AUDIRA, 2018). O zebrafish, é um teleósteo de água doce originário do sudoeste da Ásia. Refere-se a um peixe de pequeno porte, adulto mede cerca de 3-4 cm. Em relação aos roedores possui baixo custo de manutenção diária e manejo facilitado por ser facilmente adaptável em cativeiro. É encontrado principalmente em cardumes. As fêmeas possuem alta taxa de produção de ovos, o que permite um número de maior de animais nos estudos (GOLDSMITH, 2003; KHAN, et al., 2017; RIBAS; PIFERRER, 2014).

O zebrafish, é uma espécie de peixe que vem sendo muito utilizada em experimentos devido a sua similaridade genética com os seres humanos (SILVEIRA, 2012). Por ser fisiologicamente homólogo aos humanos, ele permite aos pesquisadores compreender vias e mecanismos relevantes para a patogênese humana e tratamentos clínicos (SZYMAŃSKA, 2009). Assim, as avaliações farmacológicas e análises comportamentais, podem ser realizadas com um método simples econômico e robusto. (GOLDSMITH 2003; AIRHART, 2007; MCGRATH, 2008). A relação entre o desenvolvimento humano e do zebrafish, propõe também uma continuação ou permanência dos comportamentos, o que fundamenta o uso do peixe como modelo para estudos comportamentais e de saúde.

Na atualidade, tem-se conhecimento sobre os benefícios da prática de atividade física tanto na saúde física quanto mental da população (O'DELL et al., 2012). A atividade física voluntária pode ser definida como uma atividade que não é intimamente necessária para sobrevivência ou para a manutenção da homeostase e que não sofre influência de fatores externos (MARTINS, 2020). Estudos apontam que a atividade física voluntária possui influência sobre algumas medidas biométricas, como peso e índice de massa corporal (IMC) (WALKER; MASON, 2018; BASTERFIELD; LUMLEY; MATHERS, 2009).

Já é de amplo conhecimento da sociedade os benefícios que a atividade física promovem na saúde humana (BAUER et al., 2014; BOOTH et al., 2012, 2008;

GARCIA et al., 2014; GOEDECKE; MICKLESFIELD, 2014; KNIGHT, 2012; WARD, 2014), porém, dada a necessidade de avaliar o desempenho físico e os efeitos do exercício nas doenças, tem sido necessário desenvolver modelos de treinamento aeróbico (HASUMURA; MEGURO, 2016; PALSTRA et al., 2010) e físico (SIMMONDS et al., 2019).

Conforme abordado anteriormente, o uso do zebrafish como modelo de estudo para pesquisas experimentais tem sido bastante explorado. No entanto, um modelo de atividade física voluntária (AFV) para o zebrafish ainda não foi descrito, embora tal modelo já esteja difundido em roedores (BARDI et al., 2019; BUNIAM et al., 2019; FRAGOSO et al., 2017; IDORN; PER THOR STRATEN, 1985; PARK et al., 2017).

A utilização do zebrafish como modelo de AFV permitiria, além de todos os potenciais resultados já citados, o estudo de fármacos que estimulem a atividade física voluntária e seus possíveis impactos em doenças metabólicas.

### **1.1 Objetivo geral**

O estudo tem como objetivo avaliar o potencial do zebrafish como um modelo para estudos da atividade física voluntária, viável, de baixo custo e que possa ser aplicado em estudos relacionados ao comportamento.

### **1.2 Objetivos específicos**

- I. Criar um modelo de atividade física voluntária;
- II. Comparar os parâmetros biométricos;
- III. Comparar o comportamento de zebrafish submetidos ao sistema de atividade física voluntária com o controle;
- IV. Avaliar o desempenho físico de zebrafish submetidos ao sistema de atividade física voluntária com o controle.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Diferença entre atividade física e exercício físico

As mudanças profundas das normas e valores sociais gerais nos últimos anos têm também gerado alterações nos padrões e funções individuais e sociais do esporte e da atividade física (BENTO, 1991). Atualmente, a prática de atividade física, tem sido cada vez mais difundida na população. Desta forma é necessário o avanço científico na área possibilitando resultados adequados e que contribuam com a saúde e bem-estar do ser humano.

Um dos principais riscos para o desenvolvimento de patologias crônicas, é um estilo de vida sedentário. (HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2008). Sabe-se que a falta de exercício físico pode favorecer o desenvolvimento de obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes do tipo II, entre outras condições crônicas (PAFFENBARGER; HYDE et al., 1993). A falta de exercício físico também tem sido relacionada com disfunções no sistema autoimune, doenças pulmonares e desordens musculoesqueléticas, assim como alguns tipos de câncer e alterações neurológicas, como ansiedade e depressão (BLUMENTHAL; WILLIAMS et al., 1982).

Sendo assim, a prática de atividade física vem recebendo muita atenção, principalmente para o desenvolvimento dos componentes de aptidão física relacionados com a saúde, como a eficiência cardiorrespiratória, força, resistência muscular, flexibilidade e composição corporal. Existem outras vantagens descritas, como a melhora na estabilidade articular, aumento da massa óssea, aumento das concentrações plasmáticas de colesterol HDL, diminuição da frequência cardíaca de repouso, diminuição do risco de arteriosclerose, acidente vascular cerebral, diminuição do estresse psicológico, entre outros (PATE, 1995).

Encontra-se também na literatura evidências que indicam que o exercício pode servir como um tratamento tão eficaz como a psicoterapia e até mais eficiente que outras intervenções comportamentais para o tratamento de desordens do humor (NORTH; MCCULLAGH et al., 1990; CRAFT; LANDERS, 1998; BLUMENTHAL; BABYAK et al., 1999; HOFFMAN et al., 2011).

Muito se estuda e comprova a respeito dos efeitos e benefícios do exercício regular e controlado, sobre a saúde do ser humano (BLUMENTHAL et al., 1988;

CREWS; LANDERS, 1987; SINYOUR; SCHWARTS; PERONNET; BRISSON; SERAGANIAN, 1983). A redução dos níveis de ansiedade, estresse e depressão; melhoras no humor; aumento do bem estar físico e psicológico; melhor funcionamento orgânico geral; maior rendimento no trabalho; disposição física e mental aumentada e outros, são apontados como resultados benéficos da prática correta e programada de exercícios físicos (BERGER; MACINMAN, 1993). Assim, a relação da atividade física e exercícios físicos com a saúde humana, está atualmente bem estabelecida, e se desenvolve sobre os conceitos das pesquisas na área da medicina do esporte.

Ao pensar em uma vida fisicamente ativa, os termos que vem em mente são: atividade física e exercício físico. Dessa forma, é importante evidenciar e discernir os conceitos de Atividade Física e Exercício Físico. O termo Atividade física, pode ser definido como qualquer movimento corporal, produzido pelos músculos esqueléticos, que resulta em gasto energético maior do que os níveis de repouso. Já o Exercício físico, um dos seus principais componentes é a atividade física planejada, estruturada, repetitiva e intencional (MCAEDLE et al., 2009) e que tem como objetivo final ou intermediário a melhora das capacidades físicas tais como resistência, força e flexibilidade (CASPERSEN, 1985). É também definido por gerar trabalho muscular e quantificado por variáveis tais como força, trabalho, potência ou velocidade de progressão, indicadores amplamente utilizados em treinamentos físicos (FOSS; KETEVAN, 2000).

Além disso, o exercício físico leva o indivíduo a uma maior participação social, resultando em um bom nível de bem-estar biopsicofísico, fatores esses que contribuem para a melhoria de sua qualidade de vida (BROGAN, 1981; CARDOSO, 1992).

As pesquisas envolvendo os impactos do exercício na saúde e comportamento demandam muitas vezes modelos animais que possam ser explorados. Recentemente, o zebrafish tem despontado como uma ótima opção para este tipo de pesquisa, por ser uma espécie com similaridade genética ao ser humano (HOWE et al., 2013) além de dispor de várias características que contribuem para a utilidade do modelo.

## 2.2 Atividade Física Voluntária

A atividade física voluntária pode ser definida como uma atividade que não é intimamente necessária para sobrevivência ou para a manutenção da homeostase e que não sofre influência de fatores externos (MARTINS, 2020). Para experimentos científicos, uma das formas de aferir a atividade física é utilizando roedores e rodas de corrida. As rodas de corrida são mecanismos que quantificam a quantidade de atividade física voluntária que o animal realiza. A maioria destes animais facilmente correm com facilidade nas rodas (SHERWIN, 1998) e por esse motivo a roda de corrida é frequentemente usada para quantificar os níveis de atividade física geral ou então para modular os efeitos do exercício físico (PATTERSON; LEVIN, 2008; HASKELL-LUEVANO et al., 2009).

Em roedores, a corrida voluntária proporciona melhoras em algumas deficiências neurológicas e facilita a recuperação funcional pela redução da perda neuronal (CARRO et al., 2001). Estudos como de Cunha et al., (2013), Duman et al., (2008) e Aguiar et al., (2014), mostraram que a atividade física voluntária em roda de corrida produz efeitos antidepressivos. Dessa forma, a atividade física está associada com a diminuição do risco de prejuízos cognitivos, melhora do aprendizado e da memória através da melhora da função do hipocampo, estabilização do humor e facilitação da recuperação de funções neurológicas (COTMAN; BERCHTOLD, 2002; TILLERSON et al., 2003; VAN PRAAG, 2009).

Muitos estudos têm relatado também algumas alterações no comportamento de ratos e camundongos quando submetidos às rodas de corrida. Frequentemente essas mudanças são atribuídas ao exercício e muitos desses efeitos dependem da duração da exposição à roda de corrida. Oito semanas de corrida voluntária na roda aumentam as medidas de comportamento defensivo e as avaliações de risco em ratos (BURGHARDT et al., 2004).

Além disto, a prática da AFV, abrange uma relação com a população e com o espaço em que as pessoas estão inseridas. Isto é, a AFV se encontra em práticas cotidianas, como deslocamento para o trabalho, lazer e tarefas domésticas. Cheik (2003) relata que resultados disponíveis sugerem de maneira geral, que a prática da atividade física regular contribui com a saúde, na manutenção de um estilo de vida independente, no aumento da capacidade funcional e na melhora da qualidade de

vida. Dessa maneira, a atividade física deve ser mantida regularmente durante toda a vida para que o indivíduo possa desfrutar de melhorias na qualidade de vida e aumento na longevidade (CARDOSO 1995; FRIES 1981; MARIN 1995; McARDLE 1992).

Conforme pode ser notado, apesar de existirem diversos estudos que consideram a AFV e o exercício físico, grande número dos trabalhos são realizados tendo como base modelos de roedores. Entretanto, existem outros modelos que também possuem similaridade genética com os seres humanos e que podem ser mais explorados, como por exemplo o zebrafish.

### **2.3 Zebrafish**

O zebrafish (*Danio rerio*), também conhecido como peixe paulistinha no Brasil, é um teleósteo de água doce da família Cyprinidae. O nome científico *Danio* origina-se da língua bangla e “dhani”, que significa “do campo de arroz”, dado que o zebrafish é geralmente encontrado em colunas de água em locais onde se pratica o cultivo de arroz (ARUNACHALAM et al., 2013). É um animal vertebrado aquático de pequeno porte, que chega a fase adulta com 90 dias, possui cerca de 3-4 cm de comprimento é caracterizado pela alternância fenotípica de listras claras e escuras, além do dimorfismo sexual acentuado. As fêmeas produzem cerca de 200 ovos/desova, advindos de fecundação externa, o que caracteriza uma alta taxa de produção. Os embriões são translúcidos, com desenvolvimento rápido facilitando o acompanhando do crescimento com facilidade (KHAN et al., 2017; NOWIK et al., 2015; SIEBEL; BONAN; SILVA, 2015).

Uma comparação do genoma do zebrafish (HOWE et al., 2013) com um genoma de referência humano, relevou que 70% dos genes humanos, tinham pelo menos um ortólogo de zebrafish. Além disto, 84% deles se associam a doenças humanas de maneira semelhante. Ainda, encontra-se uma extensa literatura sobre experimentos com esse modelo (CHAKRABORTY et al., 2016). No Brasil, a prática adotada pelos pesquisadores em utilizar o zebrafish como modelo animal nos experimentos se reflete no número expressivo de trabalhos publicados, principalmente desde a década de 90 (GHENO et al., 2016).

Por esse motivo, considerando todas as características mencionadas acerca

do zebrafish no contexto da pesquisa científica, ele se torna um modelo promissor e alternativo para o presente estudo e nas mais diversas áreas como: fisiologia, genética, toxicologia, câncer, células-tronco, reprodução, síndromes metabólicas, doenças, regeneração, entre outras.

#### **2.4 Exercício e Zebrafish**

É de conhecimento da população, que o exercício físico pode regular e contribuir para a melhora da saúde. No entanto, fisiologicamente ele também representa um estresse para o organismo, onde gera um desvio do estado homeostático, levando a reorganização da resposta de diversos sistemas (SOARES, 2014). Dessa forma, o exercício traz benefícios fisiológicos e psicológicos em outros vertebrados, então pode resultar em benefícios semelhantes para o zebrafish (PALSTRA; PLANAS, 2012). Na última década, as pesquisas sobre o exercício físico em modelos experimentais como o zebrafish, tem sido investigada (BAGATTO et al., 2001) por isso, o zebrafish ganhou ampla atenção no campo do exercício nos últimos anos.

Proporcionar aos animais escolha e controle sobre seus ambientes tem sido reconhecido como um mecanismo para um bom bem-estar, permitindo que os animais lidem de forma mais eficaz com estressores e desafios (FIFE-COOK, 2019; SAMBROOK, 1997; MELLOR, 2019). Constatou-se que peixes submetidos ao tratamento com exercícios físicos melhoraram a capacidade de associar estímulos no teste de condicionamento (LUCHIARI; CHACON, 2013).

Estudos existentes sobre muitas espécies de peixes teleósteos mostram que a indução do exercício físico pode resultar em maiores taxas de crescimento, massa muscular esquelética, e redução das interações agressivas, juntamente com o aumento de sobrevivência. Um exemplo de exercício físico como a natação, é um fator importante na história de vida de um peixe teleósteo no ambiente aquático. Esses peixes, apresentam uma diversidade de estratégias locomotoras, especialmente pela capacidade de passar por amplas migrações alimentares e reprodutivas. Em razão disso, por mais diferentes que sejam essas estratégias, a natação mostra-se intimamente relacionada a importantes processos biológicos que ocorrem no organismo, como o desenvolvimento inicial, crescimento somático, crescimento

gonadal e maturação (PALSTRA, 2011).

O zebrafish nos últimos anos tornou-se um modelo vantajoso para observar os efeitos do exercício físico (ROVIRA, 2018) no cérebro e no comportamento e demonstrou ter efeitos benéficos na aprendizagem, (LUCIARI; CHACON, 2013), no crescimento (PALSTRA et al., 2010), envelhecimento (GILBERT; ZERULLA; TIERNEY, 2014), regeneração cardíaca (ROVIRA et al., 2018) e ansiedade (DEPASQUALE; LERI, 2018). O zebrafish, oferece diversas vantagens sobre os modelos animais de roedores, além disto, tem uma predisposição natural ao cardume, favorecendo e facilitando desta forma o uso de protocolos de exercícios em grupo (DEPASQUALE, 2018).

Apesar de a manipulação genética do zebrafish se encontrar validada e disponível, muitas vezes faltam protocolos comportamentais (CHACON, 2013). Em pesquisas neurocomportamentais, o zebrafish é um modelo animal bem estabelecido, e possui potencial para se obter novos conhecimentos sobre os efeitos do exercício físico no comportamento. Porém, pesquisas realizadas anteriormente foram limitadas, acerca da capacidade de controlar com precisão a intensidade e duração do exercício e validação de testes para mensurar diferentes aspectos de comportamentos (DEPASQUALE, 2018).

O estudo de Graham, Keyserlingk e Franks (2018) ofereceu ao zebrafish a oportunidade de explorar livremente uma área que era desconhecida em seu tanque. Para avaliar o comportamento exploratório de livre escolha, eles analisaram a latência para entrar na área até então desconhecida, o número de visitas, o número de peixes que ficaram na parte inferior desta área e os comportamentos sociais, incluindo agonísticos, afiliativos, coesão e coordenação do grupo. Os resultados foram, um aumento no comportamento afiliativo (que fortalece as relações sociais e laços afetivos), redução no comportamento agonístico (respostas defensivas, submissão, ameaças, exibições e agressão), aumento da coesão (proximidade entre indivíduos do grupo) e coordenação em grupo (alinhamento de indivíduos do grupo no mesmo plano horizontal), além de não aumentar a ansiedade.

Foi sugerido por Blaser e Rosemberg (2012), que uma combinação de teste comportamentais deve ser utilizada para observar o comportamento semelhante à ansiedade em zebrafish.

No trabalho de DePasquale (2018) os peixes foram divididos em dois grupos: Exercício e Controle. Os peixes do grupo exercitado foram desafiados

aerobicamente (velocidade máxima da água: 0,5 m/s) utilizando um túnel de natação, uma hora por dia, por cinco dias por semana, durante seis semanas. Os peixes do grupo controle passaram a mesma quantidade de tempo no túnel de natação, mas não foram desafiados aerobicamente (velocidade máxima da água: 0,05 m/s). Ao final do experimento, após seis semanas, todos os peixes foram testados individualmente em dois testes padrão de ansiedade complementares para o zebrafish. Deste modo, foram utilizados o teste de tanque novo (para medir os aspectos tigmotáticos do comportamento) e o teste claro-escuro (para medir os aspectos escototáticos do comportamento). Os peixes do grupo exercitado, exibiram comportamentos de ansiedade reduzidos no teste de tanque novo; eles passaram mais tempo no topo e foram mais rápidos nas entradas da parte superior de um novo tanque, em comparação com os peixes do grupo controle. Além disto, os peixes exercitados passaram mais tempo no compartimento claro do teste claro-escuro em comparação com os peixes controle. Isto resultou num efeito benéfico do exercício no comportamento do tipo ansiedade em zebrafish.

No estudo de Luchiari e Chacon (2013), foi testado se a atividade física poderia facilitar o processo de aprendizagem do zebrafish em uma tarefa de condicionamento associativo. Um peixe zebrafish não exercitado demonstrou resposta de aprendizagem associativa a partir do 5º dia de teste, ao mesmo tempo que peixes previamente submetidos a nadar contra a corrente de água exibiram aprendizado no 3º dia de teste. Tais resultados mostraram que a atividade física pode acelerar a resposta de aprendizagem associativa em zebrafish, apontando os benefícios do exercício para os processos cognitivos.

Pesquisas sobre os efeitos da natação no crescimento e expressão de genes marcadores de crescimento muscular em zebrafish adultos, determinaram a espécie como um modelo de exercício viável (PALSTRA et al., 2010). Na mesma linha, o trabalho de Palstra (2011), evidenciou que zebrafish adultos que foram exercitados por 20 dias em velocidades ótimas de natação demonstraram um crescimento altamente significativo induzido pelo exercício de 5,6% no comprimento corporal e 41,1% no peso corporal quando comparados aos peixes em repouso.

Todavia, o zebrafish selvagem que vive em água corrente parece exibir maiores níveis de agressão, menos coesão do grupo e mudanças de liderança mais frequentes do que zebrafish encontrado em água parada (SURIYAMPOLA, 2016; SHELTON, 2020), e isso foi replicado em laboratório com níveis mais elevados de

agressão encontrados entre os peixes em água corrente (BHAT, 2015).

O zebrafish habituado em águas de fluxo contínuo pode, portanto, levar a um comportamento mais antissocial quando comparado àqueles que são habituados em águas paradas. No entanto, pode ser possível promover um melhor bem-estar fornecendo ao zebrafish a escolha pelo exercício (STEVENS, 2021). De Pasquale et al., (2019) observaram que o zebrafish mostrou uma aversão ao tanque com compartimentos contendo água corrente, mas uma preferência por compartimentos contendo fluxo de água e estruturas (plantas e substrato) sobre um compartimento estéril ou um compartimento contendo estruturas, mas sem fluxo de água. Isso pode ocorrer porque as estruturas podem dar abrigo do fluxo e, assim, fornecer ao zebrafish a escolha de interagir, mas somente quando a interação com ele é opcional (STEVENS, 2021).

## **2.5 Zebrafish como modelo de comportamento**

É crescente a utilização de modelos animais de exercício para a simulação das condições de estresse e adaptação observadas em humanos (GONDIM; ZOPPI et al., 2007). O zebrafish, é considerado uma espécie ideal para pesquisas em base genética de síndromes comportamentais (MORETZ, 2007).

Gouveia, Maximino e Britto (2016), fizeram uma revisão de estudos comportamentais com peixes, e constataram que aproximadamente 25% dos estudos correspondiam a trabalhos que utilizaram o zebrafish como modelo experimental. As medidas comportamentais que têm sido geralmente utilizadas em modelos de ansiedade envolvendo zebrafish são: os padrões exploratórios, no qual inclui o tempo de permanência do animal em cada compartimento do tanque, seguido pelo etograma de nado, onde inclui os comportamentos de timotaxia, congelamento e nado irregular (MAXIMINO et al., 2010). Essas medidas descritas, coincidem com o registro comportamental para zebrafish proposto por Kalueff et. Al., (2012), que classificam comportamentos ansiosos como: um comportamento complexo ocorrido por ambientes/estímulos perigosos ou potencialmente perigosos, abrangendo exploração reduzida, preferência pelo fundo do tanque, timotaxia, preferência pelo escuro, *freezing* (congelamento), mudança na coloração corporal e nado irregular.

Já uma revisão realizada por Stevens (2021), explorou os efeitos que o

enriquecimento ambiental pode ter no comportamento, fisiologia e bem-estar de zebrafish em laboratório. Visto que o enriquecimento pode ajudar a promover a expressão do comportamento natural, reduzir comportamentos anormais, de estresse e promover o bem-estar positivo que, portanto, também pode ajudar a melhorar a qualidade dos dados científicos (YOUNG, 2013; POOLE, 1997). Bloomsmith et al., (1991) descreveu cinco categorias de enriquecimento: social, físico, nutricional, ocupacional e sensorial. Assim, Stevens et. al., (2021) concluiu que os enriquecimentos podem ser aplicados de várias formas e estratégias, e que são capazes de melhorar o bem-estar de zebrafish em laboratório, proporcionando vários benefícios, dentre eles: fisiológicos, aumento da neurogênese, redução do estresse e ansiedade. Além de que, o bem-estar dos animais é essencial para uma boa ciência e, portanto, para uma melhor compreensão de como fornecer melhores condições possíveis para o zebrafish em laboratório deve ser priorizado.

Como enfatizado anteriormente, o zebrafish é um animal que tem se mostrado útil em várias áreas de pesquisa do comportamento, incluindo estados afetivos relacionados ao estresse. O estresse é um comportamento descrito como reações fisiológicas que ocorre quando o organismo tem sua homeostase ameaçada. Este conjunto de reações fisiológicas foi denominado por Serban (1936) de síndrome de adaptação geral. Durante a resposta de estresse ocorre a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de corticoides na corrente sanguínea, havendo ativação do eixo pituitária-adrenal e simpático medular adrenal.

A utilização do zebrafish como modelo para pesquisas na área de neurociências e neurobiologia do comportamento vem se evidenciando ao longo dos últimos anos (SIEBEL; BONAN; SILVA, 2015). No entanto, um modelo de atividade física voluntária (AFV) para o zebrafish ainda não foi descrito, embora tal modelo já esteja difundido em roedores (BARDI et al., 2019; BUNIAM et al., 2019; FRAGOSO et al., 2017; IDORN E PER THOR STRATEN, 1985; PARK et al., 2017).

O zebrafish apresenta algumas vantagens quando comparado a outros modelos normalmente mais utilizados no meio experimental, como a drosófila e o camundongo, são elas: embriões translúcidos (fecundação externa), maior capacidade reprodutiva, curto tempo até atingir a idade adulta (60-90 dias) e baixo custo de manutenção diária (KHAN, et al., 2017). Abrange a possibilidade da sua utilização como modelo para testes de compostos, como drogas e tóxicos, em

diversos animais simultaneamente expostos diretamente na água (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; SIEBEL; BONAN; SILVA, 2015). Nessa perspectiva, um dos modelos mais utilizados no estudo da genética comportamental é o zebrafish (DA SILVA CHAVES et al., 2018; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; STEWART et al., 2015), incluindo comportamento social (SHAMS et al., 2017), medo (CHOI et al., 2018), aprendizado e memória (LEIGHTON et al., 2018), ansiedade e estresse (PANCOTTO et al., 2018), dentre outros.

É importante desenvolver métodos que registrem com precisão os fenótipos comportamentais. O teste de tanque novo, oferece uma representação maior dos parâmetros comportamentais, já que utilizando a observação manual, alguns comportamentos não se mostram tão visíveis e disponíveis. Além disso, o uso de software permite a quantificação de certos comportamentos que são altamente subjetivos (CACHAT et al., 2011).

O zebrafish é um animal constantemente ativo que se adapta rapidamente a novos ambientes, sendo uma excelente escolha para experimentos comportamentais. Desse modo, para se determinar os níveis de ansiedade dos animais, utiliza-se o teste de tanque novo, por ser um teste bem estabelecido que fornece aos pesquisadores uma ferramenta importante no estudo do comportamento de ansiedade e estresse no zebrafish (CACHAT et al., 2011). Através do teste de tanque novo são realizadas medições assistidas por vídeo, que fornecem informações rápidas, precisas e consistentes da locomoção do zebrafish e do comportamento relacionado à ansiedade.

No Quadro 1 é apresentado de forma consolidada os parâmetros comportamentais e suas respectivas definições e interpretações segundo o teste de tanque novo.

Quadro 1: Resumo dos parâmetros comportamentais, e sua definição de acordo com o teste de tanque novo.

| Parâmetro  | Definição  | Interpretação   |
|--|--|---|
| Tempo gasto em cima (topo) (s)                     | Tempo total gasto na parte superior do tanque novo.          | Duração mais longa no topo do tanque, indica níveis mais baixos de ansiedade.         |
| Distância percorrida na parte superior (topo) (cm) | Distância total percorrida na parte superior do tanque novo. | Distância maior percorrida no topo do tanque, indica níveis mais baixos de ansiedade. |

|  |  |  |
|--|--|--|
| Frequência das entradas do meio para cima (topo) | Número de entradas do meio para o topo.  | Números de entradas mais altos, indicam níveis mais baixos de ansiedade.                             |
| Duração(ões) do congelamento                     | Imobilidade total (>1s), exceto dos olhos e guelras. Duração total do período de congelamento. | Indica aumento da ansiedade. A duração do congelamento, geralmente é maior em zebrafish estressados. |

Fonte: Cachat et al., (2011), Audira (2018)

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Apreciação Ética

O presente trabalho foi realizado no Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (Lavras, Minas Gerais, Brasil), com métodos e procedimentos experimentais submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Lavras, sob o protocolo nº 042/2019.

#### 3.2 Animais Experimentais

Utilizou-se 40 zebrafish adultos machos e saudáveis, com idade de 12 meses, peso médio de  $0,562 \pm 0,135$  g, mantidos sob fotoperíodo de 14 h de luz: 10 h de escuro. Foram monitorados todos os dias, e mantidos dentro das faixas recomendadas para a espécie os parâmetros de qualidade da água, sendo a temperatura (28°C), pH 8.0 e concentração de amônia total 0.03 mg/L. Os peixes foram alimentados com ração comercial (Proteína bruta 45%, ALCON, Brasil) 3 vezes ao dia, até a saciedade aparente. Para a formação dos grupos experimentais, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, atividade física voluntária (AFV) (n = 20) e controle (CT) (n = 20).

### 3.3 Sistema de Atividade Física Voluntária

Os peixes foram submetidos a um sistema de atividade física voluntária que foi adaptado de McDonald et. al., (2007). O sistema utilizado nesse trabalho consistia em dois tanques translúcidos (22,5 cm de altura x 33 cm de comprimento x 23 cm de largura) conectados por um tubo plástico translúcido (60 cm de comprimento x 5 cm) centralizado a 8 cm do fundo dos tanques. Este tubo de conexão foi ajustado na mesma altura para que nenhuma corrente fosse produzida dentro do tubo. A área da seção transversal do tubo era grande o suficiente para permitir que os animais se movessem de um tanque para o outro. A representação visual do modelo pode ser verificada na Figura 1. O objetivo do modelo, foi determinar a quantidade de AFV utilizando equipamento de vídeo monitoramento. Desse modo, foi quantificado o número máximo de animais por hora nos tanques dos dois grupos.

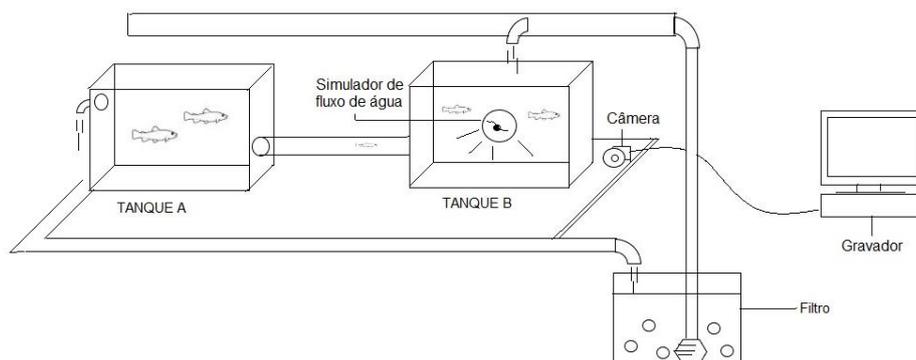


Figura 1: Sistema AFV adaptado de McDonald et al., (2007). O tanque A não possui mecanismo gerador de fluxo de água, enquanto que o tanque B possui mecanismo gerador de fluxo de água.

Fonte: Adaptado de McDonald et al., (2007).

Cinco dias antes do início do experimento, o simulador de fluxo de água se manteve desligado para que os animais do grupo AFV fossem aclimatados ao sistema. No dia de início do experimento, todos os animais foram alocados no tanque A, onde não havia mecanismo gerador de fluxo de água. Posteriormente, o simulador de fluxo de água do tanque B foi conectado ao sistema onde estavam localizados os animais do grupo AFV. Dessa maneira, os peixes que optaram pela AFV passaram

pelo tubo para chegar ao tanque B. A vazão de água no tanque B foi gerada com uma bomba (vazão 2500 L/h). O fluxo de água foi restrito a este tanque, pois não havia fluxo de água no tubo ou no tanque A. Através do sistema de monitoramento infravermelho de alta definição (Giga Security, Brasil) foi possível registrar a hora do dia em que o peixe preferia realizar atividade física.

Já os animais do grupo CT foram alocados em um sistema com as mesmas características, tanto no tanque A como no tanque B, porém não havia fluxo de água em nenhum dos dois tanques, o que permaneceu durante todo o experimento.

### **3.4 Parâmetros biométricos**

As variáveis analisadas foram peso, medido através de uma balança analítica (Shimadzu, Japão, acurácia 0,0001g (0,1mg)). Comprimento padrão, medido através de um paquímetro analógico (Starrett, Athol, Massachussetts, EUA) da ponta do focinho até a base da nadadeira caudal. Índice de massa corporal, medido através da fórmula: peso dividido pelo comprimento padrão ao quadrado.

### **3.5 Locomoção em um tanque regular**

Para o teste de locomoção em um tanque regular, foram utilizados diferentes peixes com as mesmas características. Dessa forma, os peixes foram colocados em um tanque retangular (27,5 cm 14 cm 10,5 cm, comprimento altura largura) com 2 L de água do sistema. A locomoção dos peixes foi gravada em vídeo por 6 min e a Velocidade Máxima (cm/s), Aceleração Máxima e (cm/s), foram analisadas automaticamente pelo software EthoVision XT® (Noldus, Leesburg, VA, USA).

### **3.6 Teste de Tanque Novo**

Ao final do período experimental, foi realizado o teste de tanque novo com todos os animais, conforme protocolo de Cachat et al., (2011).

Os parâmetros utilizados nesse trabalho foram: tempo gasto em cima (coluna de água superior) (s), distância percorrida no topo (cm), frequência de entradas do

meio para cima, duração do congelamento ou imobilidade (s) e foram analisadas usando o software EthoVision XT® (Noldus, Leesburg, VA, USA).

### **3.7 Análise Estatística**

Os dados são apresentados por meio de estatística descritiva (média, mediana e desvio padrão). A normalidade e homogeneidade das variâncias foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. As comparações estatísticas foram realizadas pelo teste t de Student e pelo teste U de Mann-Whitney. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo (Prism 7,04, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na figura 2A pode-se perceber que o grupo exposto ao sistema de AFV obteve redução no peso final (0,0021), porém as figuras 2B e 2C mostram que as variáveis comprimento padrão (0,0811) e IMC (0,2589) não obtiveram diferenças. Resultados semelhantes foram encontrados em roedores, submetidos a corrida voluntária em roda por 13 semanas que foi iniciada precocemente, logo após o desmame, e promoveu redução de peso corporal, gordura total, leptina e insulina plasmática em relação aos sedentários (PATTERSON et al., 2008).

Diversas comorbidades estão associadas ao excesso de peso (FARIAS, 2012), e conforme demonstrado nesse estudo, a prática de atividade física voluntária contribui significativamente para essa redução. Neste sentido, esta diminuição está associada a redução de fatores de risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares (REZENDE, 2006; CASTRO, 2006). Por isso, é importante desenvolver novos modelos envolvendo esta espécie, bem como compreender as suas respostas a novos métodos. Até o momento, este é o primeiro estudo a propor um modelo de AFV específico para o zebrafish.

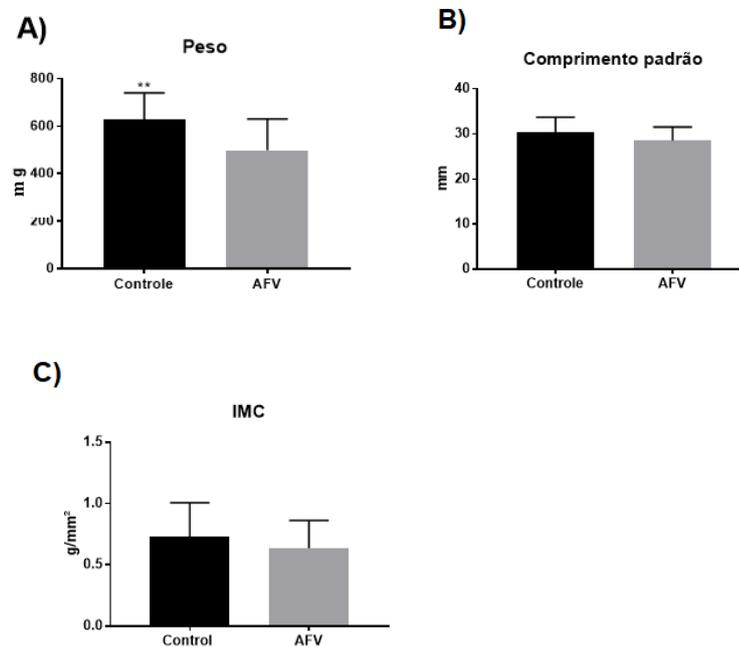


Figura 2: Grupo controle; Grupo de atividade física voluntária. Figura 2A: Gráfico do peso final dos grupos controle e AFV ( $p=0,0021^{**}$ ). Figura 2B: Gráfico do comprimento padrão final dos grupos controle e AFV. Figura 2C: Gráfico do IMC final dos grupos controle e AFV. Fonte: da autora (2022).

De acordo com (LAWRENCE, 2007) o zebrafish tem predisposição a preferir água parada ou lenta. Tal comportamento também foi encontrado nesse trabalho onde conforme a figura 3A os resultados indicaram que o zebrafish tendia a permanecer no tanque sem fluxo de água. No entanto, esse comportamento difere do que foi verificado por Palstra et. al., (2010) que sugeriu que o zebrafish teria preferência pela atividade física voluntária por ela ser altamente recompensadora, assim como visto por Sherwin (1998) ao analisar roedores.

Outro resultado aponta que, no período de luz, foi quando os peixes tiveram maior tempo e permanência no tanque com maior fluxo de água (Fig 3B). Este comportamento reflete o que foi exposto por Elbaz et al., (2013) que verificou uma maior atividade do zebrafish durante o dia.

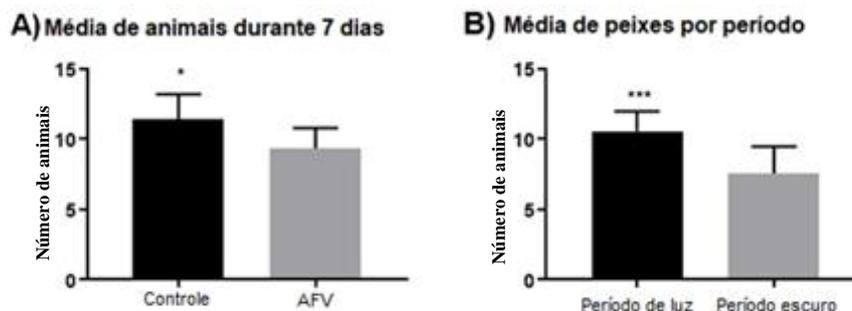


Figura 3: Grupo controle; Grupo de atividade física voluntária; Período de Luz; Período Escuro. Figura 3A: Preferência por atividade física voluntária ao longo do tempo ( $p=0,0359^*$ ). Figura 3B: Preferência por atividade física voluntária durante todo o fotoperíodo ( $p=0,0005^{***}$ ).  
Fonte: da autora (2022).

Por meio do teste de locomoção em um tanque regular, verificou-se que os animais do grupo AFV, apresentaram maior aceleração e velocidade máxima de natação (Figuras 4A e 4B). O protocolo de locomoção em água parada, adaptado por Blazina et al., (2013) consiste em um teste importante por avaliar o desempenho motor e outros parâmetros comportamentais no zebrafish, como deficiências motoras sutis induzidas por tratamentos medicamentosos e possivelmente manipulações genéticas. Gilbert et al., (2013), encontrou resultados parecidos usando o método de velocidade crítica, onde avaliou-se o efeito do exercício intermitente no desempenho do zebrafish, no qual foi observado que os peixes jovens e de meia idade melhoraram a resistência máxima e as velocidades de natação de sprint.

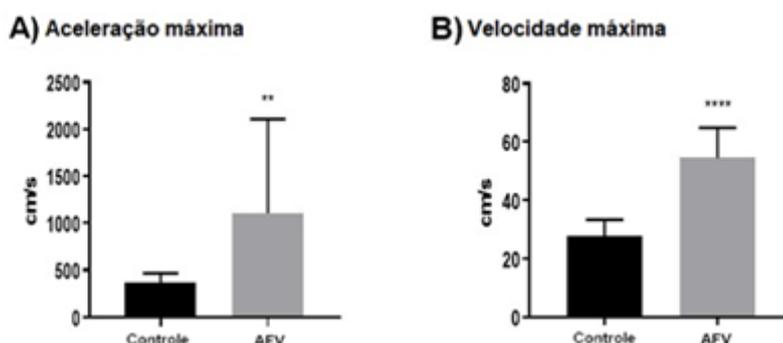


Figura 4: Grupo controle; Grupo de atividade física voluntária. Figura 4A: Comparação de aceleração máxima ( $p=0,0095^{**}$ ). Figura 4B: Comparação de velocidade máxima ( $p<0,0001^{****}$ ).  
Fonte: da autora (2022).

Com o método de velocidade crítica, McDonald et. al., (2007) avaliaram o desempenho da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) após os animais terem passado pelo sistema de AFV. Eles evidenciaram melhoras no desempenho do sprint e no limiar de fadiga. Diante disso, os resultados obtidos podem estar associados à melhora da capacidade aeróbica, causando aumento da densidade mitocondrial e vascular, aumento da ventilação e volume de ejeção de sangue e melhor recrutamento de fibras musculares oxidativas (DETRAINING, 2000; PELSTER et al., 2003; ROVIRA et al., 2017) .

Neste trabalho, não foram observadas diferenças significativas nas variáveis relacionadas ao comportamento de ansiedade entre os grupos (Figuras 5 e 6). O teste de tanque novo, se torna fundamental para fornecer análises objetivas de características e particularidades comportamentais. Trata-se de um teste padronizado e de medição precisa que auxilia no desenvolvimento de pesquisa para o entendimento de diversos parâmetros relacionados ao zebrafish. Na análise da ansiedade, um bom indicador a ser considerado é o comportamento exploratório dos peixes, que pode ser medido pelo tempo gasto na parte superior do tanque. Trabalhos anteriores conduzidos por Pagnussat et al., revelaram que quando grupos de zebrafish foram colocados em um tanque novo, suas funções cooperativas como grupo foram mantidas, ainda que o ambiente tenha se tornado o principal fator de estresse.

Entende-se então que o zebrafish, quando em grupo, tende a ficar mais tempo na parte superior do tanque. Além disso, experimentos realizados com peixes isolados, mostraram maior estresse dos animais quando comparados com grupos de peixes ao serem expostos a um tanque novo (PAGNUSSAT, 2013).

Ao estudar a ansiedade, os parâmetros fisiológicos, como os níveis de hormônio do estresse, também podem ser adições valiosas ao paralelo com as observações comportamentais (BLASER, 2011). Diante disso, novos trabalhos também podem considerar as respostas ao estresse que são divididas em três categorias (BARTON; IWAMA, 1991; WEDEMEYER et al., 1990) e, igualmente, os parâmetros bioquímicos e análises histológicas.

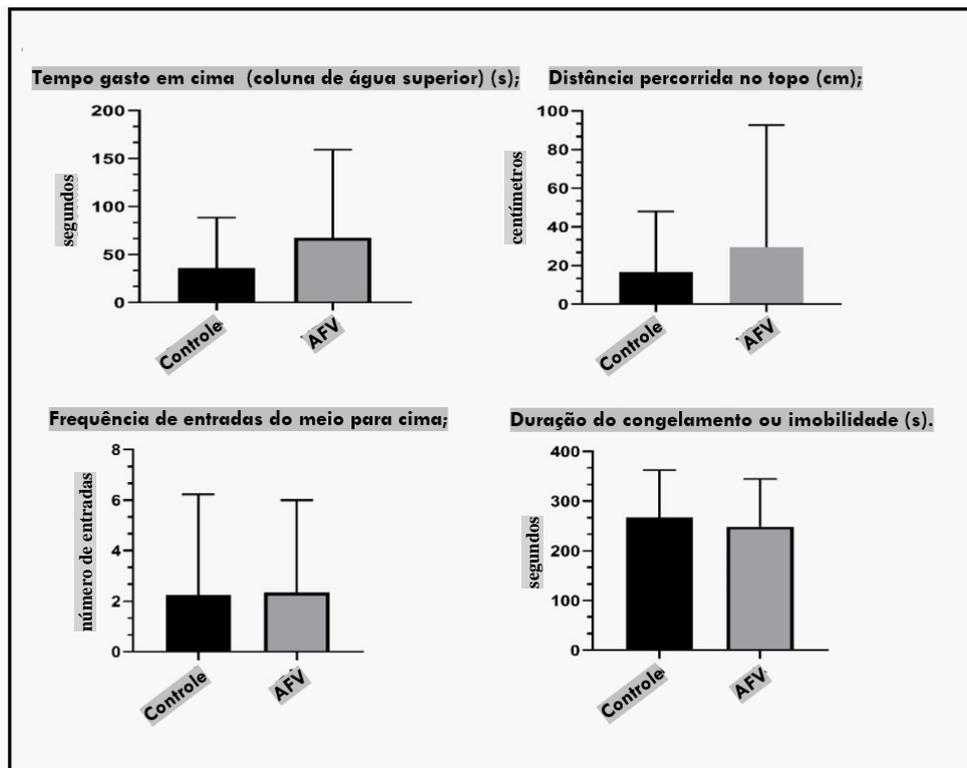


Figura 5: Resultados da análise de parâmetros comportamentais, contemplando: (i) Tempo gasto em cima (coluna de água superior); (ii) distância percorrida no topo (cm); (iii) Frequência de entradas do meio para cima; e (iv) duração do congelamento ou imobilidade (s).

Fonte: da autora (2022).

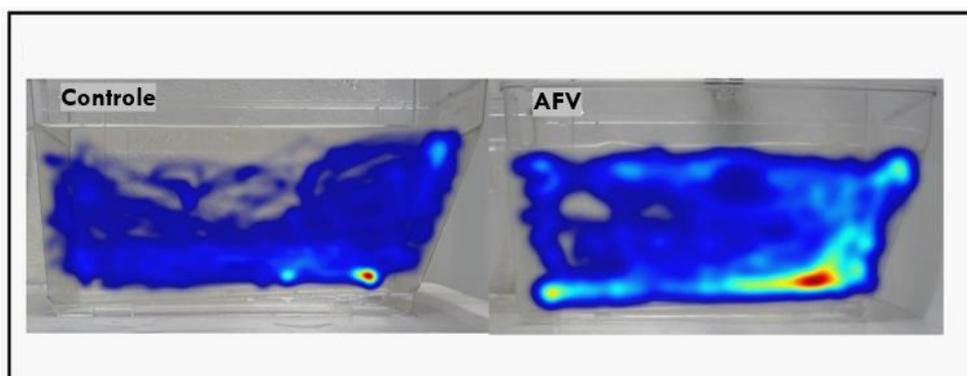


Figura 6: Representação da quantidade de natação do animal no aquário.

Fonte: da autora (2022).

## 5. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o zebrafish (*Danio rerio*) respondeu positivamente a atividade física voluntária demonstrando ser um modelo favorável para novos

estudos. Para uma melhor abordagem de quais fatores levaram a essa melhora, estudos futuros devem também levar em consideração parâmetros bioquímicos e histológicos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, Aderbal S. et al., Six weeks of voluntary exercise don't protect C57BL/6 mice against neurotoxicity of MPTP and MPP+. **Neurotoxicity research**, v. 25, n. 2, p. 147-152, 2014.

AIRHART, Mark J. et al., Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). **Neurotoxicology and teratology**, v. 29, n. 6, p. 652-664, 2007.

ARUNACHALAM, M. et al., Natural History of Zebrafish (*Danio rerio*) in India. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2013.

AUDIRA, Gilbert et al., A versatile setup for measuring multiple behavior endpoints in zebrafish. **Inventions**, v. 3, n. 4, p. 75, 2018.

BAGATTO, B.; PELSTER, B.; BURGGREN, W. W. Growth and metabolism of larval zebrafish: effects of swim training. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 24, p. 4335-4343, 2001.

BARDI, Eleonora et al., Voluntary physical activity counteracts Chronic Heart Failure progression affecting both cardiac function and skeletal muscle in the transgenic Tgαq\* 44 mouse model. **Physiological Reports**, v. 7, n. 13, p. e14161, 2019.

BARTON, Bruce A.; IWAMA, George K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of fish diseases**, v. 1, p. 3-26, 1991.

BASTERFIELD, Laura; LUMLEY, Laura K.; MATHERS, John C. Wheel running in female C57BL/6J mice: impact of oestrus and dietary fat and effects on sleep and body mass. **International journal of obesity**, v. 33, n. 2, p. 212-218, 2009.

BAUER, Ursula E. et al., Prevention of chronic disease in the 21st century: elimination of the leading preventable causes of premature death and disability in the USA. **The Lancet**, v. 384, n. 9937, p. 45-52, 2014.

BENTO, J.O. Novas motivações para a prática desportiva. IN: **O desporto no século XXI: os novos desafios**. Lisboa: Edição Câmara Municipal de Oeiras, 1991.

BERGER, B. & MACINMAM, A. Exercise and the quality of life. In: SINGER, R et al., **Handbook of Research on Sport Psychology**. 1º ed. New York: Macmillan Publishing Company. 1993, cap 34, p.729-760.

BHAT, Anuradha; GREULICH, Melissa M.; MARTINS, Emília P. Behavioral plasticity in response to environmental manipulation among zebrafish (*Danio rerio*)

populations. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0125097, 2015.

BLASER, R. E.; PENALOSA, Y. M. Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light/dark preference test. **Physiology & behavior**, v. 104, n. 5, p. 831-837, 2011.

BLASER, Rachel E.; ROSEMBERG, Denis B. Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): dissociation of black/white preference and novel tank test. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36931, 2012.

BLAZINA, Ana R.; VIANNA, Mônica R.; LARA, Diogo R. The spinning task: a new protocol to easily assess motor coordination and resistance in zebrafish. **Zebrafish**, v. 10, n. 4, p. 480-485, 2013.

BLOOMSMITH, Mollie A.; BRENT, Linda Y.; SCHAPIRO, Steven J. Guidelines for Developing and Managing an Environmental Enrichment Program. **Lab. Anim. Sci**, v. 41, p. 372-377, 1991.

BLUMENTHAL, J. A., M. A. Babyak, et al., Effects of exercise training on older patients with major depression. **Arch Intern Med**, v.159, n.19, Oct 25, p.2349-56. 1999.

BLUMENTHAL, J. A., R. S. Williams, et al., Psychological changes accompany aerobic exercise in healthy middle-aged adults. **Psychosom Med**, v.44, n.6, Dec, p.529-36. 1982.

BLUMENTHAL, J.A., et al., Exercise training in healthy Type A Middle-aged men: Effects on behavioral and cardiovascular responses. **Psychosomatic Medicine**, 1988, v.50, p.418-433.

BOOTH, Frank W.; ROBERTS, Christian K.; LAYE, Matthew J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. **Comprehensive physiology**, v. 2, n. 2, p. 1143, 2012.

BROGAN D.R. Rehabilitation services needs: Physicians's perceptions and referrals. **Arch Phys Med Rehabil**. 1981; 62: 215.

BROWN, Hannah K. et al., Zebrafish xenograft models of cancer and metastasis for drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 12, n. 4, p. 379-389, 2017.

BUNIAM, Jariya et al., Estrogen and voluntary exercise attenuate cardiometabolic syndrome and hepatic steatosis in ovariectomized rats fed a high-fat high-fructose diet. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 316, n. 5, p. E908-E921, 2019.

BURGHARDT, P. R.; FULK, L. J.; HAND, G. A.; WILSON, M. A. The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. **Brain Res**, v. 1019, n. 1-2, p. 84-96, 2004.

CACHAT, Jonathan M. et al., Video-aided analysis of zebrafish locomotion and anxiety-related behavioral responses. In: **Zebrafish neurobehavioral protocols**. Humana Press, 2011. p. 1-14.

CARDOSO, Jubel Raimundo. Atividades físicas para a terceira idade. **A terceira idade**, v. 5, n. 4, p. 9-21, 1992.

CARRO, Eva et al., Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 15, p. 5678-5684, 2001.

CASPERSEN, C.J.; POWELL, K.E.; CHRISTENSON, G.M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Rep.** 1985, 100: 126-31

CASTRO, Simone Henriques de; MATO, Haroldo José de; GOMES, Marília de Brito. Parâmetros antropométricos e síndrome metabólica em diabetes tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 3, p. 450-455, 2006.

CHAKRABORTY, Chiranjib et al., Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. **Journal of nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 65, 2016.

CHEIK, Nadia Carla et al., Efeitos do exercício físico e da atividade física na depressão e ansiedade em indivíduos idosos. **Revista brasileira de ciência e movimento**, v. 11, n. 3, p. 45-52, 2003.

CHOI, J.-H. et al., Targeted knockout of a chemokine-like gene increases anxiety and fear responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 5, p. E1041–E1050, 2018.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 6, p. 295-301, 2002.

CRAFT, L. L. e D. M. Landers. The effects of exercise on clinical depression and depression resulting from mental illness: A metaregression analysis. **Journal of Sport & Exercise Psychology**, v.20, n.4, p.339-357. 1998.

CREWS, D.J. & LANDERS, D.J. A meta-analytic review of aerobic fitness and reactivity of psychosocial stressors. **Medicine Science of Sports and Exercise**, v.19 (Suppl.), 1987, p.114-120.

CUNHA, Mauricio P. et al., The antidepressant-like effect of physical activity on a voluntary running wheel. **Med Sci Sports Exerc**, v. 45, n. 5, p. 851-859, 2013.

DA SILVA CHAVES, S. N. et al., Behavioral and biochemical effects of ethanol withdrawal in zebrafish. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 169, n. April, p. 48–58, 2018.

DEPASQUALE, C.; LERI, J. The influence of exercise on anxiety-like behavior in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural processes**, v. 157, p. 638-644, 2018.

DEPASQUALE, Cairsty et al., The impact of flow and physical enrichment on preferences in zebrafish. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 215, p. 77-81, 2019.

- DETRAINING, Mujika I. Padilla S. loss of training-induced physiological and performance adaptations. Part I: short term insufficient training stimulus. **Sports Med**, v. 30, p. 79-87, 2000.
- DUMAN, Catharine H. et al., Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. **Brain research**, v. 1199, p. 148-158, 2008.
- ELBAZ, Idan et al., Circadian clocks, rhythmic synaptic plasticity and the sleep-wake cycle in zebrafish. *Frontiers in Neural Circuits*, v. 7, p. 9, 2013.
- FARIAS, Edson dos Santos et al., Excesso de peso e fatores associados em adolescentes. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 2, p. 229-236, 2012.
- FAZIO, Maurizio et al., Zebrafish patient avatars in cancer biology and precision cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 5, p. 263-273, 2020.
- FOSS, Merle L.; KETEVIAN, Steven J. **Fox: bases fisiológicas do exercício e do esporte**. Guanabara Koogan, 2000.
- FRAGOSO, Jéssica et al., Maternal voluntary physical activity attenuates delayed neurodevelopment in malnourished rats. **Experimental physiology**, v. 102, n. 11, p. 1486-1499, 2017.
- FREIFELD, Limor et al., Expansion microscopy of zebrafish for neuroscience and developmental biology studies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 50, p. E10799-E10808, 2017.
- FRIES, James F.; CRAPO, Lawrence M. **Vitality and aging: implications of the rectangular curve**. San Francisco: Wh Freeman, 1981.
- FUKUSHIMA, Hirla et al., Potenciais usos do modelo animal Zebrafish *Danio rerio* em pesquisas na Medicina Veterinária. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 18, n. 1, 2020.
- GHENO, E. M. et al., Zebrafish in Brazilian Science: Scientific Production, Impact, and Collaboration. **Zebrafish**, v. 13, n. 3, p. 217-225, 2016.
- GILBERT, Matthew JH; ZERULLA, Tanja C.; TIERNEY, Keith B. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of aging and exercise: physical ability and trainability decrease with age. **Experimental Gerontology**, v. 50, p. 106-113, 2014.
- GILBERT, Matthew JH; ZERULLA, Tanja C.; TIERNEY, Keith B. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of aging and exercise: physical ability and trainability decrease with age. **Experimental Gerontology**, v. 50, p. 106-113, 2014.
- GOEDECKE, Julia H.; MICKLESFIELD, Lisa K. The effect of exercise on obesity, body fat distribution and risk for type 2 diabetes. **Diabetes and Physical Activity**, v. 60, p. 82-93, 2014.
- GOLDSMITH, P.; HARRIS, W. A. The zebrafish as a tool for understanding the biology of visual disorders. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2003. p. 11-18.

GONDIM, Fernando José et al., Determination of the anaerobic threshold and maximal lactate steady state speed in equines using the lactate minimum speed protocol. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 3, p. 375-380, 2007.

Gouveia, A. J., Maximino, C., & Brito, T. M. (2006). Comportamento de peixes: vantagens e utilidades nas neurociências. Faculdade de ciências/UNESP. Bauru: SP.

GRAHAM, Courtney; VON KEYSERLINGK, Marina AG; FRANKS, Becca. Free-choice exploration increases affiliative behaviour in zebrafish. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 203, p. 103-110, 2018.

HANDSCHIN, C. e B. M. Spiegelman. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. *Nature*, v.454, n.7203, Jul 24, p.463-9. 2008.

HASKELL-LUEVANO, Carrie et al., Voluntary exercise prevents the obese and diabetic metabolic syndrome of the melanocortin-4 receptor knockout mouse. **The FASEB journal**, v. 23, n. 2, p. 642-655, 2009.

HASUMURA, Takahiro; MEGURO, Shinichi. Exercise quantity-dependent muscle hypertrophy in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Comparative Physiology B**, v. 186, n. 5, p. 603-614, 2016.

HOFFMAN, Benson M. et al., Exercise and pharmacotherapy in patients with major depression: one-year follow-up of the SMILE study. **Psychosomatic medicine**, v. 73, n. 2, p. 127, 2011.

HOWE, K. et al., The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.

IDORN, Manja et al., Exercise and cancer: from “healthy” to “therapeutic”? **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 66, n. 5, p. 667-671, 2017.

KALUEFF, Allan V. et al., Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70-86, 2013.

KALUEFF, Allan V.; STEWART, Adam Michael; GERLAI, Robert. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in pharmacological sciences**, v. 35, n. 2, p. 63-75, 2014.

KAWAKAMI, K. et al., Gal4 driver transgenic zebrafish: powerful tools to study developmental biology, organogenesis, and neuroscience. **Advances in genetics**, v. 95, p. 65-87, 2016.

KHAN, K. M. et al., Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 13, p. 1925–1944, 2017.

KNIGHT, Joseph A. Physical inactivity: associated diseases and disorders. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 42, n. 3, p. 320-337, 2012.

LAWRENCE, Christian. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1-4, p. 1-20, 2007.

LEIGHTON, P. L. A. et al., An ancient conserved role for prion protein in learning and memory. **Biology open**, v. 7, n. 1, 22 jan. 2018.

LUCHIARI, Ana Carolina; CHACON, Diana Marques Martins. Physical exercise improves learning in zebrafish, *Danio rerio*. **Behavioural processes**, v. 100, p. 44-47, 2013.

MARIN-NETO, J.A. et al., Atividades físicas: “remédio” cientificamente comprovado? **A Terceira Idade**. 1995; 10 (6): 34-43.

MARTINS, M. S. A. Influência da suplementação com cumarina (4-metildinafetina) e atividade física voluntária sobre o browning do tecido adiposo branco em camundongos. 2020. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.

MAXIMINO, Caio; BRITO, Thiago Marques de; GOUVEIA JR, Amauri. Construct validity of behavioral models of anxiety: where experimental psychopathology meets ecology and evolution. **Psychology & Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 117-123, 2010.

MCARDLE, W. D; KATCH, F. I; KATCH, V. L. Fisiologia do Exercício: Energia, Nutrição e Desempenho Humano. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

MCARDLE, William D.; KATCH, Frank I.; KATCH, Victor L. **Exercise physiology: nutrition, energy, and human performance**. Lippincott Williams & Wilkins, 2010.

MCDONALD, D. G.; KEELER, R. A.; MCFARLANE, W. J. The relationships among sprint performance, voluntary swimming activity, and social dominance in juvenile rainbow trout. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 80, n. 6, p. 619-634, 2007.

MCGRATH, Patricia; LI, Chun-Qi. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug discovery today**, v. 13, n. 9-10, p. 394-401, 2008.

MORETZ, Jason A.; MARTINS, Emília P.; ROBISON, Barrie D. Behavioral syndromes and the evolution of correlated behavior in zebrafish. **Behavioral ecology**, v. 18, n. 3, p. 556-562, 2007.

NORTH, T. C., P. Mccullagh, et al., Effect of exercise on depression. **Exerc Sport Sci Rev**, v.18, p.379-415. 1990.

NOWIK, N. et al., Zebrafish: An animal model for research in veterinary medicine. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 18, n. 3, p. 663–674, 2015.

O'DELL, Steven J. et al., Running wheel exercise ameliorates methamphetamine-induced damage to dopamine and serotonin terminals. **Synapse**, v. 66, n. 1, p. 71-80, 2012.

PAFFENBARGER JR, Ralph S. et al., The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. **New England journal of medicine**, v. 328, n. 8, p. 538-545, 1993.

PAGNUSSAT, Natália et al., One for all and all for one: the importance of shoaling on behavioral and stress responses in zebrafish. **Zebrafish**, v. 10, n. 3, p. 338-342, 2013.

PALSTRA, Arjan P. et al., Establishing zebrafish as a novel exercise model: swimming economy, swimming-enhanced growth and muscle growth marker gene expression. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e14483, 2010

PALSTRA, Arjan P.; PLANAS, Josep V. (Ed.). **Swimming Physiology of Fish: Towards using exercise to farm a fit fish in sustainable aquaculture**. Springer Science & Business Media, 2012.

PALSTRA, Arjan P.; PLANAS, Josep V. Fish under exercise. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 259-272, 2011.

PANCOTTO, L. et al., Anxiolytic and anti-stress effects of acute administration of acetyl-Lcarnitine in zebrafish. **PeerJ**, v. 6, p. 1–18, 2018.

PARK, Young-Min et al., Voluntary running attenuates metabolic dysfunction in ovariectomized low-fit rats. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 49, n. 2, p. 254, 2017.

PATE, Russell R. et al. Physical activity and public health: a recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. **Jama**, v. 273, n. 5, p. 402-407, 1995.

PATTERSON, C. M.; LEVIN, B. E. Role of exercise in the central regulation of energy homeostasis and in the prevention of obesity. **Neuroendocrinology**, v. 87, n. 2, p. 65-70, 2008.

PATTERSON, Christa M.; DUNN-MEYNELL, Ambrose A.; LEVIN, Barry E. Three weeks of early-onset exercise prolongs obesity resistance in DIO rats after exercise cessation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 2, p. R290-R301, 2008.

PELSTER, B. et al., Influence of swim training on cardiac activity, tissue capillarization, and mitochondrial density in muscle tissue of zebrafish larvae. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 285, n. 2, p. R339-R347, 2003.

POOLE, Trevor. Happy animals make good science. **Laboratory animals**, v. 31, n. 2, p. 116-124, 1997.

REZENDE, Fabiane Aparecida Canaan et al., Índice de massa corporal e circunferência abdominal: associação com fatores de risco cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. 728-734, 2006.

RIBAS, Laia; PIFERRER, Francesc. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. **Reviews in Aquaculture**, v. 6, n. 4, p. 209-240, 2014.

ROVIRA, Mireia; ARREY, Gerard; PLANAS, Josep V. Exercise-induced hypertrophic and oxidative signaling pathways and myokine expression in fast

muscle of adult zebrafish. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 1063, 2017.

SERBAN, George (Ed.). **Psychopathology of human adaptation**. Springer Science & Business Media, 2012.

SHAMS, S. et al., Effect of social isolation on anxiety-related behaviors, cortisol, and monoamines in adult zebrafish. **Behavioral Neuroscience**, v. 131, n. 6, p. 492–504, 2017.

SHELTON, Delia S. et al. Collective behavior in wild zebrafish. **Zebrafish**, v. 17, n. 4, p. 243-252, 2020.

SHERWIN, C. M. Voluntary wheel running: a review and novel interpretation. **Animal behaviour**, v. 56, n. 1, p. 11-27, 1998.

SIEBEL, A. M.; BONAN, C. D.; SILVA, RS da. Zebrafish como modelo para estudos comportamentais. **Resende RR, organizador. Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações. São Paulo: Blucher**, p. 15-56, 2015.

SILVEIRA, Themis Reverbel da; SCHNEIDER, Ana Claudia; HAMMES, Thais Ortiz. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4-5, 2012.

SIMMONDS, Alec IM; MILN, Clare; SEEBACHER, Frank. Zebrafish (*danio rerio*) as a model for sprint exercise training. **Zebrafish**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2019.

SINYOR, D.; SCHWARTZ, S.G.; PERONNET, F.; BRISSON, G.; SERAGANIAN, P. Aerobic fitness level and reactivity to psychosocial stress: Physiological, biomechanical, and measures. **Psychosomatic Medicine**, v.5, p.45, p.205-217, 1983.

SOARES, Alexandre Atkinson et al., EXERCÍCIO AGUDO DE BAIXA INTENSIDADE EM PEIXE ZEBRA: ESTADO OXIDATIVO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO. **13ª Mostra da Produção Universitária**, Rio Grande/RS, Brasil, 2014.

STEVENS, Chloe H.; REED, Barney T.; HAWKINS, Penny. Enrichment for laboratory zebrafish—a review of the evidence and the challenges. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 698, 2021.

SURIYAMPOLA, Piyumika S. et al., Zebrafish social behavior in the wild. **Zebrafish**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2016.

SZYMAŃSKA, Magdalena et al., The effect of antidepressant drugs on the HPA axis activity, glucocorticoid receptor level and FKBP51 concentration in prenatally stressed rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 6, p. 822-832, 2009.

TILLERSON, J. L.; CAUDLE, W. M.; REVERON, M. E.; MILLER, G. W. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 119, n. 3, p. 899-911, 2003

TOTARO GARCIA, Leandro Martin et al., Sedentary behaviors, leisure-time physical inactivity, and chronic diseases in Brazilian workers: a cross sectional

study. **Journal of physical activity & health**, v. 11, n. 8, 2014.

VAN PRAAG, H. Exercise and the brain: something to chew on. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 5, p. 283-290, 2009.

WALKER, Michael; MASON, Georgia. A comparison of two types of running wheel in terms of mouse preference, health, and welfare. **Physiology & behavior**, v. 191, p. 82-90, 2018.

WARD, Peter W. Inactivity, not gluttony, causes obesity. **BMJ**, v. 348, 2014.

WEDEMEYER, Gary; BARTON, B. B.; MCLEAY, Donald J. **Stress and acclimation**. 1990.

YOUNG, Robert J. **Environmental enrichment for captive animals**. John Wiley & Sons, 2013.