

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

Zebrafish (*Danio rerio*): futuro do modelo animal em pesquisa biomédica

Rajla Bressan Simonetti

PORTO ALEGRE

2014/1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

Zebrafish (*Danio rerio*): futuro do modelo animal em pesquisa biomédica

Autora: Rajla Bressan Simonetti

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ender Rosana Oberst

Co-orientadora: Mv. Lis Santos Marques

**Trabalho apresentado
como requisito parcial
para graduação em
Medicina Veterinária**

PORTO ALEGRE

2014/1

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e ao meu pai, por todo o apoio incansável e incondicional dado à minha educação. À minha família, minha base. Em especial, ao meu tio, primeiro mestre de Literatura, Música e Letras, que influenciou diretamente o meu gosto pelos estudos, a parte da Ciência ficou por minha conta e risco. E à minha prima, que tem o eterno papel de irmã, amiga e conselheira.

Aos mestres que influenciaram positivamente na minha formação. À minha orientadora e à minha coorientadora, pela paciência, pelos conselhos e pela extensão de conhecimentos passados.

RESUMO

O zebrafish (*Danio rerio*) atingiu alta popularidade como um modelo de pesquisa pelas suas características favoráveis baseadas em propriedades únicas, tais como alta fecundidade, pequeno tamanho, rápido desenvolvimento e curto intervalo entre gerações. Apesar da técnica de criação dessa espécie ser pouco desenvolvida em contraste com o rigor científico que é requerido, essa espécie tem grande potencial como modelo experimental, desde embriologia, pela claridade óptica dos embriões e larvas, seu desenvolvimento extracorpóreo, até estudos de distúrbios cerebrais, como depressão, mal de Parkinson e autismo, pela alta similaridade do sistema nervoso do zebrafish e do humano. Esse trabalho discorre sobre a importância desse novo modelo experimental; a biologia dessa espécie; as áreas em que o zebrafish é usado em pesquisa biomédica, desde suas vantagens até suas desvantagens; sobre a bioética envolvida em pesquisas que utilizam modelos animais, em especial, o modelo *Danio rerio*. E ao final, as conclusões sobre esse modelo animal em pesquisa biomédica.

Palavras-chave: zebrafish, experimentação animal, pesquisa biomédica.

ABSTRACT

The zebrafish (*Danio rerio*) has achieved high popularity as a model organism of favorable characteristics founded on a unique set of properties as high fecundity, small size, rapid development and rapid generation time. Although the husbandry of this species is poorly developed in contrast to the scientific rigor that is required, this species has great potential as an experimental model, from embryology due to the optical clarity of the embryos and larvae, extracorporeal development of the embryos, to studies of brain disorders such as depression, Parkinson's disease and autism, by the high similarity of the nervous system between zebrafish and human. This paper discusses the importance of this new experimental organism model; the biology of this species; areas in which the zebrafish is used in biomedical research since their advantages its disadvantages; on bioethics in research using animal models, in particular, *Danio rerio*.

Keywords: zebrafish, animal experimentation, biomedical research.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	BIOLOGIA DO ZEBRAFISH	7
2.1	Região geográfica	7
2.2	Condições ambientais	9
2.3	Dieta	10
2.4	Reprodução	11
2.5	Comportamento	12
2.6	Linhagens	14
3	EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	16
3.1	Histórico na pesquisa biomédica	17
3.2	Vantagens e desvantagens do zebrafish em pesquisa biomédica	17
3.3	Por que substituir o modelo mamífero?	19
3.4	Aplicações em pesquisa biomédica	20
3.4.1	Neurologia	20
3.4.2	Toxicologia	23
3.4.3	Cardiovascular	24
3.4.4	Medicina regenerativa	25
3.4.5	Alterações de comportamento	26
4	ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	27
4.1	Bem-estar	28
4.2	Uso de anestésicos	29
4.3	Eutanásia	31
5	CONCLUSÕES	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A experimentação animal tem importante papel na evolução científica. Ainda que alguns modelos tenham sido substituídos por métodos alternativos que supram os testes *in vivo*, a pesquisa científica ainda necessita de modelos animais para desenvolvimento, confiabilidade e legitimação da ciência.

A utilização do zebrafish (*Danio rerio*) como modelo experimental tem crescido rapidamente para a pesquisa biomédica. Provavelmente, não é o primeiro animal que vem a mente quando se pensa em pesquisa médica. No entanto, pesquisadores do mundo todo estão se interessando cada vez mais por esse pequeno peixe tropical de água doce e uma das razões mais difundidas é que os embriões dessa espécie, ao contrario dos de camundongos, se desenvolvem fora do organismo materno e são transparentes. Essa é uma grande vantagem que permite aos pesquisadores estudar detalhadamente o desenvolvimento embrionário dos vertebrados sem a necessidade de procedimentos invasivos. Outro fator benéfico é que o zebrafish pode produzir de 200 a 300 ovos fertilizados por semana e completa sua embriogênese em 72h. E ainda, os adultos e os embriões dessa espécie são de tamanho pequeno, tem menor custo e o intervalo entre gerações é curto.

Em 2013, na conceituada *Nature*, Howe *et al.* (2013) divulgaram a sequência do genoma do zebrafish, revelando que esse peixe, os camundongos e os humanos apresentam 12.719 genes em comum, ou seja, 70% dos genes humanos são encontrados no *Danio rerio*. Assim, quando genes causadores de doenças em humanos são injetados nesses embriões, os peixes em crescimento acabam por adquirir a mesma doença. Por essa razão, a espécie tem sido amplamente utilizada em estudos visando à cura de doenças genéticas, tais como depressão, esquizofrenia e mal de Parkinson. Além de outras tantas vantagens de sua morfologia e fisiologia semelhantes ao do humano, tais como fibras musculares, sistema nervoso central, sistema esquelético complexo, células hematopoiéticas múltiplas (eritrócitos, células mielóides, linfócitos B e T, etc), sistema cardiovascular (LIESCHKE;CURRIE, 2007).

2 BIOLOGIA DO ZEBRAFISH

O zebrafish (*Danio rerio*) é um teleósteo tropical de água doce, pertencente à família Cyprinidae. Essa espécie é caracterizada pelo pequeno tamanho, quando adulto mede em torno de 4-5 cm, possui corpo cilíndrico e padrão de cor distinta alternando listras horizontais claras e escuras (SPENCE *et al.*, 2008), em torno de 7-9 listras azuis escuras sobre prata, que percorrem todo o corpo, e possuem coloração verde na região dorsal. Apresentam dimorfismo sexual: os machos são mais afilados e geralmente dourados na região ventral, as fêmeas são mais prateadas e arredondadas, principalmente na região ventral, o que é mais evidente no período próximo da desova (SUWA; YAMASHITA, 2007 apud GODOY, 2012). As fêmeas podem desovar a cada 2-3 dias e uma única desova pode conter centenas de ovos. A desova pode conter 200 ovos de uma única fêmea, os alevinos crescem rapidamente e podem atingir a maturidade sexual dentro de 2-3 meses (DETRICH *et al.*, 1999 apud GERLAI *et al.*, 2000). Os embriões do zebrafish são grandes comparados com outros peixes (0,7 mm de diâmetro) e são opticamente transparentes (SPENCE *et al.*, 2008).

Figuras 1 e 2 – Exemplar fêmea e macho, respectivamente

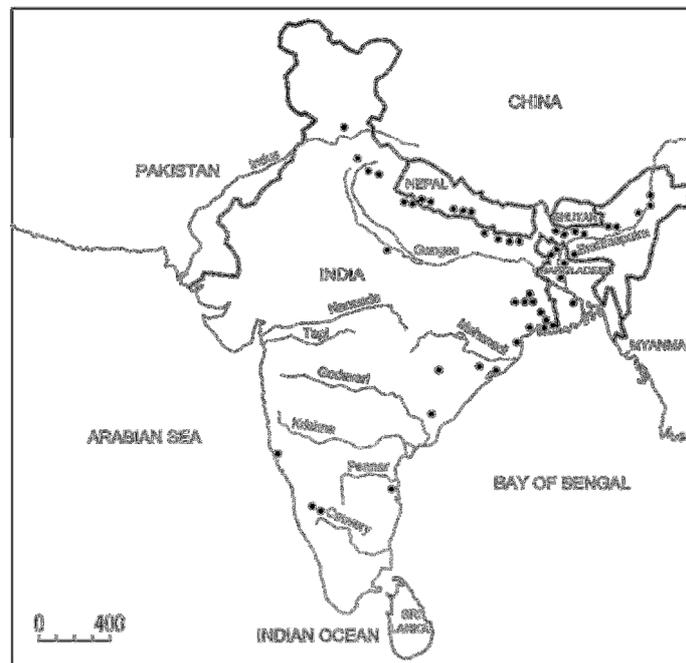


Fonte: arquivo próprio (2014).

2.1 Região geográfica

O habitat natural do zebrafish é localizado no sul da Ásia, nas bacias dos rios Ganges e Brahmaputra, regiões nordeste da Índia, Bangladesh, Nepal e norte de Mianmar (SPENCE *et al.*, 2006), como mostrado na figura 3.

Figura 3 – Pontos pretos indicam registros de zebrafish



Fonte: Spence *et al.* (2008).

O zebrafish tem sido reportado em uma ampla variedade de tipos de habitat nessa região, incluindo diques de irrigações, plantações de arroz, lagoas feitas pelo homem, cursos superiores de rios e até mesmo correntezas rápidas (MENON, 1999; DANIELS, 2002; BHAT, 2003 apud LAWRENCE, 2007). O sul da Ásia é caracterizado pelo clima de monções, com uma ampla variação sazonal: estação chuvosa e seca, bem delimitadas, variando constantemente as extensões de habitats aquáticos (SPENCE *et al.*, 2007). Os cursos dos principais rios Ganges e Brahmaputra nascem no Himalaia e percorrem as áreas baixas e inundam extensivamente durante os meses de junho a setembro. Os rios nessa região mudam continuamente no decorrer das estações, deixando lagos e canais cegos ou *beels*, como mostrado na figura 4, esses muito comuns em Bangladesh pela formação de lagos-pântanos em decorrência de inundação, especialmente, durante a estação de monção (SPENCE *et al.*, 2006). Esses cursos de águas paradas, lagos, lagoas e canais de irrigação influenciam para os parâmetros do habitat, incluindo a química da água e a sua abundância, e conseqüentemente, a biologia do zebrafish, sua reprodução, sua alimentação e seu desenvolvimento.

Figura 4 – *Beel* em Tangail, Bangladesh



Fonte: Niyogi (2007)¹

Nos resultados de Spence *et al.* (2006), o *Danio rerio* foi mais presente em áreas não salinas, de várzea, ao invés das áreas ribeirinhas, e não foram achados em rios ou riachos temporários. Na grande maioria desses locais o zebrafish foi encontrado em vegetação aquática submersa, o que já havia sido verificado em um estudo de comportamento realizado com o zebrafish selvagem e o doméstico se observou a preferência dessa espécie para realizar a desova em locais associados à vegetação aquática (SPENCE *et al.*, 2007).

Essas observações sugerem que os zebrafish preferem águas paradas ou com movimento lento, ligeiramente alcalina (pH ~ 8,0), de clareza relativamente alta. Esses dados são úteis na medida em que podem ser aplicados diretamente em projetos de parâmetros químicos de água ideal para o modelo, em laboratórios, como produção em cativeiro.

Para aperfeiçoarem-se os métodos de criação do zebrafish, é necessário maior entendimento de seus comportamentos em meio natural, desde hábitos preferenciais, comportamental reprodutivo e a sua dieta (LAWRENCE, 2007).

2.2 Condições ambientais

Os parâmetros de qualidade da água para a sua criação em cativeiro já estão bem estabelecidos (WESTERFIELD, 2000). No entanto é importante ressaltar que a qualidade da água assim como a alimentação exerce um grande impacto sobre a sobrevivência e

¹ Disponível em: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:BD_Tangail_1.JPG. Acesso em: 17 de jul. 2014.

reprodução do zebrafish. Por outro lado, uma das razões para a ascensão do zebrafish como modelo experimental é a tolerância de condições ambientais em cativeiro. Sua capacidade de adaptação é um reflexo de sua distribuição no meio ambiente, como são encontrados em uma variedade de habitat, que variam consideravelmente em suas propriedades físico-químicas, como resultados da geologia local e pronunciadas flutuações sazonais nos padrões de precipitação (TALWAR; JHINGRAN, 1991 apud LAWRENCE, 2007). No entanto, devemos reconhecer que há um custo energético dos peixes em operar fora de sua faixa de conforto.

Na pesquisa de Engeszer *et al.* (2007), a maioria dos zebrafish coletados da natureza estavam em pH entre 5.9 – 8.1, e condutividade de 10 μ S até 271 μ S. Matthews; Trevarrow; Matthews (2002) sugerem oxigênio dissolvido 6.0 ppm (mg/L). Alta concentração de amônia ou nitrito pode causar danos para os peixes, o nitrito é absorvido através das brânquias e interfere a capacidade do peixe para absorver o oxigênio (VARGESSON, 2007 apud REED; JENNINGS, 2010).

Em animais mantidos em condições fora da zona de conforto ocorre maior gasto de energia para regulação da homeostase, crescimento, produção de gametas e funções imunitária. As taxas metabólicas e o tamanho corporal dos ectotérmicos dependem fortemente da temperatura externa (CLARKE; JOHNSTON, 1999 apud LÓPEZ-OLMEDA; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2011). Portanto, a manutenção da temperatura é fundamental na criação. Os zebrafish são considerados euritérmicos que significa que podem tolerar uma ampla margem de temperatura. López-Olmeda; Sánchez-Vázquez (2011) observaram que as temperaturas variaram de 16.5°C até 38.6°C em zebrafish coletado da natureza. A eclosão dos embriões varia de 48-72h e isso depende muito da temperatura, em temperaturas mais baixas (24-26°C) será mais demorado do que em temperaturas mais elevadas (28-30°C). Em um experimento realizado por Johnston *et al.* (2009), embriões eclodidos na temperatura de 26°C desenvolveram em larvas com maior número de fibras musculares rápidas.

Assim, os parâmetros de qualidade da água são vitais para a produção em cativeiro, minimizando a mortalidade e aumentando o número de embriões de alta qualidade (LAWRENCE, 2007).

2.3 Dieta

Os zebrafish são onívoros, não apresentam estômago verdadeiro e possuem um longo intestino com uma grande área de absorção (ULLOA *et al.*, 2011). Como a espécie é agástrica

especulou-se que o peixe teria melhor desempenho quando alimentados em pequenas refeições ao longo do dia (LAWRENCE, 2007).

Spence *et al.* (2007) relatou que os componentes da dieta do zebrafish na natureza são zooplâncton e insetos, embora fitoplâncton, algas filamentosas e plantas vasculares foram encontrados no sistema digestivo, assim como ovos, provavelmente de pequenos crustáceos. Os insetos eram hemípteros, himenópteros coleópteros e principalmente dípteros (SPENCE *et al.*, 2007). Devido a essa tendência em consumir larvas de dípteros foi proposto a utilização do zebrafish no controle de mosquitos (SHRESTHA, 1990 apud LAWRENCE, 2007). McClure; McIntyre; McCune (2006) analisaram o conteúdo intestinal de zebrafish a partir de três locais diferentes na Índia, e descobriram que os insetos, a maioria de origem terrestre, foram as presas predominantes. Esses autores argumentaram que esse padrão foi o resultado de preferências de micro-habitat da espécie, como águas paradas, margens de córregos. Estudos durante os períodos de alta pluviosidade devem ser realizados para uma compreensão mais completa dos hábitos alimentares dessa espécie na natureza.

Lawrence *et al.* (2012) avaliaram o efeito da frequência da alimentação sobre o crescimento dos zebrafish e verificaram que grupos alimentados com uma dieta de 5 % de seu peso corporal, uma, três ou cinco vezes ao dia apresentavam maior peso e tamanho do que os alimentados a cada dois dias. Observaram ainda que fêmeas quando alimentadas com maior frequência, ou seja, cinco vezes ao dia apresentaram maior peso que os demais grupos. No entanto, não houve diferença significativa entre alimentar os peixes uma vez ou mais vezes ao dia no tamanho, tanto de fêmeas como de machos. A alimentação uma vez ao dia parece ser suficiente para suportar o crescimento e o desempenho reprodutivo nessa espécie. A alimentação frequente irá gerar fêmeas mais pesadas, porém isso não significa elevada taxa de crescimento, isso sugere que mais de uma alimentação por dia em estágio juvenil não é necessária.

Informações sobre as preferências alimentares dos zebrafish selvagens são de relevância para o manejo, uma vez que são determinantes no sucesso da criação em laboratório. Para a sobrevivência e maior crescimento e reprodução, os requerimentos nutricionais devem ser estabelecidos e aplicados em cativeiro.

2.4 Reprodução

Os zebrafish são animais ovíparos, ou seja, a fertilização e o desenvolvimento são externos. As fêmeas são assíncronas, ou seja, a desova ocorre múltiplas vezes durante o dia,

se reproduzem em pequenos grupos, espalhando os ovos pelo substrato sem cuidado parental (BREder; ROSEN, 1966 apud LAWRENCE, 2007).

A maturidade sexual é atingida por volta de 10-12 semanas de vida, no entanto, é aconselhável a reprodução a partir dos seis meses para obter um bom desempenho reprodutivo e embriões de melhor qualidade (SUWA; YAMASHITA, 2007 apud GODOY, 2012).

O zebrafish selvático tem sido descrito como uma espécie sazonal, com a reprodução ocorrendo durante as monções (SPENCE *et al.*, 2006). No entanto, fêmeas selváticas foram encontradas com ovos maduros fora da estação chuvosa (SPENCE *et al.*, 2006, 2007). Em condições de criação artificial os zebrafish adultos dependem de um fotoperíodo regular principalmente na manutenção do ciclo reprodutivo.

A desova dos zebrafish em cativeiro é influenciada pelo fotoperíodo (BREder; ROSEN, 1966 apud SPENCE *et al.*, 2008). Essa espécie tem atividade diurna e seus ciclos sincronizam com ciclos claro-escuro e com a alimentação. Na natureza, o zebrafish está intimamente relacionado com o ciclo claro-escuro.

Os ovos do zebrafish são fertilizados, usualmente no entardecer, e os embriões se desenvolvem rapidamente, em torno de quatro dias. Tal como acontece com outros peixes adaptados às monções, a reprodução é estimulada com a chegada das chuvas (MUNRO, 1990; TALWAR; JHINGRAN, 1991 apud LAWRENCE, 2007). Embora se observe fêmeas com óvulos maduros durante a estação seca, especula-se que a reprodução é mais dependente à disponibilidade de alimentos, conseqüentemente, é correlacionada positivamente com o aumento da pluviosidade (SPENCE *et al.*, 2006). Os ovos são demersais, que fica no fundo do substrato, e dependendo das condições ambientais, eclodem entre 48-72h (LAWRENCE, 2007).

As larvas eclodem entre 2.5 – 3 dias após a fertilização. Durante o desenvolvimento do estágio larval já inicia a sincronização do ciclo circadiano (CAHILL, 2002). A transição de larva para juvenil ocorre 30 dias após a fertilização (KIMMEL *et al.*, 1995 apud ULLOA *et al.*, 2011).

2.5 Comportamento

O zebrafish tem sido utilizado em estudos de comportamentos normais e patológicos (STEWART *et al.*, 2011) e em distúrbios cerebrais (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014b; STEWART *et al.*, 2014b), assim, conhecer o comportamento fenotípico do zebrafish (JIA; FERNANDES; GERLAI, 2014; EGAN *et al.*, 2009) é importante para a compreensão

de caminhos neurais, biomarcadores fisiológicos e bases genéticas da função cerebral normal e patológica dessa espécie. Por não haver uma terminologia estandardizada, o reconhecimento dos fenótipos comportamentais do zebrafish ainda é um desafio. Assim, com intuito de melhorar a interpretação de resultados publicados tem-se desenvolvido um catálogo detalhado de comportamento do zebrafish, o ZBC (*Zebrafish Behavior Catalog*) que abrange tanto os modelos adultos quanto de larvas (KALUEFF *et al.*, 2013). O ZBC criou um glossário que cita os comportamentos específicos, os referindo por números, padronizando a identificação do comportamento do zebrafish. (KALUEFF *et al.*, 2013). Ainda há a técnica de quantificação dos fenótipos, com softwares especializados em rastreabilidade por vídeo (EGAN *et al.*, 2009; CANAVELLO *et al.*, 2010), inclusive por iPhone® (PITTMAN; ICHIKAWA, 2013).

O *Danio rerio* é frequentemente descrito como um peixe de hábitos aquáticos superficiais, ainda que nadem perto do fundo durante a ovoposição (SPENCE; SMITH, 2005) e que durante o cortejo utilizem toda a coluna de água (SPENCE *et al.*, 2006). São peixes de atividade diurna. No experimento de Gerlai e colaboradores (2000), os zebrafish preferiram o ambiente claro ao invés do ambiente escuro.

O zebrafish é uma espécie gregária e nadam em pequenos cardumes (5-20 indivíduos) em movimento lento ou água parada em várzeas e preferem associar-se com cardumes mais ativos (PRITCHARD *et al.*, 2001). Por apresentarem uma série de comportamentos sociais, tais como territorialidade e aprendizado social, os zebrafish frequentemente exibem comportamento agonista, comportamento de luta ou conflito, (RICCI *et al.*, 2013). As agressões, por mordeduras ou perseguições, ocorrem principalmente durante o estabelecimento de hierarquias e acasalamento. Os machos são territoriais em torno de potenciais locais de ovoposição (SPENCE; SMITH, 2005), e podem adotar também a tática de perseguição às fêmeas (GOOLISH *et al.*, 1998 apud LAWRENCE, 2007). As fêmeas escolhem seus parceiros (SPENCE; SMITH, 2005) por questões ligadas à interação física, visual e a pistas olfatórias (feromônios) que provocam uma cascata das respostas hormonais que influenciam a maturidade e a reprodução. Gerlach (2006) relatou que fêmeas expostas aos odores masculinos produziram 17% mais ovos viáveis do que as fêmeas não expostas, e 26% mais ovos viáveis do que as que ficaram expostas aos odores femininos.

Experiências laboratoriais demonstraram que as larvas de zebrafish preferem associar-se com parentes, usando o órgão olfativo (GERLACH; LYSIAK, 2006). Essa observação sugere que cardumes de larvas na natureza estão, preferencialmente, mais perto de parentes. O grau de parentesco genético de indivíduos em cardumes de adultos é desconhecido, embora

tenha evidência experimental indicando que a preferência do indivíduo de associar-se a irmãos muda após a maturidade sexual, sugerindo que em algum ponto da vida larval ou juvenil do peixe disperse-o para longe de seu cardume natal (GERLACH; LYSIAK, 2006). Essa premissa é suportada por estudos de genética de populações que têm mostrado altos níveis de variabilidade genética e uma baixa estrutura genética entre os peixes coletados em quatro locais diferentes na Índia (GRATTON, 2004 apud LAWRENCE, 2007).

Pesquisas demonstraram que o zebrafish possui memória (JIA; FERNANDES; GERLAI, 2014; WILLIAMS; WHITE; MESSER, 2002). Jia; Fernandes; Gerlai (2014) demonstraram que após um estímulo visual, os zebrafish continuaram nadando perto da origem do estímulo após alguns minutos. Devido à velocidade de nado relacionado com o tamanho do tanque descartou-se a possibilidade de incapacidade ou redução de mobilidade, demonstrando a sua memória em curto prazo. Além disso, em Colwill *et al.* (2005) confirma que os zebrafish possuem a capacidade de aprendizagem para discriminação de cores.

2.6 Linhagens

Os zebrafish podem ser adquiridos em lojas de animais de estimação ou simplesmente capturados na natureza, no entanto, de acordo com Vignet *et al.* (2013) há diferenças de comportamento entre as linhagens selvagens, sendo assim, a linhagem deve ser de acordo com o objetivo do experimento.

As linhagens de *Danio rerio* mais utilizadas são AB e TU (Tübingen). A linhagem AB, desenvolvida por George Streisinger, é uma linhagem ativa, geralmente usada em manipulação genética e farmacológica, e TU desenvolvida pelo grupo Tübingen, apresentam nadadeiras mais curtas; comumente usada em pesquisas comportamentais. No *Zebrafish Database*² estão registradas 26 linhagens diferentes tipo selváticas, dentre elas: Tupfel Long Fin (TL), Wild Indian Karyotype (WIK), Ekkwill (EKW), TM1, Nadia, Darjeeling e Bangladesh (BLD01). Somente as linhagens AB e TU são geneticamente definidas. (VIGNET *et al.*, 2013). As linhagens por coloração e fenótipo: pink, leopardo (pintas escuras), albino e nadadeira longa, esses três últimos por mutação espontânea (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014b).

Vários estudos comparando linhagens selváticas com as domesticadas mostraram diferenças comportamentais; em Drew *et al.* (2012) a linhagem domesticada passou mais

² Disponível em www.zfin.org. Acesso em: 17 jul. 2014.

tempo perto da superfície da água e ocupou mais a frente do aquário em presença do humano. Zebrafish selvático e domesticados foram expostos a um derivado do estradiol: os machos domesticados tiveram comportamento sexual mais dominante (SÖFFKER; STEVENS; TYLER, 2012). Além disso, Vignet *et al.* (2013) sugeriram que a linhagem TU é mais ativa que a linhagem AB, essa apresentou comportamento mais ansioso e preferiu o ambiente com sombra, o que explica porque essa linhagem não é normalmente usada em pesquisas comportamentais.

Em linhagens de laboratório tem se observado rápida taxa de crescimento, maior dimorfismo sexual, redução do padrão comportamental de evitar o predador e um maior grau de orientação na superfície se comparado com a linhagem selvática na Índia (REED; JENNINGS, 2010).

Apesar do crescente número de linhagens, a maioria dessas está fora do padrão ou tem origem incerta (SISON *et al.*, 2006 apud KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014b). Pesquisas mostraram que as linhagens possuem diferenças genéticas significativas (MAHABIR *et al.*, 2013).

3 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

A pesquisa biomédica depende da utilização de modelos animais para compreender a patogênese de doenças de humanos e de animais e para fornecer sistemas para desenvolver e testar novas terapias (LIESCHKE; CURRIE, 2007). Os mamíferos têm sido muito utilizados na pesquisa, entre eles o camundongo, o rato e os primatas, e isso deve principalmente pela homologia marcante entre o genoma desses com o do humano, além da proximidade da anatomia, da biologia celular e da fisiologia. Uma série de fatores deve ser considerada para o uso do modelo experimental; além da expressiva proximidade evolutiva e semelhança anatômica, deve ser considerada a aproximação de processos celulares (LIESCHKE; CURRIE, 2007).

A utilização de animais para diversos fins, como alimentação, transporte, animais de estimação, esportes, recreação e companheirismo é tão antiga quanto o próprio ser humano (DOKE; DHAWALE, 2013). Com o advento da evolução científica, os animais passaram a ter grande utilidade na pesquisa, tais como, camundongos, ratos, hamsters, coelhos, aves, cobaias, anfíbios, primatas, cães, gatos e peixes. O número de animais usados em pesquisa tem aumentado com o avanço e desenvolvimento na tecnologia médica. Com isso, tem se buscado alternativas para redução, refinamento e substituição. Como “métodos alternativos” pode-se considerar a substituição de mamíferos por microrganismos, insetos, anfíbios, répteis e peixes, por exemplo.

O uso de animais em pesquisas científicas tem gerado grandes discussões nos últimos anos, e têm sido crescentes as preocupações relacionadas à bioética e bem-estar animal. Um dos argumentos levantados nos debates é que os métodos alternativos poderiam substituir a utilização de animais na investigação biomédica. Dentro da comunidade científica vem crescendo o interesse por métodos alternativos visando diminuir o uso de animais na experimentação, pois esses correspondem a um alto custo na pesquisa, uma vez que devem ser acondicionados, alimentados e mantidos saudáveis para o propósito científico. Os métodos alternativos correspondem cerca de 90% da pesquisa biomédica (MEDICAL..., 2007) e incluem modelos matemáticos e computacionais, tecido avançado e culturas celulares e tecnologia de digitalização. A pesquisa com animais contribuiu em 70% dos prêmios Nobel de Fisiologia ou Medicina. Cientistas premiados afirmam que não poderiam realizar suas pesquisas sem os animais (MEDICAL..., 2007).

3.1 Histórico na pesquisa biomédica

O *Danio rerio* foi descrito pela primeira vez por Francis Hamilton, um cirurgião da companhia British East India, estabelecido na Bengala Ocidental, Índia, no início do século XIX. Ele publicou *Um relato dos peixes encontrados no rio Ganges e seus ramos* no ano de 1822, dentre os peixes havia dez exemplares do zebrafish (SPENCE *et al.*, 2008). Inicialmente foi chamado de *Brachydanio rerio* até sua transferência para o gênero *Danio rerio*.

No início do século XX, o zebrafish tornou-se popular na Europa e nos EUA (ENDERSBY, 2007 apud MEUNIER, 2012) em aquariofilia, principalmente pela sua tolerância a variações ambientais. Antes dos anos 1930, o zebrafish já estava sendo usado como modelo para desenvolvimento e embriologia (LIESCHKE; CURRIE, 2007). Em 1934, Charles Creaser publicou um artigo descrevendo o manuseio do zebrafish e enfatizando a facilidade de estudos com essa espécie.

George Streisinger começou a trabalhar com zebrafish no final dos anos 1960 (GRUNWALD; EISEN, 2002), e em 1981, uma publicação do grupo liderado por Streisinger, da Universidade do Oregon, sugeriu que se pudesse aplicar uma análise mutacional no desenvolvimento embrionário, produzindo embriões haploides a partir de ovos tratados com radiação ultravioleta, a partir daí começou-se a pesquisar não só mutagênese no desenvolvimento embrionário, como também genética molecular, posteriormente, neurociências, toxicologia, regeneração tecidual, etologia, entre outras áreas de interesse.

O principal motivo de Streisinger ao escolher o zebrafish como animal de experimentação foi o seu desejo de mudança para modelos mais próximos ao humano; dos invertebrados, que estavam sendo amplamente estudados em sua época, para um modelo vertebrado. Além disso, pela necessidade por modelos para genética que fossem de pequeno tamanho, reprodução rápida e ampla progênie (MEUNIER, 2012).

3.2 Vantagens e desvantagens do zebrafish em pesquisa biomédica

O *Danio rerio* tem emergido como um excelente modelo para pesquisa em várias áreas, dentre elas a farmacogenética, a neurologia e a embriologia. Isso se deve ao fácil acesso a todas as fases de desenvolvimento, a claridade óptica dos embriões e das larvas que permite a visualização em tempo real do desenvolvimento, além da alta genética, facilmente

manipulável e da fisiologia homologa com a dos seres humanos, especialmente, o sistema nervoso central.

Grandes universidades e centros de pesquisa em todo o mundo têm estabelecido o zebrafish como modelo experimental, e os Institutos Nacionais de Saúde dos EUA, recentemente, construíram o maior centro de criação de zebrafish do mundo, com a capacidade para abrigar mais de 19.000 tanques e 100.000 peixes (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014b).

Essa espécie é facilmente acondicionada em tanques com sistema de recirculação, como mostrado na figura 5.

Figura 5 – Exemplo de tanques com sistema de recirculação de água



Fonte: Indiana University of Pennsylvania

Seu pequeno tamanho possibilita alta estocagem, não necessita grande infraestrutura de instalações, como ocorre em biotérios de camundongo. O custo de utilização do zebrafish é inferior ao do camundongo; por ano, a criação de camundongos é cerca de três vezes maior comparada com a de zebrafish (LIESCHKE; CURRIE, 2007). Além disso, seu tempo de geração é curto (três meses) e é possível criar muitos exemplares em um espaço limitado (100 adultos em um tanque de 8 – 12L) (DAMMSKY *et al.*, 2011) e reproduz rápida e abundantemente (em uma única desova, a fêmea produz cerca de 100 ovos), além da alta (80-85%) homologia genética com humanos (HOWE *et al.*, 2013).

A transparência do embrião de zebrafish facilita nos programas de desenvolvimento genético, pois é possível monitorar e manipular seu desenvolvimento sem dificuldades. Além do mais, apresenta desenvolvimento rápido, eclode em menos de três dias e se torna maduro

em 90 dias, o que torna a pesquisa mais rápida. Espécies ovíparas podem ser clonadas facilmente, permitindo a manipulação genética para estudos de haploides, triploides ou tetraploides com androgênese ou ginogênese (CORLEY-SMITH *et al.*, 1999; STREISINGER, 1984 apud SPITSBERGEN; KENT, 2003).

Das várias vantagens do zebrafish nos estudos sobre toxicologia estão algumas já citadas, e além dessas, os embriões podem viver alguns dias depois da fertilização sem alimentação externa, as drogas difundem facilmente através da pele e das brânquias e penetram via oral depois de 72h após a fertilização, não necessitando aplicação ativa das drogas (LANTZ-MCPEAK *et al.*, 2014). Ademais, tanto a larva quanto o adulto do zebrafish são utilizados como modelos, originando a expressão “dois modelos em um” (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014b).

O uso do zebrafish apresenta limitações, como por exemplo, o desconhecimento sobre a genética de suas linhagens. Além disso, as linhagens que são conhecidas não são padronizadas, em contraposto, espécies como o camundongo, as linhagens já estão bem estabelecidas (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014b), a padronização das linhagens traz a vantagem de reduzir possíveis variações em resultados experimentais devido ao seu padrão genético (ANDERSEN, *et al.*, 2004 apud MINAGAWA, 2007) com a finalidade de produzir resultados experimentais uniformes.

No entanto, baseados nas análises do PubMed sobre zebrafish, Kalueff; Echevarria; Stewart (2014) verificaram que as publicações sobre essa espécie cresceram 15% de 2004 a 2013. Mesmo com a crescente procura por esse modelo e pela grande possibilidade de pesquisas, alguns pontos da sua biologia e fisiologia permanecem incógnitos.

3.3 Por que substituir o modelo mamífero?

O modelo experimental zebrafish possui várias vantagens que o colocam como uma alternativa aos modelos já existentes, porém ainda assim é um modelo distante dos mamíferos. Então, por que substituir o modelo mamífero, tão mais próximo evolutivamente ao humano?

Fatores importantes têm sido discutidos sobre o modelo camundongo, amplamente utilizado em pesquisas biomédicas que geraram grandes avanços científicos. Um dos fatores mais discutidos são os problemas de estresse em camundongos, um paradigma do próprio modelo (KALUEFF; WHEATON; MURPHY, 2007). Esses animais são estressados por

natureza, assim alguns comportamentos humanos não conseguem ser reproduzidos inteiramente nessas condições, ou não conseguem ser fidedignos.

Entre as dificuldades na utilização de mamíferos podemos citar a necessidade de um grande espaço para a criação, o custo da criação, que é maior em relação aos peixes e a manipulação mais complicada, por exemplo, para coletar embriões de camundongos é preciso sacrificar a fêmea, ou ainda, em estudos farmacológicos, para avaliar uma droga, é necessário aplicar em cada animal individualmente ou por inalação em que o ambiente deve ser hermeticamente fechado, em peixes, a solução na água já atinge todos os indivíduos.

3.4 Aplicações em pesquisa biomédica

A pesquisa biomédica depende do uso de modelos animais para o entendimento de doenças humanas a nível celular e molecular. No entanto, uma série de fatores deve ser considerada na proximidade evolutiva e semelhança anatômica (LIESCHKE; CURRIE, 2007). As áreas de aplicações em pesquisa biomédica citadas são neurologia, toxicologia, cardiovascular, medicina regenerativa e alterações de comportamento.

3.4.1 Neurologia

A utilização do adulto e da larva de zebrafish, em neurociência aumentou nas últimas décadas devido à semelhança da fisiologia e da genética ao humano, além da facilidade de manipulação e similaridade do sistema nervoso central (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014b). O desenvolvimento de biomarcadores com o intuito de estudar as desordens do cérebro a partir de modelos animais; em larvas de zebrafish, a transparência permite o fácil acesso ao sistema nervoso central (STEWART *et al.*, 2014). A morfologia entre o cérebro de mamíferos e do zebrafish é similar, incluindo macro-organização do cérebro (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014b), demonstrado por Ullmann *et al.* (2010) que apresentaram um atlas tridimensional do cérebro do zebrafish usando ressonância magnética. Como em outros vertebrados, o sistema nervoso central do zebrafish é formado fora da placa neural, é uma camada de epitélio ectodérmico no lado dorsal do embrião (DE ESCH *et al.*, 2012). Outro exemplo de similaridade é a habênula, um núcleo localizado no epitélio do encéfalo, que regula a serotonina e a dopamina (OKAMOTO; AGETSUMA; AIZAWA, 2012), esses em correlação estreita com os distúrbios neuroquímicos da depressão.

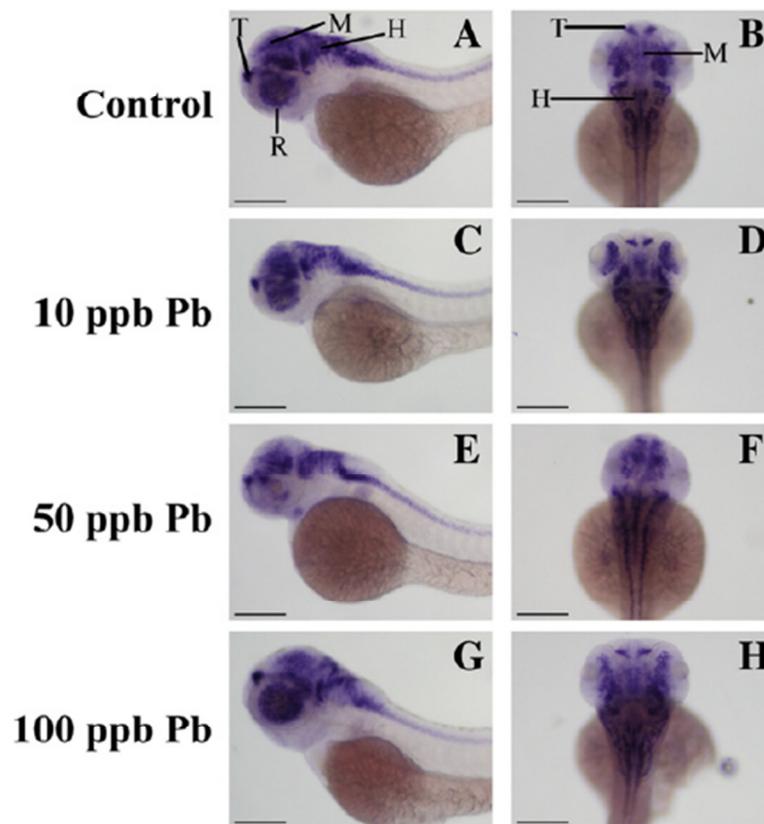
A depressão clínica está fortemente correlacionada com fatores genéticos, estresse ambiental e distúrbios neuroquímicos, e parece desempenhar uma função semelhante em fenótipos do zebrafish. O gene, *gr-s357*, do zebrafish, com uma mutação do receptor de glicocorticoide demonstra um aumento nos níveis de glicocorticoides que induz a comportamentos aberrantes, tais como locomoção reduzida e sobressaltos, que assemelham a fenótipos observados na depressão clínica humana (ZIV *et al.*, 2013).

A partir de pesquisas referenciando o zebrafish como uma espécie altamente sociável, que prefere nadar em cardumes, (GERLAI, 2014; ENGESZER; RYAN; PARICHY, 2004; PRITCHARD *et al.*, 2001), considerou-se que seria possível utilizá-lo em estudos sobre o transtorno do espectro autista, uma disfunção do desenvolvimento humano que afeta a capacidade de comunicação e socialização. Algumas drogas são clinicamente eficazes para alguns sintomas do autismo, porém não reduzem outros sintomas, por exemplo, a risperidona, um anti-psicótico, efetivo para tratar irritabilidade, não reduz os sintomas de déficit social e comportamentos repetitivos/obsessivos em humanos e parece ter efeitos semelhantes no zebrafish; isso indica que há alta sensibilidade a fármacos relevantes para a doença (STEWART *et al.*, 2014b). Maaswinkel; Zhu; Weng (2013) mostraram que o MK-801, um antagonista não-competitivo do receptor glutamato-NMDA (receptor envolvido nos processos de formação de memória e aprendizagem), assim como em humanos e camundongos, afetou o comportamento social do zebrafish; com o aumento da concentração de MK-801, diminuiu a coesão social. Em cardumes com um único indivíduo tratado com MK-801, é suficiente para redução da coesão social de todo o cardume, pois os zebrafish não tratados mudam o comportamento em decorrência do peixe tratado.

Existem alguns genes de zebrafish relacionados com doenças neurodegenerativas em humanos, e manipulações desses genes pode facilitar a compreensão dos mecanismos genéticos causadores da patologia (LEE; FREEMAN, 2014). Das doenças neurodegenerativas mais importantes em humanos estão o Alzheimer e o mal de Parkinson, e o zebrafish tem sido modelo para o estudo dessas enfermidades. Lopes da Fonseca *et al.* (2013), por exemplo, descrevem um gene do zebrafish homólogo à proteína transmembrana, *ATP13A2*, humana que tem importante papel no desenvolvimento embrionário. Essa proteína foi associada com mal de Parkinson; mutações na *ATP13A2* foram observadas em diversos casos do mal de Parkinson (CROSIERS *et al.*, 2011). Dois genes homólogos foram encontrados no *Danio rerio* com as mesmas funções da proteína humana, a neurogênese no embrião (LOPES DA FONSECA *et al.*, 2013).

A exposição ao metal chumbo (Pb) é um risco conhecido de contaminação (LEE; FREEMAN, 2014), também é sugerido que a exposição ao Pb tenha relação com a susceptibilidade a doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (BAKULSKI *et al.*, 2012). Segundo Peterson e colaboradores (2013), a expressão da glicoproteína *reln*, que participa ativamente do desenvolvimento neuronal, foi analisada durante o desenvolvimento de zebrafish expostos ao Pb. Um significativo decréscimo da expressão *reln* foi constatado nos embriões expostos a altas concentrações de Pb, como demonstrado na figura 6.

Figura 6 – Deformações em embriões de 72h após a fertilização (haf) decorrentes do uso de Pb. A e B (controle), C e D (10ppb Pb), E e F (50ppb Pb) e G e H (100ppb Pb). T (telencéfalo); H (rombencéfalo); D (diencéfalo); M (mesencéfalo).



Fonte: Peterson *et al.* (2013).

De fato, a exposição ao Pb resulta em efeitos drásticos no cérebro humano, porém ocorrem em concentrações relativamente elevadas.

3.4.2 Toxicologia

No trabalho de Chen e colaboradores (2012), a neurotoxicidade do Pb em embriões de zebrafish alterou o comportamento dos indivíduos quando adultos, esses resultados mostraram que a exposição ao Pb causou déficit no aprendizado e na memória, indicando que essa exposição persiste na adolescência e na idade adulta e afeta o desenvolvimento mental e cognitivo.

O desenvolvimento de ensaios toxicológicos em zebrafish tem oferecido várias vantagens para o rastreamento de um grande número de compostos de drogas e estudos toxicológicos (LANTZ-MCPEAK *et al.*, 2014). Na Alemanha, o embrião de zebrafish foi introduzido no teste *ISO (ISO 15088:2007)* para testes toxicológicos da água, substituindo o zebrafish adulto (YANG *et al.*, 2009), e desde 2002, o teste em embriões de zebrafish para tratamento de águas residuais é obrigatório (BRAUNBECK *et al.*, 2005).

No experimento de van den Brandhof; Montforts (2010) foi observado retardo de crescimento durante o desenvolvimento dos embriões de zebrafish expostos à teratógenos, ocorrendo deformações no saco vitelínico e na cauda (Figura 7).

Figura 7 – Retardo de crescimento, respectivamente: controle, carbamazepina, diclofenaco e metoprolol



Fonte: van den Brandhof; Montforts (2014).

Já na pesquisa de Chen *et al.* (2014), células pluripotentes (capacidade de uma única célula gerar outras linhagens de células de um tecido ou organismo) analisadas sob efeito de um teratogênico resultou significativo retardo na eclosão, deformações edematosas na coluna e atraso no desenvolvimento de 10 a 24 horas após a fertilização. Além disso, a expressão dos genes associados à pluripotência decresceu significativamente.

Visando verificar o efeito do uso de drogas e álcool durante a gravidez, trabalhos expondo embriões de zebrafish a esses químicos têm sido realizados. Lantz-McPeak *et al.* (2014) mostraram que a alta concentração de etanol e nicotina acarretaram o retardo de crescimento dos embriões.

Em um estudo sobre a cardiotoxicidade das antraciclinas (amplamente utilizadas em tratamentos quimioterápicos, porém em longo prazo pode causar toxicidade cardíaca), Han *et al.* (2014) sugeriram efeitos tóxicos no desenvolvimento embriogênico de zebrafish, incluindo edema pericárdico seguido de distorção do coração, alterações de expressão genética e de eclosão.

3.4.3 Cardiovascular

Também tem sido usado o *Danio rerio* como modelo para doenças cardiovasculares, de defeitos congênitos do coração até arritmias e cardiomiopatias (ASNANI; PETERSON, 2014). Amiloidose é uma doença na qual, células da medula óssea produzem amiloide, uma substância proteica anormal, que se acumula em diversos órgãos, incluindo o coração, causando danos ao músculo cardíaco. Zebrafish tratados com amiloide de cadeia leve desenvolveram disfunção cardíaca e apoptose das células, contribuindo com a mortalidade precoce a partir do dia 2 após o tratamento e o pico foi entre os dias 5 – 7 (MISHRA *et al.*, 2013). A amiloidose cardíaca é caracterizada por uma baixa pressão sistólica, coincidindo com a disfunção contrátil encontrada nos zebrafish, da mesma forma que em humanos.

A via de sinalização Notch (uma via de sinalização celular que atua principalmente no desenvolvimento de células embrionárias, coordenando a diversificação celular) tem o seu maior papel no coração durante o desenvolvimento (DE LA POMPA; EPSTEIN, 2012). Zhao *et al.* (2014) reportaram que danos no coração de zebrafish estimularam expressão de três receptores de Notch, especificamente no endocárdio e epicárdio, e inibindo a sinalização de Notch durante o processo regenerativo observou-se um defeito significativo na regeneração do miocárdio acompanhado da formação de cicatriz no local.

3.4.4 Medicina regenerativa

Em laboratório foi documentado que a longevidade do zebrafish pode exceder cinco anos (GERHARD *et al.*, 2002). A coleta de dados de classes de idade para populações selváticas facilitará comparações das idades fisiológicas entre os selvagens e os de laboratório, o que seria útil em trabalhos envolvendo envelhecimento (LAWRENCE, 2007).

A pesquisa do zebrafish tem se tornado uma ponte entre o desenvolvimento celular e o biológico devido ao seu rápido desenvolvimento. A gastrulação é completada em dez horas depois da fertilização, levando alguns a especular que o zebrafish pode torna-se o modelo animal ideal em estudos celulares e sub-celulares (BEIS; STRAINIER, 2006), inclusive de medicina regenerativa. O zebrafish regenera totalmente o músculo cardíaco dentro de poucas semanas (POSS; WILSON; KEATING, 2002), por isso tem sido usado em estudos sobre regeneração. Essa espécie, como modelo para danos cardíacos, fornece um meio para orientar a busca de tipos de células e vias que podem ajudar na recuperação da regeneração de pacientes cardíacos, (GOESSLING; NORTH, 2014). Em mamíferos, uma deficiência nos cardiomiócitos (tem a capacidade de proliferar em resposta a danos) está na base da fraca capacidade de regeneração do coração humano após a um infarto do miocárdio, Choi *et al.* (2013) visualizaram a proliferação de cardiomiócitos em embriões de zebrafish durante o desenvolvimento do coração, os pesquisadores constataram que a proliferação de cardiomiócitos aumentou após 48 haf até 72 – 120 haf. O mesmo grupo pesquisou a regeneração do fígado no zebrafish. A severidade dos danos no fígado influenciou a regeneração guiada pelas células epiteliais dos ductos biliares, e que essa regeneração pode iniciar a recuperação das funções hepáticas em humanos (CHOI *et al.*, 2014).

O zebrafish apresenta uma série de características que o tornam um excelente modelo em pesquisas sobre envelhecimento: grande número de descendentes e seu curto tempo de vida em relação a outros mamíferos (GERHARD, 2003), o zebrafish leva apenas 30-40 minutos para seu embrião ser observado e manipulável, 72h para se tornar larva e em 90 dias é um adulto; a taxa de crescimento rápida aliada à sua longevidade é uma possível relação para investigação sobre envelhecimento (GERHARD, 2003).

A combinação de alta taxa de crescimento e rápida transformação em corpo adulto tem várias correlações negativas, tais como redução da competência imunológica, depleção das reservas de energia e diminuição da expectativa de vida (INNESS; METCALFE, 2008). Sugere-se que o aumento do estresse oxidativo e danos nos lipídios mitocondriais durante o

primeiro mês de vida do zebrafish pode determinar o curto prazo de vida (ALMAIDA-PÁGAN; LUCAS-SÁNCHEZ; TOCHER, 2014).

Os pesquisadores Arslan-Ergul; Adams (2014) pesquisaram os fatores genéticos e ambientais na idade no cérebro de zebrafish e concluíram que a expressão genética é alterada com a idade e a diferença sexual.

Os estudos com zebrafish nas áreas de engenharia de tecidos, terapia de reposição celular e medicina regenerativa são abordagens promissoras para estudos sobre envelhecimento e doenças relacionadas com a idade (GURTNER *et al.*, 2006 apud GERHARD, 2007).

3.4.5 Alterações de comportamento

A síndrome alcoólica fetal (SAF) é uma desordem causada pelo consumo de álcool por mulheres grávidas, e como consequência a criança pode nascer com inúmeras anormalidades morfológicas e comportamentais. A análise comportamental pode ser mostrada em zebrafish submetidos a tratamento com álcool 24 haf, como mostrado no estudo de Buske; Gerlai (2011) em que os resultados mostraram mudança de comportamento em embriões; foi observado aumento da distancia entre os indivíduos juvenis 70 dias após a fertilização. Também mostraram que junto com a mudança de comportamento acompanharam redução do sistema dopaminérgico (envolvido no controle de movimentos, aprendizado, humor, emoções, cognição e memória) e serotoninérgico (envolvido no humor, apetite, regulação do sono), as reduções desses sistemas afetaram comportamentos essenciais no zebrafish tal como o movimento em cardume. Parker *et al.* (2014) mostraram a diminuição da expressão genica associada com a exposição ao álcool, e encontraram evidencias da ação do etanol durante o desenvolvimento causando ansiedade na espécie.

Na linha de pesquisa comportamental, Blaser; Vira (2014) analisaram a capacidade neurocognitiva do zebrafish e observaram que o sistema sensorial é extremamente versátil, que possuem excelente visão tetracromática, quimiosensação e sensação vestibular, por essas razões, essa espécie é passível de ser usado em pesquisas comportamentais.

4 ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O uso de animais em pesquisas biomédicas permitiu vários avanços científicos e tecnológicos que influenciaram o desenvolvimento de vacinas, antibióticos e anestésicos (CRISSIUMA; ALMEIDA, 2006). Como já foi comentado, a pesquisa com animais contribuiu em 70% dos prêmios Nobel de Fisiologia ou Medicina, e cientistas premiados afirmam que não poderiam realizar suas pesquisas sem os animais (MEDICAL..., 2007). Mas até que ponto o humano pode chegar usando animais em pesquisa? Existe um limite? Até que ponto é considerado uma pesquisa ética? Pergunta-se isso porque relatos de abusos em pesquisa são assombrosos e rondam a pesquisa; relatos da época da Segunda Guerra Mundial, onde eram usados humanos em testes de resistência física até observação de morte em câmaras de gás, contra esses assombrosos da humanidade resultaram códigos e leis, como exemplos, o Código de Nuremberg (1947) logo após a Segunda Guerra Mundial, determinando que os resultados da experimentação com animais fossem utilizados como base para os humanos, e na Declaração de Helsinque (1964), que já se reconhecia os cuidados que deviam ser tomados na condução de experimentos que possam afetar o meio ambiente e o bem-estar dos animais (GARUTTI; PALMA, 2010).

Com a publicação de *Bioethics: Bridge to the Future* em 1971, o criador da bioética, Van Rensselaer Potter abriu caminho para uma nova ciência ética que combina humildade, responsabilidade e respeito à vida. A ética, um conjunto de conhecimentos extraídos da investigação do comportamento humano de racional, fundamentada, científica e teórica, teve mais um fator fundamental a ser observado: a ponderação de ações, principalmente levando em consideração outra vida; o bem-estar daqueles animais que ajudam a fundamentar a ciência.

A aprovação da Lei Arouca (BRASIL, 2008) é um importante passo para a regulamentação do uso de animais para experimentação no nosso país, apesar dessa lei estar centralizada no poder do Ministério da Ciência e Tecnologia fragiliza a abordagem da proteção animal (MOLENTO, [2008]).

O conceito de bem-estar faz parte da ética em pesquisa biomédica. A possibilidade de utilização de animais em pesquisa requer a sanidade mental e física dos animais em questão.

4.1 Bem-estar

Em 1985, nos Estados Unidos, ocorreu um processo de revisão da lei americana de bem-estar animal (USA, 1966) após o polêmico caso de *Silver Spring* (onde em uma pesquisa, macacos eram mantidos em péssimas condições sanitárias e físicas) e se tornou obrigatória a revisão dos protocolos de pesquisas em animais pelas comissões institucionais (PAIXÃO, [2004?]). No Brasil, foi constituída a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e os Comitês de Ética em Pesquisa, contidos na resolução nº 196 de 1996 do Conselho Nacional de Saúde.

Com o objetivo de orientar as comissões de ética em pesquisa, foi criada a doutrina dos três “R’s” (*refinement, replacement e reduction*), em 1959 na Inglaterra. Refinamento é o uso de métodos que aliviam ou minimizam a potencial dor, sofrimento ou angústia, e que melhoram o bem-estar para os animais que precisam ser usados através de pessoas treinadas. Substituição é a pesquisa biomédica que envolve o uso de métodos tais como culturas celulares, modelos computadorizados ao invés de animais. Os mamíferos devem ser substituídos por animais com sistema nervoso menos desenvolvido. E redução apresenta a ideia de usar sempre o menor número de animais possível, desde que nos forneça resultados estatísticos significativos.

O zebrafish foi pensado como um método de substituição, onde os mamíferos deveriam ser substituídos por animais com sistema nervoso menos desenvolvido. Os peixes, na escala evolutiva, ainda têm três classes que os separam dos mamíferos, no entanto, apesar de possuírem sistema nervoso menos desenvolvido, os peixes tem percepção de dor? Percebem anestésicos como aversivos? Sofrem de estresse? Três sonoros “sim”. Rose *et al.* (2012) constaram que os peixes são neurologicamente equipados com nociceptores (receptor sensorial que envia sinal que causa a percepção de dor) e respostas emocionais inconscientes, mas não sofrem de dor e sentimentos conscientes, inclusive a pesquisa de Malafoglia *et al.* (2013) é o zebrafish como modelo animal para estudos de nociceptores. Na pesquisa de Readman *et al.* (2013), os resultados mostraram que o *Danio rerio* evitou entrar em contato com dois tipos de anestésicos. Speedie; Gerlai (2008), os zebrafish mudaram seu comportamento em resposta a presença de substâncias de alarme, movendo-se em estereótipos de situações de dor e de medo (como ocorre em modelos de predação). Apesar de serem animais de classificação científica inferior, a preocupação com os aspectos éticos da utilização desses em pesquisa deve ser levada em consideração.

A avaliação de bem-estar tem sido o critério utilizado para a preocupação com determinados seres do reino animal usados em pesquisa biomédica. Paixão ([2004?]) sugere

que as comissões de ética, em sua maioria, avaliam procedimentos em vertebrados, o que inclui o zebrafish, mas algumas vezes essa espécie pode ser uma das menos avaliadas pelos comitês de ética, pela falsa premissa que os peixes não sentem dor. Como meio de minimizar a dor e o estresse causados por experimentos, os métodos de anestesia e eutanásia se tornam importantes meio de redução dessas situações.

4.2 Uso de anestésicos

Para avaliar métodos de eutanásia em animais, alguns critérios em anestésicos devem ser considerados tais como habilidade de induzir a perda de consciência, morte com a mínima dor possível, mínimo estresse ou ansiedade, reversibilidade da consciência, tempo requerido para induzir a inconsciência, tudo apropriado ao tipo de espécie e à idade do animal (MATTHEWS; VARGA, 2012). O anestésico ideal é aquele que produz anestesia em três minutos ou menos e não cause toxicidade nos níveis de tratamento (WONG *et al.*, 2014).

Um dos anestésicos mais utilizados em zebrafish é a tricafina metanosulfonato (MS-222). Esse anestésico inibe a propagação de potenciais de ação bloqueando os canais de sódio de membrana. A eficácia da MS-222 depende de fatores ambientais, por exemplo, temperatura, oxigênio, pH, dureza e salinidade da água, e ainda de fatores biológicos como idade, sexo, tamanho, peso, conteúdo de lipídios, espécie de peixe e densidade da biomassa (POPOVIC *et al.*, 2012). Sneddon (2012) sugere dose de 50 – 400mg/L⁻¹, ou ainda 250 – 500mg/L para a maioria das espécies (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2013). Várias são as consequências fisiológicas da MS-222, tais como alteração do plasma sanguíneo, hipóxia, acidose respiratória e hiperglicemia (POPOVIC *et al.*, 2012). Popovic *et al.* (2012) utilizaram a MS-222 tamponada e a não-tamponada com a finalidade de eutanásia e verificaram que a última provocou estresse em 100% dos zebrafish, o que ficou evidenciado pelos movimentos operculares rápidos. Nenhum dos animais expostos a MS-222 tamponada apresentou movimentos operculares rápidos.

Ainda existem outros anestésicos possíveis para o uso em peixes, tais como a benzocaína, eugenol, isoeugenol, óleo de cravo, metomidato, 2-fenoxietanol, quinaldina e quinaldina-sulfato, ainda podendo ser usados os anti-inflamatórios não-esteroidais, como o cetoprofeno e o carprofeno.

A benzocaína ou benzocaína hidroclorada, é uma solução de imersão, que deve ser preparada em concentrações > 250mg/L, deve ser tamponada (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2013).

O metomidato é um não barbitúrico hipnótico que ativa e modula a inibição do receptor da gama-aminobutírico (GABA) tipo A, é um sedativo de uso humano e veterinário. Os efeitos deletérios nos peixes são redução da respiração e circulação, e subsequente hipóxia e diminuição do pH no sangue. A 2-fenoxietanol é comumente usada em vacinas, produtos para a pele e perfumes, o modo preciso para uso em peixes não é conhecido, mas pode envolver a membrana das células neuronais (SNEDDON, 2012).

O eugenol e o isoeugenol são componentes do óleo de cravo, esse componente inibe os canais de sódio, de potássio e de cálcio, causa depressão do sistema cardiovascular, reduz a pressão sanguínea e aumenta as catecolaminas do plasma sanguíneo, indicando uma resposta ao estresse pelo uso desse anestésico (HILL; FORSTER, 2004). A concentração proposta depende de vários fatores, mas deve ser abaixo de 17mg/L, e altas concentrações podem eutanasiar. Deve-se deixar o animal no mínimo dez minutos em solução até que o cessar dos movimentos operculares. Esses componentes são carcinogênicos de acordo com o *National Toxicology Program* (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2013). Assim esses componentes podem afetar a saúde humana, devendo ser manuseados com parcimônia por pessoal capacitado.

Wong *et al.* (2014) observaram que o zebrafish evitavam o contato com o MS-222, porém acharam menor evidencia dessa aversão na exposição com o metomidato e com o óleo de cravo, sugerindo que esses agentes são menos aversivos para o zebrafish. Além do mais, os autores também sugeriram que a exposição ao MS-222 causou aumento de ansiedade.

Keene *et al.* (1998) sugeriram que o eugenol é mais eficiente devido a sua alta solubilidade, resultando em rápida indução mesmo usando baixa concentração. Sladky *et al.* (2001) especularam que as propriedades do óleo de cravo cobrem as brânquias e consequentemente prolonga os efeitos da anestesia.

Em relação aos custos, o MS-222 é inferior ao do metomidato, porém o custo de MS-222 é maior quando requerido em alta concentração (WONG *et al.*, 2014). Ao fim, os autores concluíram que metomidato e óleo de cravo são métodos alternativos recomendados para eutanásia de zebrafish.

Finalmente, a analgesia é um importante método para a eutanásia de zebrafish, como meio de redução de dor e para promover o bem-estar dos animais, o que permite a realização de experimentos de forma humanitária.

4.3 Eutanásia

A morte deve ser confirmada por observação da cessação dos sinais vitais do animal. A eutanásia é realizada por três mecanismos básicos: hipóxia, depressão dos neurônios e ruptura física da atividade cerebral (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2013). Segundo Brasil (2013), a eutanásia de peixes deve ser realizada em duas etapas: anestesia até a perda do equilíbrio; e seguido de um método físico ou químico que cause a morte cerebral.

A eutanásia pode suceder pelo excesso de MS-222, um anestésico muito comum em eutanásia de zebrafish, por hipóxia (MATTHEWS; VARGA, 2012). Pode ocorrer por imersão em nitrogênio líquido (WESTERFIELD, 2000), essa técnica é necessária, por exemplo, para isolamento do RNA e outras preparações que preservem o material biológico da rápida degradação.

Outro método é pelo uso do dióxido de carbono, porém este age lentamente e é estressante para o peixe. No Canadá, o *Canadian Council on Animal Care* não aceita o método com dióxido de carbono em eutanásia (MATTHEWS; VARGA, 2012).

De forma geral, os métodos físicos devem ser complementares a outros métodos e podem ser usados apenas se os animais se apresentarem inconscientes. A decapitação seguida de mielotomia e antecedida de anestesia, e deve ser realizada com lâmina afiada (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2013), e é aceita com restrições, deve ter interferência comprovada da anestesia (BRASIL, 2013).

O congelamento rápido não é um método aceito, pois causa dor e sofrimento, só é aceito quando os animais já estiverem anestesiados e, por conseguinte, inconscientes (BRASIL, 2013). Porém, existe a imobilização de zebrafish adulto em submersão no gelo seguida de maceração do crânio causa destruição de todo o crânio. Ainda, o choque hipotérmico ou congelamento rápido, pode ser aplicado em adulto, larvas e embriões, ao contrário da maceração que só é possível em adultos pelo tamanho. Em adultos, o choque hipotérmico é mais efetivo do que a overdose por MS-222, e é rápido, porém os tecidos contêm formação de cristais de gelo (WILSON; BUNTE; CARTY, 2009). No entanto, no choque hipotérmico deve-se levar em consideração que quando a temperatura muda, o zebrafish não consegue manter sua temperatura corporal, gerando um estresse térmico.

As práticas que utilizam os animais para verificar os benefícios na saúde humana devem ser melhores avaliadas (BAEDER *et al.*, 2012). Para tanto é necessário não só considerar os preceitos éticos da experimentação animal, como também considerar o animal

como um todo, levando em consideração seu bem-estar, sua sanidade física e mental e que a sua morte seja a menos dolorosa e angustiante possível. Assim, devem-se considerar fundamentais os métodos de anestesia e eutanásia na condução e nos protocolos de experimentos com o zebrafish.

5 CONCLUSÕES

O propósito do uso de modelo animal é compreender uma determinada doença sem causar risco a um ser humano. Ainda que os ensaios de cultivos de células *in vitro* sejam amplamente usados, os resultados podem não gerar previsões reais se comparados com resultados *in vivo*.

O uso de experimentação animal ainda se faz necessário. Os custos de pesquisa são altos e o tempo é dispendioso, especialmente em mamíferos, por isso tem se buscado novos modelos de experimentação animal, tais como invertebrados e peixes. Entre as classes de mamíferos e de peixes ainda tem mais três classes separando-as, levando a pensar que não tem relação uma com a outra, porém muitos estudos mostram que esse pensamento é errôneo e que os perfis de mamíferos e peixes tem muita similaridade, especialmente em termos de genética e de mecanismos celulares.

Com a busca de novos modelos experimentais para reduzir, refinar e substituir o uso de modelos animais achou-se o zebrafish, dentre tantas qualidades desse modelo experimental, a utilidade dessa espécie tem se destacado na pesquisa biomédica seja pelo seu genoma próximo ao do ser humano, embrião extracorpóreo, desenvolvimento rápido, fisiologia complexa, órgãos facilmente acessados, modelo de espaço/custo eficiente, tamanho pequeno e são animais altamente sociáveis, tudo isso tem aumentado significativamente o uso dele no mundo.

Por isso o zebrafish emerge como um modelo importante para a pesquisa biomédica. Em especial, a embriologia do *Danio rerio* permite analisar inúmeros pontos, desde a determinação do desenvolvimento da toxicidade até funções genéticas e fisiológicas. A utilização de adultos e larvas dessa espécie em neurociência aumentou acentuadamente nas últimas décadas por sua homologia fisiológica e genética com os humanos, além disso, é facilmente manipulado geneticamente e o sistema nervoso central (SNC) tem morfologia semelhante.

Tantos pontos colocam o zebrafish como modelo animal de grande importância, porém ainda há muito que descobrir sobre essa espécie, e melhorar em anestesia e eutanásia. Para avançar ainda mais na pesquisa com o *Danio rerio* é necessário ainda mais esforços para que novas informações possam fluir para a compreensão da pesquisa biomédica aliada com o uso do zebrafish.

REFERÊNCIAS

- ALMAIDA-PAGÁN, P. F.; LUCAS-SÁNCHEZ, A.; TOCHER, D. R. Changes in mitochondrial membrane composition and oxidative status during rapid growth, maturation and aging in zebrafish, *Danio rerio*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1841, n. 7, p. 1003-1011, July 2014.
- ARSLAN-ERGUL, A.; ADAMS, M. M. Gene expression changes in aging zebrafish (*Danio rerio*) brains are sexually dimorphic. **BMC Neuroscience**, London, v. 15, n. 29, Feb 2014.
- ASNANI, A.; PETERSON, R. T. The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease. **The Company of Biologists**, Cambridge, v. 7, n. 7, p. 763-767, July 2014.
- BAEDER, F. M.; PADOVANI, M. C. R. L.; MORENO, D. C. A. *et al.* Percepção histórica da bioética na pesquisa com animais: possibilidades. **Revista Bioethikos**, Fortaleza, v. 6, n. 3, p. 313-320, jul. 2012.
- BAKULSKI, K. M.; ROZEK, L. S.; DOLINOY, D. C. *et al.* Alzheimer's disease and environmental exposure to lead: the epidemiologic evidence and potential role of epigenetics. **Current Alzheimer Research**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. 563-573, June 2012.
- BEIS, D.; STRAINIER, D. Y. R. *In vivo* cell biology: following the zebrafish trend. **Trends in Cell Biology**, Chicago, v. 16, n. 2, p. 105-112, Feb 2006.
- BLASER, R. E.; VIRA, D. G. Experiments on learning in zebrafish (*Danio rerio*): a promising model of neurocognitive function. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, New York, v. 42, p. 224-231, May 2014.
- BRASIL. Diário Oficial da União, página 9, seção 1, de 26 de setembro de 2013. Disponível em <http://www.jusbrasil.com.br/diarios/59577086/dou-secao-1-26-09-2013-pg-9>. Acesso em: 17 jul. 2014.
- BRASIL. Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2008/lei/111794.htm. Acesso em: 14 jul. 2014.
- BRAUNBECK, T.; BÖTTCHER, M.; HOLLERT, H. *et al.* Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species – an update. **Altex – Alternative to Animal Experimentation**, Kuesnacht, v. 22, n. 2, p. 87-102, 2005.
- BUSKE, C.; GERLAI, R. Early embryonic ethanol exposure impairs shoaling and the dopaminergic and serotonergic systems in adult zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, New York, v. 33, n. 6, p. 698-707, Nov-Dec 2011.
- CAHILL, G. M. Clock mechanisms in zebrafish. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 309, n. 1, p. 27-34, July 2002.

- CANAVELLO, P. R.; CACHAT, J. M.; ELKHAYAT, S. I. *et al.* Video-aided analysis of zebrafish locomotion and anxiety-related behavioral responses, 2010. Disponível em: <<http://www.kaluefflab.com/pdfs/chapters/ZFishVideoTrackingProtocol.pdf>>. Acesso em: 14 jul. 2014.
- CHEN, J.; CHEN, Y.; LIU, W. *et al.* Developmental lead acetate exposure induces embryonic toxicity and memory deficit in adult zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, New York, v. 34, n. 6, p. 581-586, Nov-Dec 2012.
- CHOI, W.; GEMBERLING, M.; WANG, J. *et al.* *In vivo* monitoring of cardiomyocyte proliferation to identify chemical modifiers of heart regeneration. **Development**, Cambridge, v. 140, n. 3, p. 660-666, Feb 2013.
- COLWILL, R. M.; RAYMOND, M. P.; FERREIRA, L. *et al.* Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Processes**, Amsterdam, v. 70, n. 1, p. 19-31, Aug 2005.
- CRISSIUMA, A. L.; ALMEIDA, E. C. P. Experimentação e bem estar animal – artigo de revisão. **Saúde & Ambiente em Revista**. Duque de Caxias, v. 1, n. 2, p. 1-10, jul.-dez. 2006.
- CROSIERS, D.; CEULEMANS, B.; MEEUS, B. *et al.* Juvenile dystonia-parkinsonism and dementia caused by a novel *ATP13A2* frameshift mutation. **Parkinsonism and Related Disorders**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 135-138, Feb 2011.
- DAMMSKY, A. P.; MÜLLER, B. R.; GAYA, C. *et al.* Zebrafish: manual de criação em biotério. Curitiba: **Universidade Federal do Paraná**, 2011. 105 p.
- DE ESCH, C.; SLIEKER, R.; WOLTERBEEK, A. *et al.* Zebrafish as potential model for development neurotoxicity testing: a mini review. **Neurotoxicology and Teratology**, New York, v. 34, n. 6, p. 545-553, Nov-Dec 2012.
- DE LA POMPA, J. L.; EPSTEIN, J. A. Coordinating tissue interactions: notch signaling in cardiac development and disease. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 22, n. 2, p. 244-254, Feb 2012.
- DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: a review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2013. No prelo.
- DREW, R. E.; SETTLES, M.; CHURCHILL, E. J. *et al.* Brain transcriptome variation among behaviorally distincy strains of zebrafish (*Danio rerio*). **BMC Genomics**, London, v. 13, n. 323, 13 p., July 2012.
- EGAN, R. J.; BERGNER, C. L.; HART, P. C. *et al.* Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 205, n. 1, p. 38-44, Dec 2009.
- ENGESZER, R. E.; PATTERSON, L. B.; RAO, A. A. *et al.* Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, Larchmont, v. 4, n. 1, p. 21-40, Spring 2007.

- ENGESZER, R. E.; RYAN, M. J.; PARICHY, D. M. Learned social preference in zebrafish. **Current Biology**, Cambridge, v. 14, n. 10, p. 881-884, May 2004.
- GARUTTI, S.; PALMA, B. Experimentação científica com animais: considerações sobre os comitês de ética. **Revista de História Comparada**. Rio de Janeiro, v. 4, n. 2, p. 107-124, dez. 2010.
- GERHARD, G. S. Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. **Experimental Gerontology**, Oxford, v. 38, n. 11-12, p. 1333-1341, Nov-Dec 2003.
- GERHARD, G. S. Small laboratory fish as models for aging research. **Ageing Research Reviews**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 64-72, May 2007.
- GERHARD, G. S.; KAUFFMAN, E. J.; WANG, X. *et al.* Life spans and senescent phenotypes in two strains of zebrafish (*Danio rerio*). **Experimental Gerontology**, Oxford, v. 37, n. 8-9, p. 1055-1068, Aug-Sep 2002.
- GERLACH, G. Pheromonal regulation of reproductive success in female zebrafish: female suppression and male enhancement. **Animal Behaviour**, Cambridge, v. 72, n. 5, p. 1119-1124, Nov 2006.
- GERLACH, G.; LYSIAK, N. Kin recognition and inbreeding avoidance in zebrafish, *Danio rerio*, is based on phenotype matching. **Animal Behaviour**, Cambridge, v. 71, n. 6, p. 1371-1377, June 2006.
- GERLAI, R. Social behavior of zebrafish: from synthetic images to biological mechanisms of shoaling. **Journal of Neuroscience Methods**, 2014. No prelo.
- GERLAI, R.; LAHAV, M.; GUO, S. *et al.* Drinks like a fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Phoenix, v. 67, n. 4, p. 773-782, Dec 2000.
- GODOY, L. C. Desenvolvimento de protocolo para criopreservação de folículos ovarianos de peixes usando vitrificação. 2012. 99 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre. 2012.
- GOESSLING, W.; NORTH, T. E. Repairing quite swimmingly: advances in regenerative medicine using zebrafish. **The Company of Biologists**, Cambridge, v. 7, n. 7, p. 769-776, July 2014.
- GRUNWALD, D. J.; EISEN, J. S. Headwaters of the zebrafish – emergence of a new model vertebrate. **Nature Reviews**, London, v. 3, n. 9, p. 717-724, Sep 2002.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. **Guidelines for the euthanasia of animals**. Schaumburg, 2013. Disponível em: <<https://www.avma.org/kb/policies/documents/euthanasia.pdf>> Acesso em: 15 jul. 2014.
- HAN, Y.; ZHANG, J.; QIAN, J. *et al.* Cardiotoxicity evaluation of anthracyclines in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Applied Toxicology**, 2014. No prelo.

- HILL, J. V.; FORSTER, M. E. Cardiovascular responses of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during rapid anaesthetic induction and recovery. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, New York, v. 137, n. 2, p. 167-177, Feb 2004.
- HOWE, K.; CLARK, M. D.; TORROJA, C. F. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, London, v. 496, n. 7446, p. 498-503, Apr 2013.
- INNESS, C. L. W.; METCALFE, N. B. The impact of dietary restriction, intermittent feeding and compensatory growth on reproductive investment and lifespan in a short-lived fish. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, London, v. 275, n. 1644, p. 1703-1708, Aug 2008.
- JIA, J.; FERNANDES, Y.; GERLAI, R. Short-term memory in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 270, n. 29, p. 29-36, Aug 2014.
- JOHNSTON, I. A.; LEE, H. T.; MACQUEEN, D. J. *et al.* Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: genome-wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 212, n. 12, p. 1781-1793, June 2009.
- KALUEFF, A. V.; ECHEVARRIA, D. J.; STEWART, A. M. Gaining translational momentum: more zebrafish models for neuroscience research. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 2014. No prelo.
- KALUEFF, A. V.; GEBHARDT, M.; STEWART, A. M. *et al.* Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, Larchmont, v. 10, n. 1, p. 70-86, Mar 2013.
- KALUEFF, A. V.; STEWART A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 63-75. Feb 2014b.
- KALUEFF, A. V.; WHEATON, M.; MURPHY, D. L. What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 179, n. 1, p. 1-18, Apr 2007.
- LANTZ-MCPEAK, S.; GUO, X.; CUEVAS, E. *et al.* Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos. **Journal of Applied Toxicology**, Philadelphia, 2014. No prelo.
- LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. **Aquaculture**, New York, v. 269, n. 1-4, p. 1-20, Sep 2007.
- LAWRENCE, C.; BEST, J.; JAMES, A. *et al.* The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquaculture**, New York, v. 368-369, p. 103-108, Nov 2012.

LEE, J.; FREEMAN, J. L. Zebrafish as a model for investigating developmental lead (Pb) neurotoxicity as a risk factor in adult neurodegenerative disease: a mini-review. **NeuroToxicology**, 2014. No prelo.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews**, London, v. 8, n. 5, p. 353-367, May 2007.

LOPES DA FONSECA, T.; CORREIA, A.; HASSELAAR, W. *et al.* The zebrafish homologue of Parkinson's disease *ATP13A2* is essential for embryonic survival. **Brain Research Bulletin**, Phoenix, v. 90, p. 118-126, Jan 2013.

LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 91-104, Mar 2011.

MAASWINKEL, H.; ZHU, L.; WENG, W. Assessing social engagement in heterogeneous groups of zebrafish: a new paradigm for autism-like behavioral responses. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 10, 11 p., Oct 2013.

MAHABIR, S.; CHATTERJEE, D.; BUSKE, C. *et al.* Maturation of shoaling in two zebrafish strains: a behavioral and neurochemical analysis. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 247, p. 1-8, June 2013.

MALAFOGLIA, V.; BRYANT, B.; RAFFAELI, W. *et al.* The zebrafish as a model for nociception studies. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 228, n. 10, p. 1956-1966, Oct 2013.

MATTHEWS, M.; TREVARROW, B.; MATTHEWS, J. A virtual tour of the guide for zebrafish users. **Lab Animal**, New York, v. 31, n. 3, p. 34-40, Mar 2002.

MATTHEWS, M.; VARGA, Z. M. Anesthesia and euthanasia in zebrafish. **ILAR Journal**, Washington, v. 53, n. 2, p. 192-204, 2012.

MCCLURE, M. M.; MCINTYRE, P. B.; MCCUNE, A. R. Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 69, n. 2, p. 553-570, July 2006.

MEDICAL advances and animal research: the contribution of animal science to the medical revolution: some case histories. Carmarthen: RDS, 2007. Disponível em: <<http://www.understandinganimalresearch.org.uk/resources/>> Acesso em: 15 jul 2014.

MEUNIER, R. Stages in the development of a model organism as a platform for mechanistic models in developmental biology: zebrafish, 1970-2000. **Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 522-531, June 2012.

MINAGAWA, C. Y. Estudo microbiológico fecal de linhagens de camundongo, de estirpes de *E. coli* e do meio ambiente em biotérios. 2007. 108 p. Tese de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, **Universidade de São Paulo**, São Paulo. 2007.

MISHRA, S.; GUAN, J.; PLOVIE, E. *et al.* Human amyloidogenic light chain proteins result in cardiac dysfunction, cell death, and early mortality in zebrafish. **American Journal of**

Physiology – Heart and Circulatory Physiology, Bethesda, v. 305, n. 1, p. H95-H103, July 2013.

MOLENTO, C. F. M. **Bem-estar animal no ensino e na pesquisa**. [S.l.:s.n., 2008]. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/36743/1/AAC-Bem-estar.pdf>> Acesso: 15 jul. 2014.

OKAMOTO, H.; AGETSUMA, M.; AIZAWA, H. Genetic dissection of the zebrafish habenula, a possible switching board for selection of behavioral strategy to cope with fear and anxiety. **Developmental Neurobiology**, Hoboken, v. 72, n. 3, p. 386-394, Mar 2012.

PAIXÃO, R. L. **As Comissões de Ética no uso de animais**. [S.l.:s.n., 2004?] Disponível em: <<http://www2.ufersa.edu.br/portal/view/uploads/setores/218/As%20Comiss%C3%B5es%20de%20%C3%89tica%20no%20uso%20de%20animais.pdf>>. Acesso em: 14 jul. 2014.

PARKER, M. O.; ANNAN, L. V.; KANELLOPOULOS, A. H. *et al.* The utility of zebrafish to study the mechanisms by which ethanol affects social behavior and anxiety during early brain development. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 2014. No prelo.

PITTMAN, J. T.; ICHIKAWA, K. M. iPhone® applications as versatile video tracking tools to analyze behavior in zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Phoenix, v. 106, p. 137-142, May 2013.

POPOVIC, N. T.; STRUNJAK-PEROVIC, I.; COZ-RAKOVAC, R. *et al.* Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. **Journal of Applied Ichthyology**, Hamburg, v. 28, n. 4, p. 553-564, Aug 2012.

POSS, K. D.; WILSON, L. G.; KEATING, M. T. Heart regeneration in zebrafish. **Science**, Washington, v. 298, n. 5601, p. 2188-2190, Dec 2002.

PRITCHARD, V. L.; LAWRENCE, J.; BUTLIN, R. K. *et al.* Shoal choice in zebrafish, *Danio rerio*: the influence of shoal size and activity. **Animal Behaviour**, Cambridge, v. 62, n. 6, p. 1085-1088, Dec 2001.

READMAN, G. D.; OWEN, S. F.; MURRELL, J. C. *et al.* Do fish perceive anaesthetics as aversive? **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 9, 7 p., Sep 2013.

REED, B.; JENNINGS, M. **Guidance on the housing and care of zebrafish (*Danio rerio*)**. Research Animals Department, Science Group, RSPCA, West Sussex, 2010. 62 p.

RICCI, L.; SUMMERS, C. H.; LARSON, E. T. *et al.* Development of aggressive phenotypes in zebrafish: interactions of age, experience and social status. **Animal Behaviour**, San Francisco, v. 86, n. 2, p. 245-252, Aug 2013.

ROSE, J. D.; ARLINGHAUS, R.; COOKE, S. J. *et al.* Can fish really feel pain? **Fish and Fisheries**, London, v. 15, n. 1, p. 97-133, Dec 2012.

SNEDDON, L. U. Clinical anesthesia and analgesia in fish. **Journal of Exotic Pet Medicine**, New York, v. 21, n. 1, p. 32-43, Jan 2012.

SÖFFKER, M.; STEVENS, J. R.; TYLER, C. R. Comparative breeding and behavioral responses to ethinylestradiol exposure in wild and laboratory maintained zebrafish (*Danio rerio*) populations. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 46, n. 20, p. 11377-11383, Oct 2012.

SPEEDIE, N.; GERLAI, R. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 188, n. 1, p. 168-177, Mar 2008.

SPENCE, R.; FATEMA, M. K.; ELLIS, S. *et al.* Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. **Journal of Fish Biology**, London, v. 71, n. 1, p. 304-309, July 2007.

SPENCE, R.; FATEMA, M. K.; REICHARD, M. *et al.* The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. **Journal of Fish Biology**, London, v. 69, n. 5, p. 1435-1448, Nov 2006.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C. *et al.* The behavior and ecology of the zebrafish *Danio rerio*. **Biological Reviews**, London, v. 83, n. 1, p. 13-34, Feb 2008.

SPENCE, R.; SMITH, C. Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. **Animal Behaviour**, Cambridge, v. 69, n. 6, p. 1317-1323, June 2005.

SPITSBERGEN, J. M.; KENT, M. L. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research – advantages and current limitations. **Toxicologic Pathology**, Newark, v. 31 (Suppl.), p. 62-87, Jan-Feb 2003.

STEWART, A. M.; BRAUBACH, O.; SPITSBERGEN, J. *et al.* Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, Amsterdam, v. 37, n. 5, p. 264-278, May 2014.

STEWART, A. M.; NGUYEN, M.; WONG, K. *et al.* Developing zebrafish models of autism spectrum disorder (ASD). **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, Oxford, v. 50, p. 27-36, Apr 2014b.

STEWART, A.; WU, N.; CACHAT, J. *et al.* Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 1421-1431, Aug 2011.

ULLMANN, J. F. P.; COWIN, G.; KURNIAWAN, N. D. *et al.* A three-dimensional digital atlas of the zebrafish brain. **NeuroImage**, Orlando, v. 51, n. 1, p. 76-82, May 2010.

ULLOA, P. E.; ITURRA, P.; NEIRA, R. *et al.* Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 21, p. 649-666, Feb 2011.

USA. Department of Agriculture. **Public Law 89-544**: Act of August 24, 1966. Maryland, 1966. Disponível em: < <http://awic.nal.usda.gov/public-law-89-544-act-august-24-1966>> Acesso: 15 jul. 2014.

VAN DER BRANDHOF, E.; MONTFORTS, M. Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, n. 8, p. 1862-1866, Nov 2010.

VIGNET, C.; BÉGOUT, M.; PÉAN, S. *et al.* Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. **Zebrafish**, Larchmont, v. 10, n. 3, p. 365-375, Sep 2013.

WESTERFIELD, M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4 ed., **University of Oregon**, Eugene. 2000.

WILLIAMS, F. E.; WHITE, D.; MESSER JR., W. S. A simple spatial alternation task for assessing memory function in zebrafish. **Behavioural Processes**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 125-132, June 2002.

WILSON, J. M.; BUNTE, R. M.; CARTY, A. J. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, Memphis, v. 48, n. 6, p. 785-789, Nov 2009.

WONG, D.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; RICHARDS, J. G. *et al.* Conditioned place avoidance of zebrafish (*Danio rerio*) to three chemicals used for euthanasia and anaesthesia. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 2, 6 p., Feb 2014.

YANG, L.; HO, N. Y.; ALSHUT, R. *et al.* Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v. 28, n. 2, p. 245-253, Sep 2009.

ZHAO, L.; BORIKOVA, A. L.; BEN-YAIR, R. *et al.* Notch signaling regulates cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration. **PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 111, n. 4, p. 1403-1408, Jan 2014.

ZIV, L.; MUTO, A.; SCHOONHEIM, P. J. *et al.* An affective disorder in zebrafish with mutation of the glucocorticoid receptor. **Molecular Psychiatry**, Houndmills, v. 18, n. 6, p. 681-691, June 2013.