



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II**

Cláudio de Oliveira

**USO DE PEIXE-ZEBRA COMO MODELO ANIMAL PARA ESTUDOS DE
INTERVENÇÃO E PATOGENICIDADE**

Florianópolis, SC
2023

CLÁUDIO DE OLIVEIRA

**USO DE PEIXE-ZEBRA COMO MODELO ANIMAL PARA ESTUDOS DE
INTERVENÇÃO E PATOGENICIDADE**

Trabalho Conclusão de Curso
apresentado na Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito parcial
para a conclusão do Curso de Farmácia.

Orientadora: Izabel Galhardo Demarchi
Co-orientadora: Beatriz Garcia Mendes
Borba

Florianópolis, SC
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Oliveira, Cláudio
USO DE PEIXE-ZEBRA COMO MODELO ANIMAL PARA ESTUDOS DE
INTERVENÇÃO E PATOGENICIDADE: UMA REVISÃO NARRATIVA /
Cláudio de Oliveira ; orientadora, Izabel Galhardo
Demarchi, coorientadora, Beatriz Garcia Mendes Borba,
2023.
67 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Peixe-zebra. 3. modelo animal. 4.
Toxicidade. 5. câncer. I. Galhardo Demarchi, Izabel . II.
Garcia Mendes Borba, Beatriz . III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

CLÁUDIO DE OLIVEIRA

**USO DE PEIXE-ZEBRA COMO MODELO ANIMAL PARA ESTUDOS DE
INTERVENÇÃO E PATOGENICIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina como requisito necessário para a conclusão do curso de graduação em Farmácia.

Florianópolis, 20 de junho de 2023.

Prof, Dr. Jairo Ivo dos Santos
Coordenação do Curso

BANCA EXAMINADORA

Profa., Dra. Izabel Galhardo Demarchi
Orientadora

Prof, Dr. Jairo Ivo dos Santos
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Doutoranda PgFAR UFSC Paula Giarola Fragoso de Oliveira
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Dedico este trabalho a minha avó Sovenir, que não está mais entre nós. A mim pela minha trajetória e a todas as pessoas que mesmo com dificuldades lutam pelos seus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu amado esposo e amigo, Richer Ravier Joaquim, a minha infinita gratidão, por tornar este sonho possível, e por insistir em mim mesmo quando tinha vontade de desistir.

A minha orientadora Izabel Galhardo Demarchi, que orientou tão bem esse trabalho, pela sinceridade, paciência, confiança e por estar sempre ao meu lado acreditando no meu potencial, tendo sempre uma palavra de conforto e incentivo. Obrigado pela paciência maravilhosa.

A Professora Maria Inês da disciplina de patologia, que me emprestou/cedeu um *notebook* na pandemia para que eu pudesse realizar as atividades. Este notebook que utilizei para produzir este meu trabalho.

O farmacêutico Flávio Blumberg, o professor Filipe Carvalho Matheus e a professora Marina Reijche Mattozo Rover, que foram solícitos na reta final da graduação.

Obrigado.

"The purpose of human life is to serve, and to show compassion and the will to help others."

(Albert Schweitzer)

RESUMO

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um teleósteo de pequeno porte (3 a 5 cm) de água doce, e que apresenta uma alta conservação da função gênica, contendo entre 70 a 80% de genes homólogos aos humanos. Em 1980, o peixe-zebra foi introduzido no cenário científico como modelo de experimentação, destacando-se nos últimos anos, pelas suas características de translucidez que facilita a observação de alterações morfológicas, são de fácil obtenção, reprodução e manipulação, facilitando a triagem de alto rendimento em ensaios pré-clínicos *in vivo*. Recentemente, inúmeros estudos têm sido conduzidos em peixe-zebra como modelo experimental para a pesquisa de novos fármacos e mecanismos patológicos. Nesta revisão narrativa de literatura, o objetivo foi contextualizar o uso do peixe-zebra como modelo de experimentação animal para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos, assim como, modelo de patogenicidade. Para isso, estudos originais, primários e secundários foram recuperados nas bases de dados PubMed (principal), LILACs, Scielo e Google Acadêmico com o descritor principal “zebrafish” ou “peixe-zebra”. Os resultados foram sintetizados de forma narrativa contextualizando os estudos de acordo com a aplicabilidade, intervenção e patogenicidade. O peixe-zebra é um modelo animal capaz de reproduzir fenótipos típicos de doenças, como as cardiovasculares e neoplasias, possibilitando estudar alterações genéticas e outras associadas a doenças humanas. Ainda, esse modelo é amplamente utilizado para verificar a toxicidade do ambiente, como poluentes e outros compostos na água. Em relação aos testes de intervenção para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, ele tem sido utilizado para verificar a citotoxicidade, genotoxicidade, neurotoxicidade, entre outros. Destaca-se também que as alterações e identificações epigenéticas têm facilitado o estudo de genes associados ao câncer e às doenças cardiovasculares. A maioria dos estudos encontrados e sintetizados nessa revisão estavam relacionados a pesquisa de ecotoxicidade e toxicidade para cânceres. O uso do peixe-zebra tem sido útil nas abordagens terapêuticas e desenvolvimento de novos fármacos com eficiência e segurança para estudos pré-clínicos.

Palavras-Chave: peixe-zebra, modelo animal, ecologia, meio ambiente, câncer, toxicidade.

ABSTRACT

The zebrafish (*Danio rerio*) is a small teleost (3 to 5 cm) from freshwater, which presents a high conservation of gene function, containing between 70 and 80% of genes homologous to humans. In 1980, the zebrafish was introduced into the scientific scenario as a model for experimentation, standing out in recent years for its translucency characteristics that facilitate the observation of morphological changes, they are easy to obtain, reproduce and manipulate. Facilitating high-throughput screening in vivo preclinical trials. Recently, numerous studies have been conducted on zebrafish as an experimental model for researching new drugs and pathological mechanisms. In this literature narrative review, the objective was to contextualize the use of zebrafish as a model of animal experimentation for research and development of drugs, as well as a model of pathogenicity. For this, original, primary, and secondary studies were retrieved from PubMed (main), LILACs, Scielo, and Google Scholar databases with the main descriptor “zebrafish” or “peixe-zebra”. The results were synthesized in a narrative way, contextualizing the studies according to applicability, intervention, and pathogenicity. The zebrafish is an animal model capable of reproducing typical phenotypes of diseases, such as cardiovascular and neoplasms, making it possible to study genetic alterations and others associated with human diseases. Still, this model is widely used to check the toxicity of the environment, such as pollutants and other compounds in water. Regarding intervention tests for research and development of new drugs, it has been used to verify cytotoxicity, genotoxicity, and neurotoxicity, among others. It is also noteworthy that epigenetic alterations and identifications have facilitated the study of genes associated with cancer and cardiovascular diseases. The use of zebrafish has been useful in therapeutic approaches and the development of new drugs with efficiency and safety for preclinical studies.

Keyword: zebrafish, animal model, ecology, environment, neoplasm, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelos animais usados em laboratório e as principais aplicações para o estudo de doenças humanas.....	12
Figura 2 – Peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>) - Vulgo Paulistinha.....	14
Figura 3 – Busca na literatura com o termo ‘zebrafish’ na base de dados Pubmed..	18
Figura 4 – Órgãos e tecidos correspondentes em humanos (A) e larvas (B) e adultos (C) do peixe-zebra.....	19
Figura 5 – Genes ortólogos compartilhados entre o genoma do peixe-zebra, humano, camundongo e galinha.....	20
Figura 6 – Vantagens do uso do peixe-zebra.....	21
Figura 7 – Esquema do procedimento de teste de toxicidade com peixe-zebra.....	23
Figura 8 – Países com o maior uso de pesticidas em 2020.....	27
Figura 9 – Principais consequências da exposição ao organofosforados em humanos.....	29
Figura 10 – Acúmulo de nanoplásticos e microplásticos em peixe-zebra.....	34
Figura 11 – Aplicação do peixe-zebra na pesquisa do câncer.....	39
Figura 12 – Características do modelo de peixe-zebra xenográfico.....	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	JUSTIFICATIVA.....	15
3	OBJETIVOS.....	16
3.1	OBJETIVO GERAL.....	16
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4	METODOLOGIA.....	17
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1	O PEIXE-ZEBRA.....	19
5.2	PEIXE-ZEBRA NO ESTUDO DA TOXICIDADE.....	22
5.2.1	Neurotoxicidade.....	23
5.2.2	Citotoxicidade.....	24
5.2.3	Ecotoxicidade e nanotoxicidade.....	25
5.3	PEIXE-ZEBRA NAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	35
5.4	PEIXE-ZEBRA NO ESTUDO DO CÂNCER.....	37
5.5	UTILIZAÇÃO DO PEIXE-ZEBRA EM OUTRAS DOENÇAS.....	44
5.5.1	Diabetes.....	44
5.5.2	Doenças oculares.....	45
5.5.3	Doenças infecciosas.....	46
5.5.4	Estresse oxidativo e inflamação.....	47
6	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52





1 INTRODUÇÃO

A experimentação animal baseia-se na utilização de animais (como porcos, ratos, coelhos, camundongos, peixes, macacos, equinos, entre outros) para a experimentação de novos fármacos, imunobiológicos ou estudo de patogenicidade dos microrganismos (Figura 1). Os modelos animais são conhecidos como modelos não humanos, escolhidos a partir de suas características para fins de experimentação, teste ou ensino (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia, NCBI, 2001). Os experimentos e cultivos são padronizados nos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento de acordo com as normas sanitárias e éticas vigentes em seus países de origem, e também por órgãos regulamentadores, como por exemplo, o *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil (BRASIL, 1999).

No Brasil, o órgão governamental responsável pela regulação da experimentação pré-clínica é o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Ministério da Ciência, Tecnologias e Inovações (MCTI) que como suas principais ações destacam-se: a formulação de normas relativas ao uso de animais em ensino e pesquisa, monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que visam substituir a utilização de animais em ensino, pesquisa e desenvolvimento. Além de credenciar e estabelecer normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO, 2020; BRASIL 2008; BRASIL 2009). A experimentação desses modelos deve ser utilizada de maneira consciente e cuidadosa, com isto, é necessário estabelecer normas para o uso e bem-estar animal, promovendo o controle e a fiscalização. No Brasil, a Lei Federal nº 11.794/08, conhecida pela Lei Arouca, sancionada em 8 de outubro de 2008, tem a função de estipular limites na realização dos experimentos e na utilização de animais nas pesquisas científicas, garantindo o mínimo de conforto e higiene nos ambientes e amparando os animais (DALBEN; EMMEL, 2013).

Figura 1. Modelos animais usados em laboratório e as principais aplicações para o estudo de doenças humanas.

Modelos animais de laboratório

 <p>Peixe-zebra</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Embriões transparentes para desenvolvimento biológico • ENU mutagênese para genética • Tecnologia CRISPR • Estatística para biologia do câncer
 <p>Xenopus</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Animal de experimentação para indução tecidual • FATE mapa de 32 células embrionárias • Construção dominante-negativa • Morfolinos
 <p>Camundongo</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Excelente genética com muitas espécies mutantes • Fisiologia para teste de função orgânica • Tumores xenógrafos (humano induzido em animal)
 <p>Macacos</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Fisiologia orgânica similar aos humanos)

Fonte: Adaptado de Zon (2016).

A utilização de animais para experimentação permitiu a evolução científica no desenvolvimento de métodos de diagnóstico, tratamento e imunização para doenças humanas e de animais. Com os modelos animais tem sido possível a identificação de mecanismos celulares e moleculares fundamentais para a compreensão da patogênese de doenças, mecanismos de ação de fármacos, descoberta de alvos

moleculares, pesquisa de toxicidade de medicamentos e outros (LIU; LOS SANTOS; PHAN, 2017).

Outra contribuição para a experimentação científica são as propostas de opções alternativas para substituição animal, o que representa um ganho substancial na ciência aliado à redução da utilização das espécies. A cultura de células é muito empregada na compreensão da patogênese das infecções (KENDALL *et al.*, 2018). Modelos de computador são usados para programação e projeção de medicamentos avaliando possíveis efeitos biológicos e tóxicos promovendo ou descartando como potencial candidato a novos fármacos (DOKE; DHAWALE, 2015). O Conselho Internacional para Harmonização (ICH) na sua diretriz para a detecção de toxicidade reprodutiva de produtos farmacêuticos usados em humanos incita o uso de ensaios *in vitro* como auxílio à identificação de potenciais riscos toxicológicos ao desenvolvimento humano (ICH, 2020).

Embora existam modelos *in vitro* para experimentação pré-clínica, a pesquisa em animais ainda é requisitada. A experimentação animal é considerada uma etapa fundamental para a liberação de fármacos ou compreensão de mecanismos patogênicos. Mas cada vez mais, os pesquisadores e desenvolvedores têm investido na redução do uso de animais em experimentação, na substituição por outros modelos e refinamento da pesquisa. Essa estratégia global é conhecida como NC3Rs (*Replacement, Reduction and Refinement*, origem no Reino Unido). Nesse sentido, muitas universidades, inclusive brasileiras, têm investido na pesquisa experimental utilizando o peixe-zebra (*zebrafish*) ao invés da utilização de camundongos, ratos ou outro mamífero não humano (UFPB, 2020).

O peixe-zebra (*Danio rerio*), vulgo paulistinha é um peixe teleósteano, tropical de água doce da família ciprinídeos (SUURVÄLI *et al.*, 2020), medindo em média 3 a 5 cm quando adulto (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012) (Figura 2). E recebeu esse nome devido às linhas pretas e brancas em suas escamas que se assemelham às listras da zebra. Esse animal é de origem asiática, geralmente oriundo da região do Himalaia, e tem sido encontrado em uma variedade de ambientes, como lavouras de arroz, lagoas, rios e córregos (PARICHY, 2015; SUURVÄLI *et al.*, 2020, OGI *et al.*, 2021), vivendo em diversos habitats, e se adaptando a uma grande variação de temperatura, qualidade da água e altitude (PARICHY; POSTLETHWAIT, 2020).

Figura 2. Peixe-zebra (*Danio rerio*) - Vulgo Paulistinha.



Fonte: UFPB, 2022.

A utilização do peixe-zebra como modelo na experimentação animal é cada vez mais abrangente. E no presente estudo, buscou-se contextualizar esse tópico a partir de uma revisão narrativa sobre as principais aplicações do peixe-zebra nas pesquisas de intervenção e patogenicidade.

2 JUSTIFICATIVA

O uso de alternativas para a experimentação animal tem sido cada vez mais requisitado no âmbito científico, uma vez que para a liberação de fármacos, em muitos países, é compulsória a eficácia e segurança pré-clínica. O uso de animais, principalmente vertebrados como camundongos e ratos em experimentação é um tema polêmico, uma vez que parte da comunidade científica é contra o uso de animais em experimentação, assim como, já foram relatados casos de maus tratos e uso desnecessário de animais. E por isso, os Comitês de Ética em Pesquisas com Animais em Experimentação estão cada vez mais criteriosos com a utilização desses modelos. Nesse contexto, novas estratégias têm sido desenvolvidas com a finalidade de reduzir esse impacto na sociedade. Uma dessas estratégias é a NC3Rs: redução, substituição e refinamento (NC3Rs) da experimentação animal, que tem se tornado muito promissora e recomendada globalmente. Os roedores, camundongos e ratos, são os modelos mais utilizados para pesquisa de novas substâncias e como modelos de doenças. Nesse sentido, o peixe-zebra tem sido considerado uma alternativa promissora para a pesquisa toxicológica e mecanicista, além de diminuir o impacto ambiental e econômico, considerando a alta taxa de reprodutibilidade do peixe-zebra, baixo custo e fácil cultivo. No Brasil e em outros países, como Reino Unido e Estados Unidos, o peixe-zebra tem sido cada vez mais utilizado nas pesquisas experimentais de intervenção e patogenicidade, como busca de novos fármacos antineoplásicos e de genes associados ao câncer, respectivamente. Tendo em vista os inúmeros estudos publicados na literatura sobre esse tema, essa revisão narrativa foi elaborada para contextualizar as aplicabilidades do peixe-zebra na experimentação animal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão narrativa sobre o uso de peixe-zebra como modelo animal para experimentação intervencionista e de patogenicidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever os principais alvos farmacológicos dos experimentos em peixe-zebra;
- Investigar os principais modelos patológicos desenvolvidos em peixe-zebra.

4 METODOLOGIA

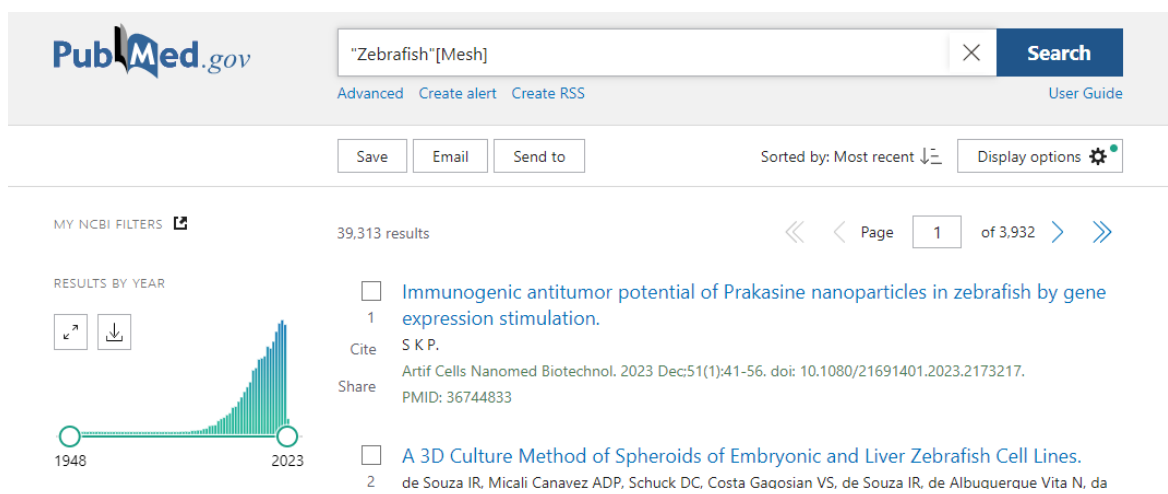
Este estudo trata-se de uma revisão narrativa da literatura. A pergunta científica foi: “Como tem sido utilizado o peixe-zebra para estudos experimentais de intervenção e patogenicidade?”. Nessa revisão, incluímos estudos primários e secundários buscados na base de dados eletrônica do PubMed (NIH dos EUA, Medline), LILACS (Bireme, via formulário iAH) utilizando o descritor exato “zebrafish” (peixe-zebra), e como termo livre no Google Acadêmico (literatura 'cinzenta'). Foram aplicados filtros para a recuperação de estudos publicados nos últimos cinco anos e sem restrição de idiomas. A seleção dos estudos foi realizada por conveniência pelos pesquisadores.

Foram recuperados artigos completos sobre o tema (revisão e artigos originais), e professores experientes na experimentação animal foram consultados para indicação de referências bibliográficas sobre o assunto. Os resultados foram sintetizados de forma narrativa contextualizando estudos de intervenção e de patogenicidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desde 1948 até os dias de hoje, a busca no Pubmed com o descritor exato 'zebrafish' resultou em 39.313 artigos recuperados, e no LILACS 58 (07 de fevereiro de 2023) (Figura 3). Em 2022, foram publicados 4.487 estudos no Pubmed com esse termo.

Figura 3. Busca na literatura com o termo 'zebrafish' na base de dados Pubmed (n= 39.313 estudos recuperados).



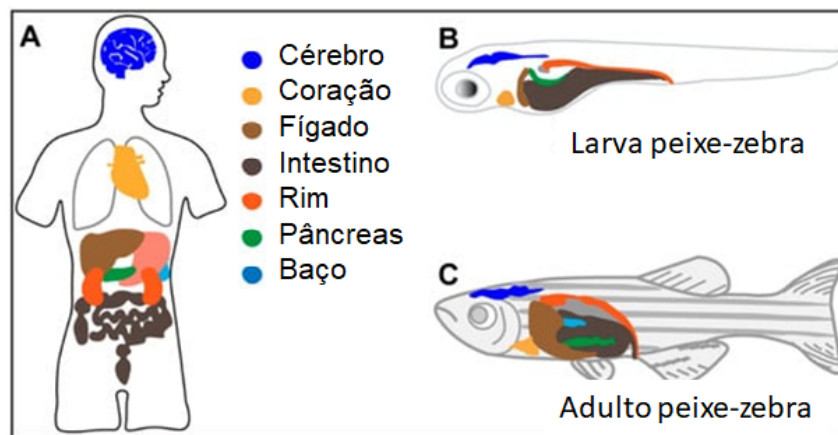
Data da busca: 27 de fevereiro de 2023. Fonte: Elaborada pelos autores.

Nesta revisão, foi selecionada a literatura relevante com base no título, informações do resumo e conteúdo completo dos artigos recuperados nos últimos cinco anos (n Pubmed= 19.939 estudos, LILACS=58 e Google=100). Os resultados foram sintetizados de acordo com a aplicabilidade do modelo. Observamos que há um grande número de estudos que investigaram o potencial de fármacos para o tratamento de cânceres e pesquisas de toxicidade de substâncias para o ambiente, sendo de grande interesse para futuros estudos clínicos e para a ecologia, respectivamente.

5.1 O PEIXE-ZEBRA

O peixe-zebra possui um sistema nervoso e neurotransmissores (FARIA *et al.*, 2022), e os sistemas imunológicos adaptativos e inatos (SARMIENTO *et al.*, 2022) similares aos humanos (Figura 4).

Figura 4. Órgãos e tecidos correspondentes em humanos (A) e larvas (B) e adultos (C) do peixe-zebra.

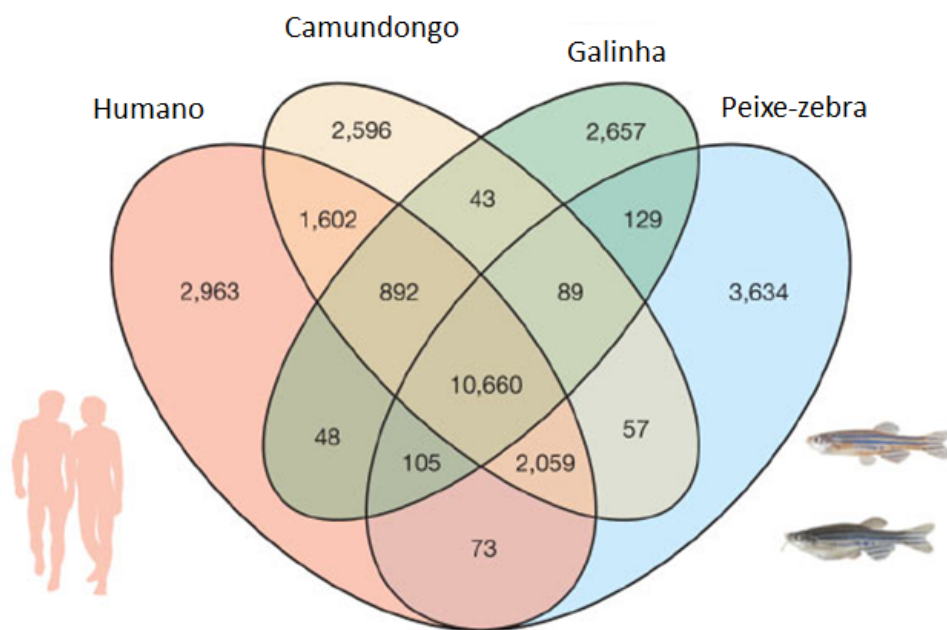


Fonte: Adaptado de Wang *et al.* (2021).

O peixe-zebra foi o primeiro animal a ser clonado em 1981 nos Estados Unidos da América (USA). Ele é um dos animais mais utilizados, após os roedores, devido à sua similaridade genética com os seres humanos. Esta espécie apresenta um genoma com 70 a 80 % de genes equivalentes ao genoma humano. Entre 70 e 82% dos genes relacionados a doenças humanas podem ter correlação com pelo menos um gene ortólogo do peixe-zebra (PAOLO *et al.*, 2021; HOWE *et al.*, 2013; ZULAZMI *et al.*, 2021). Gene ortólogo é definido como genes em espécies diferentes que surgem a partir de um único gene do ancestral comum da espécie por um processo de especiação. Os genes que divergem por especiação tendem a conservar a função, nesse caso, cada descendente possui uma cópia do gene original (MOREIRA, 2014).

Pesquisadores realizaram um estudo comparativo entre peixe-zebra, humano, camundongo e frango, visando quantificar os genes e a especificidade do genoma de cada espécie (HOWE *et al.*, 2013) (Figura 5).

Figura 5. Genes ortólogos compartilhados entre o genoma do peixe-zebra, humano, camundongo e galinha.



Fonte: Adaptado de HOWE *et al.*, (2013).

Os embriões de peixe-zebra são de fácil obtenção, reprodução e manipulação, tendo uma fecundidade de centenas desses, facilitando a triagem de alto rendimento em ensaios *in vivo* (SALEEM; KANNAN, 2018) (Figura 6). Com isto, apresentam vantagens em relação a outros modelos animais, por permitir investigar fases iniciais de desenvolvimento (SIEBEL; BONAN; SILVA, 2015). O embrião de peixe-zebra configura um organismo que abrange as vias metabólicas e outras reações fisiológicas funcionais, e isto permite avaliar a toxicidade da organogênese e o período completo de desenvolvimento em vertebrados (PAOLO *et al.*, 2021).

Figura 6. Vantagens do uso do peixe-zebra.



Adaptado de Saleem *et al.*, (2018).

O seu ovo desenvolve-se rapidamente para larva (SARMIENTO *et al.*, 2022; PAOLO *et al.*, 2021) entre 48 a 72 horas (FIOCRUZ, 2019), assim com apenas 48 horas já tem um sistema nervoso funcional (SARMIENTO *et al.*, 2022). Os embriões de peixe-zebra obtêm oxigênio por difusão passiva nos primeiros dias de desenvolvimento (VOLKOV *et al.*, 2022), e se tornam adultos aos três meses de vida (FIOCRUZ, 2019). Eles são opticamente transparentes, o que permite uma visão microscópica de estruturas e sistemas orgânicos de forma contínua em todo o processo de desenvolvimento (HOFFMANN *et al.*, 2021; SARMIENTO *et al.*, 2022; PAOLO *et al.*, 2021; FIOCRUZ, 2019).

O peixe-zebra foi inserido nas pesquisas científicas, estabelecendo-se como um modelo experimental capaz de descobrir o mecanismo de diversas patologias, identificar e testar novos alvos terapêuticos (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012). Além disso, apresenta características compatíveis com o princípio da estratégia global 3Rs (do inglês 'Replacement, Reduction and Refinement'):

- *Replacement/* Substituição: peixe-zebra oferece um modelo de menor potencial para dor; além da capacidade de substituir outros modelos de

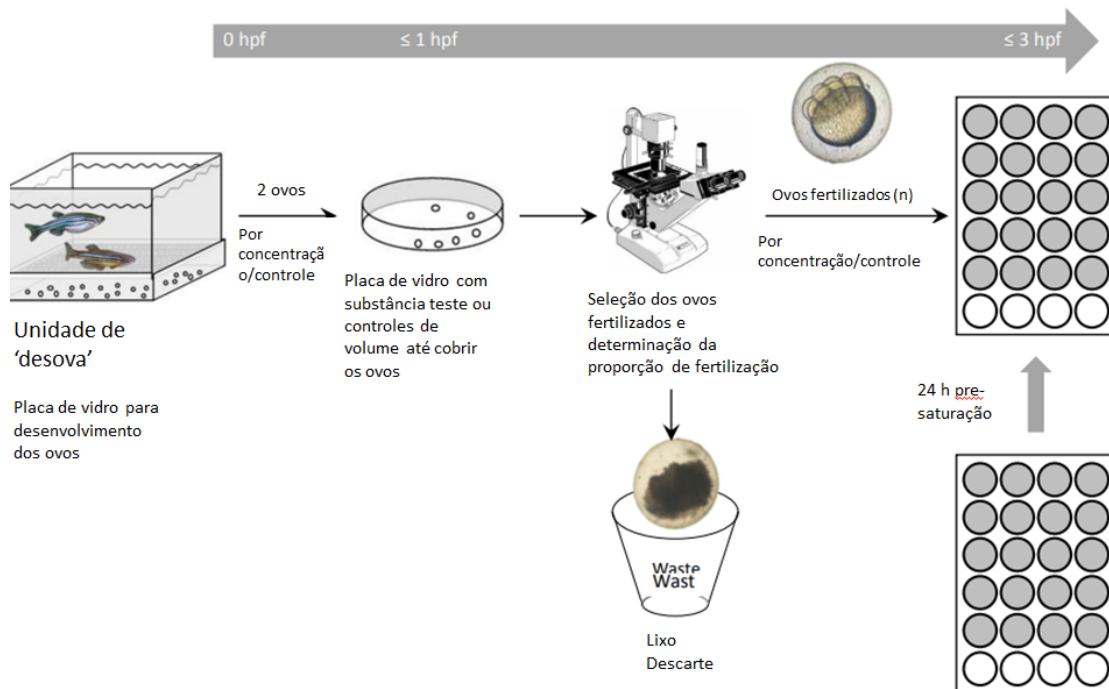
animais por serem menos invasivos. Isso inclui ensaios de larvas, que oferecem um modelo de menor potencial para dor;

- *Reduction/* Redução: seu uso reduz o número de animais em experimentação sem comprometer o bem-estar animal e é estatisticamente significativo nos resultados experimentais. Larvas de peixe-zebra, como modelo de primeira linha para toxicidade, são usadas para identificar o efeito de diferentes compostos com redução do número de animais usados em testes;
- *Refinement/* Refinar: Permite-nos encontrar novas formas de minimizar o sofrimento e a dor dos animais. Neste caso, embriões e larvas, com fecundação externa e a transparência do corpo durante o desenvolvimento, representam uma observação não invasiva válida de toxicidades (COPPOLA *et al.*, 2023).

5.2. PEIXE-ZEBRA NO ESTUDO DA TOXICIDADE

Trata-se de um sistema modelo adequado para avaliar a toxicidade de sedimentos de água doce, estuarinos e marinhos e sedimentos enriquecidos em laboratório. A toxicidade de sedimentos ligados a poluentes em peixe-zebra parece ser globalmente dependente das propriedades físicas e químicas dos poluentes, desenho experimental, fator ambiental, estágios de desenvolvimento e presença de matéria orgânica natural. No geral, os resultados mostraram que os embriões e larvas de peixe-zebra são sistemas modelo adequados para avaliar a toxicidade de poluentes associados a sedimentos (SAIKI *et al.*, 2021) (Figura 7).

Figura 7. Esquema do procedimento de teste de toxicidade com peixe-zebra.



Da esquerda para direita: produção de ovos coleta de ovos, pré-exposição imediatamente após a fertilização em recipientes de vidro, seleção de ovos fertilizados com microscópio invertido ou binóculo e distribuição de ovos fertilizados em placas de 24 poços preparadas com as respectivas concentrações/controles de teste, n = número de ovos necessários por concentração de teste/controle (~20), hpf = horas pós-fertilização. Fonte: Adaptado de OECD (2012).

5.2.1 Neurotoxicidade

A neurotoxicidade é o processo de quando ocorre a exposição a substâncias tóxicas naturais ou artificiais, como as substâncias usadas em quimioterapia, tratamento de radiação, terapias medicamentosas, transplantes de órgãos, além de exposição a metais pesados, como chumbo e mercúrio, certos alimentos e aditivos alimentares, pesticidas, solventes industriais e/ou de limpeza, cosméticos, e algumas substâncias que ocorrem naturalmente. Essas substâncias alteram a atividade normal do sistema nervoso central e/ou periférico, sendo capazes de interromper ou até matar neurônios, que são importantes para transmitir e processar sinais no cérebro e em outras partes do sistema nervoso (NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE, EUA, 2023).

Estudos têm mostrado o potencial deste animal para estudo de neurotoxicidade (PRATS *et al.*, 2017; FARIA *et al.*, 2020), uma vez que o peixe-zebra possui sistemas neurológicos semelhantes aos mamíferos (TORRES-RUIZ *et al.*, 2023). Em alguns estudos, foi empregado o teste de embriotoxicidade do peixe-zebra (ZTE) para identificar produtos químicos teratogênicos e embriotóxicos (PAOLO *et al.*, 2021; HOFFMANN *et al.*, 2021). O ZTE analisa os efeitos tóxicos das substâncias-teste referente à mortalidade e embriotoxicidade geral e específica (HOFFMANN *et al.*, 2021). Por isso, o teste ZTE tem sido visto como um método alternativo para teratogenicidade (PAOLO *et al.*, 2021), com a finalidade de prever a toxicidade do desenvolvimento humano, como um organismo que incorpora o processo de desenvolvimento embrionário, sendo um método menos limitado do que os métodos *in vitro* (PAOLO *et al.*, 2021; HOFFMANN *et al.*, 2021).

TORRES-RUIZ *et al.* (2023) investigaram a neurotoxicidade de nanoplásticos usando o modelo peixe-zebra, e quando expostos aos compostos apresentaram inervação muscular, enrolamento da cauda, hiperatividade, alterações no metabolismo de carboidratos e cortisol, e ansiedade. Mostrando que o modelo peixe-zebra é eficaz para triagem da neurotoxicidade em desenvolvimento.

5.2.2 Citotoxicidade

A citotoxicidade é a capacidade de uma substância ou processo ocasionar uma alteração metabólica nas células podendo levar à morte celular (JANEWAY *et al.*, 2001). No geral, são exemplos de citotóxicos os fármacos quimioterápicos que têm ação sobre as células vivas (HIU; YAP, 2020), e as próprias células T do sistema imunológico humano, como os linfócitos T citotóxicos, que são capazes de matar rapidamente bactérias, vírus, e células tumorais (JANEWAY *et al.*, 2001). Com isto, os estudos de citotoxicidade vem sendo utilizados para a descoberta de potenciais alvos terapêuticos, através da realização de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

As substâncias químicas necessitam ser investigadas quanto a sua segurança visando à saúde humana e ao meio ambiente. Com isto, biomarcadores moleculares e celulares cada vez mais são considerados para avaliar a segurança prevendo os efeitos em organismos vivos. Nesse contexto, linhagens de células de peixe,

principalmente do peixe-zebra são empregadas em estudos de citotoxicidade para prever a toxicidade aguda em peixes (SOUZA *et al.*, 2023).

Os ensaios de citotoxicidade estimam a viabilidade celular do peixe-zebra. Um exemplo de estudo de citotoxicidade, é o emprego de linhagens celulares de embriões (ZEM2S) e fígado (ZFL). Onde o ensaio modificado, avaliou a densidade celular na placa de 96 poços e o tempo de incubação no ensaio colorimétrico de redução do MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio). Os ensaios de MTT são ensaios de alta qualidade para identificar substâncias químicas citotóxicas. O MTT um ensaio colorimétrico, onde o composto inicialmente tem coloração amarelada, e quando na presença de células metabolicamente ativas ocorre a viragem para a coloração azul de formazan (SOUZA *et al.*, 2023 apud MOSMANN TIM, 1993; LIU *et al.*, 2002), perda de elementos fundamentais do organismo durante a exposição química, avaliação feita através do soro fetal bovino (FBS) e a concentração máxima aceitável do solvente controle (SOUZA *et al.*, 2023).

Os ensaios de citotoxicidade das linhagens ZEM2S e ZFL foram quantificados por diferentes parâmetros de viabilidade celular como: função metabólica, integridade da membrana lisossômica e integridade da membrana celular. A combinação desses parâmetros forneceu uma precisão na avaliação da citotoxicidade química em linhagens de peixe-zebra (SOUZA *et al.*, 2023).

5.2.3. Ecotoxicidade e nanotoxicidade

Estudos vêm sendo realizados com peixe-zebra visando auxiliar na compreensão e importância da ecotoxicologia e nanotoxicologia, investigando os possíveis danos ao meio ambiente e aos seres humanos.

Ecotoxicologia é a ciência dedicada ao estudo dos efeitos adversos dos produtos químicos tóxicos em diferentes escalas, desde a biomolécula, célula, órgão, funções e biodiversidade dos ecossistemas. Foi desenvolvida, visando identificar, controlar e diminuir os poluentes químicos no meio ambiente (TARAZONA; RAMOS-PERALONSO, 2014; ZHOU *et al.*, 2019). É uma área multidisciplinar que engloba a toxicologia e ecologia. Já, a nanotoxicologia é

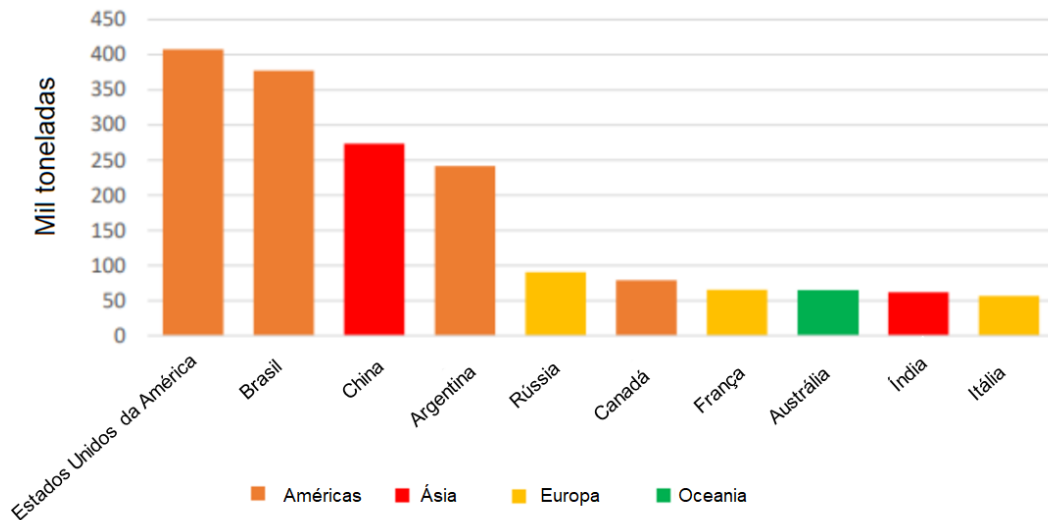
semelhante a ecotoxicologia, entretanto, estuda a toxicidade de nanopartículas e nanomateriais. Concentrando principalmente em determinar e compreender os efeitos tóxicos e adversos em humanos e no meio ambiente (SELVARAJ *et al.*, 2018; AKÇAN *et al.*, 2020).

Os testes ecotoxicológicos e nanotoxicológicos foram desenvolvidos para auxiliar na identificação e/ou medição dos efeitos de diferentes concentrações de substâncias e seus efeitos sobre os organismos testados. Esses testes têm a potencialidade de identificar a toxicidade de compostos químicos, sinalizando os potenciais efeitos ecotoxicológicos e seus mecanismos de ação em organismos vivos (RANI-BORGES; VICENTE; POMPÊO, 2022; ZHOU *et al.*, 2019).

No cenário mundial atual, existe uma grande variedade de pesticidas disponíveis no mercado, tais como, herbicidas, inseticidas, fungicidas, fumigantes e raticidas, que são utilizados no controle de pragas e doenças. Entretanto, a maioria dos pesticidas não permanecem totalmente fixados às culturas, sendo liberados no meio ambiente e ambientes aquáticos, levando ao acúmulo de resíduos tóxicos, conseqüentemente a um prejuízo para o meio ambiente e o ecossistema. Assim sendo, estudos têm demonstrado que os pesticidas ocasionam impacto negativo nos seres humanos, meio ambientes, entre outros (GONÇALVES *et al.*, 2020; LV *et al.*, 2022).

O crescimento da economia mundial, desencadeou um aumento na utilização de produtos químicos agrícolas e o uso imprudente de pesticidas e outros poluentes orgânicos, sendo o Brasil um dos países que mais utiliza pesticidas mundialmente (Figura 8). Conseqüente, devido às suas propriedades de bioacumulação e alta toxicidade diversos pesticidas poluíram direta ou indiretamente o ar, a água, o solo e o ecossistema em geral, causando sérios riscos à saúde dos seres vivos e ao meio ambiente (SHARMA *et al.*, 2019; SEZER *et al.*, 2023).

Figura 8. Países com maior uso de pesticidas em 2020.



Laranja: Américas; Vermelho: Ásia; Amarelo: Europa; Verde: Oceania.
 Fonte: Adaptado de FAO, 2022.

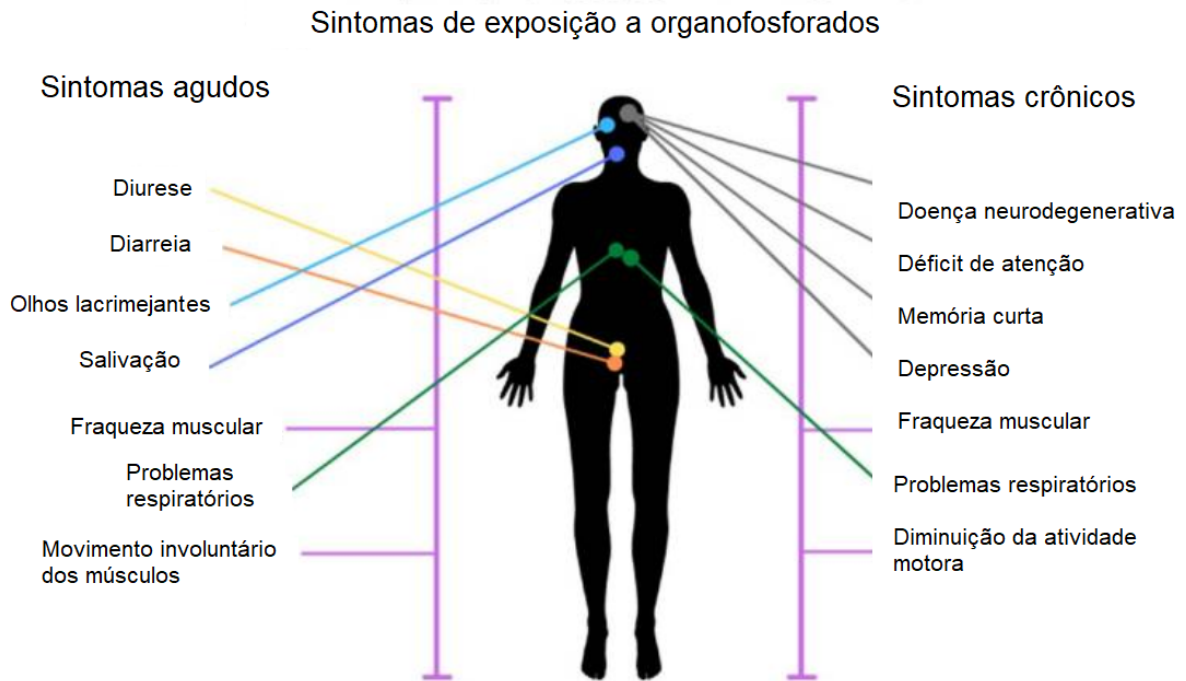
Grandes desafios estão relacionados ao uso de pesticidas, como o aumento da população mundial e as mudanças nos hábitos alimentares levaram a uma estimativa que a produção de alimentos precisará aumentar 60% até 2050 para atender à demanda de toda a população (ALEXANDRATOS; BRUINSMA, 2012). Desde a segunda guerra mundial, ocorre o aumento na produção de alimentos, por fatores como a utilização de produtos químicos, melhores variedades de plantas e o uso de maquinário, e o uso dos pesticidas. Os pesticidas têm sido usados para controlar ervas daninhas e insetos no cultivo agrícola, reduzindo a perda de alimentos na colheita (TUDI *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2019). Assim, eles são uma ferramenta fundamental na proteção das plantas e para aumentar o rendimento das culturas.

Dentre os estudos realizados com peixe-zebra, a maioria avalia a toxicidade dos pesticidas individuais (WANG *et al.*, 2023). Como exemplo, o estudo do carbaril. O carbaril é um fármaco da família carbamatos que é neurotóxico, sendo o principal modo de ação o bloqueio da enzima acetilcolinesterase (AChE). O inseticida carbaril é habitualmente detectado em ecossistemas de água doce, em baixas concentrações geralmente em ng/L (FARIA *et al.*, 2022). As larvas de peixe-zebra quando expostas por vinte e quatro horas a uma determinada concentração de

carbaril encontradas no ecossistemas aquáticos, apresentaram um prejuízo no comportamento locomotor (FARIA *et al.*, 2022). Foram encontrados 18 alvos moleculares sendo sete alvos humanos. A acetilcolinesterase (AChE), não apresentou relação com os efeitos neurocomportamentais do carbaril no comportamento das larvas do peixe-zebra. E a afinidade pelo receptor de serotonina 2B (HTR2B) e os adrenoreceptores alfa-2B ADRA2B, foram alvos que apresentaram cardiotoxicidade e aumento da frequência cardíaca em larvas do peixe-zebra (FARIA *et al.*, 2022; MAMOSHINA; RODRIGUEZ; BUENO-OROVIO, 2021).

Outros estudos, apontam os pesticidas organofosforados como uma das classes químicas mais estudadas nesse modelo animal. Os organofosforados são substâncias químicas tóxicas produzidas no processo de esterificação e algumas outras rotas. Eles estão presentes como os principais componentes de herbicidas, pesticidas e inseticidas, além disso, são utilizados para produzir plásticos e solventes (ADEYINKA; MUCO; PIERRE, 2022). Atuam inibindo as colinesterases, principalmente a acetilcolinesterase (AChE), aumentando o nível de acetilcolina nas sinapses. Conseqüentemente, quando mamíferos são expostos aos organofosforados, apresentam irregularidades cardíacas, lacrimejamento, salivação, diarreia, convulsões, agitação e ansiedade (NEYLON *et al.*, 2022), (Figura 9).

Figura 9. Principais consequências da exposição ao organofosforados em humanos.



Fonte: Adaptado de Neylon *et al.*, 2022.

O glifosato é um organofosforado amplamente utilizado no mundo (AMES *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2021), devido ao seu amplo espectro, alta eficiência e baixo preço. O glifosato é um organofosforado sintetizado quimicamente, são componentes ativos de herbicidas, tendo como principal produto de degradação o ácido aminometil fosfônico (AMPA) (ZHANG *et al.*, 2021). O glifosato é misturado a ingredientes químicos, como adjuvantes e tensoativos (AMES *et al.*, 2022). O mecanismo de ação do glifosato é bloquear a síntese de aminoácidos aromáticos essenciais nas plantas. No sul do Brasil, esse herbicida é usado em plantações de arroz irrigado, sendo a água da lavoura escoada, deixando resíduos de glifosato no meio ambiente (LOPES; SANDRINI; SOUZA, 2018). Este herbicida pode ser encontrado em parques, nas fontes de água potável, ar, precipitação e solo através da aplicação direta ou escoamento, podendo ser tóxico representando grandes ameaças à saúde humana e ambiental (LOPES; SANDRINI; SOUZA, 2018; ZHANG *et al.*, 2021; GIOMMI *et al.*, 2022). Diversos estudos, utilizando peixe-zebra tem mostrado o efeito do glifosato relacionado a redução na atividade metabólica (LOPES; SANDRINI; SOUZA, 2018), no desenvolvimento e função cardíaca (LU *et*

al., 2022; SCHWEIZER *et al.*, 2019), expressão de genes (ZHANG *et al.*, 2021), ansiedade (CHAULET *et al.*, 2019), atrasos no desenvolvimento e malformações (SCHWEIZER *et al.*, 2019), e estresse oxidativo (AMES *et al.*, 2022; GIOMMI *et al.*, 2022).

Além dos estudos em pesticidas individuais, recentes estudos têm demonstrado os efeitos ecotoxicológicos que ocorrem através da mistura de pesticidas. Como no estudo entre a combinação do organofosforado foxim (PHO) e piretróide deltametrina (DEL) no estágio embrio-larval do peixe-zebra. Neste estudo, foram analisados os parâmetros e os impactos tóxicos entre a combinação do PHO e DEL no estágio embrio-larval do peixe-zebra, investigando a toxicidade aguda, atividades enzimáticas e expressões gênicas em embriões co-expostos a PHO e DEL (LV *et al.*, 2022). A mistura de pesticidas pode apresentar um risco maior, quando comparado a cada pesticida sozinho (BELDEN; BRAIN, 2017; LV *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2023). O peixe-zebra foi submetido a diluições seriadas de cada pesticida com uma razão equitativa fixa de acordo com os valores LC_{50} (concentração letal para 50%) obtidos individualmente. Como resultado, os testes de toxicidade mostraram que, individualmente, tanto o PHO e DEL mostraram uma seletividade e evidência tóxica em vários períodos de vida do peixe-zebra. O PHO mostrou uma faixa tóxica mais estreita, enquanto o DEL mostrou uma faixa tóxica mais ampla, para os peixes-zebra testados. Sendo o estágio embrionário o mais tolerante, e o período adulto o mais sensível aos dois pesticidas. A combinação de PHO e DEL ocasionou efeitos sinérgicos em embriões de peixes-zebra. No que tange o estresse oxidativo, apoptose, resposta imune e sistema endócrino, foram expresso nove genes associados (*Mn-sod*, *Cu/Zn-sod*, *cas3*, *dio1*, *tsh*, *ER α* , *vtg1*, *cyp17* e *crh*), os quais foram significativamente alterados quando em contato com a mistura de pesticidas em relação aos pesticidas individuais (LV *et al.*, 2020).

No estudo realizado por Wang *et al.* (2023), foi testada a combinação da estrobilurina piraclostrobina (PYR) e o ditiocarbâmico polimérico metiram (MET). Para isso, foram analisados os parâmetros e os impactos tóxicos entre a combinação do PYR e o MET, investigando a toxicidade aguda, atividades enzimáticas e expressões gênicas em peixes-zebra. Como resultado, o MET mostrou uma faixa tóxica mais ampla, sobre os embriões de peixe-zebra em relação ao PYR. A combinação de PYR e MET ocasionou efeitos sinérgicos em embriões de

peixes-zebra. A avaliação do nível celular mostrou que a atividade enzimática da peroxidase, CYP450 e vitelogenina foram alteradas na exposição individual e combinadas. No que tange o sistema endócrino e o sistema imune, três genes (*vitellogenin* 1, hormônio liberador de corticotropinae interleucina -8) foram alterados (WANG *et al.*, 2023).

Para a investigação de toxicidade, os peixes-zebra no estágio inicial de vida, se mostraram sensíveis aos pesticidas (WANG *et al.*, 2023; LV *et al.*, 2022). Em ambos os estudos citados, apresentaram resultados que apontam a toxicidade da utilização da mistura de pesticidas. Consequentemente, os padrões de qualidade ambiental para pesticidas individuais podem não ser efetivos na proteção do meio ambiente e ecossistema contra os efeitos tóxicos do contato com as misturas de pesticidas (LV *et al.*, 2022). Portanto, há uma necessidade do acompanhamento das mistura de pesticidas, visando assim evitar a contaminação no ecossistema aquático e no meio ambiente.

Outra preocupação mundial está relacionada ao surgimento da nanotecnologia. A nanotecnologia é a ciência e a engenharia envolvidas no projeto, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos, cuja menor organização funcional, em pelo menos uma dimensão, está em nanoescala (nanopartícula, 1 a 100 nanômetros) (SAINI; SAINI; SHARMA, 2010). A nanotecnologia emergiu como uma ferramenta importante, sendo aplicada na área da saúde, da eletrônica, dos cosméticos, dos têxteis, da informática e da proteção ambiental, ou seja, a nanotecnologia possui muitos pontos favoráveis. Entretanto, com o aumento da utilização de nanopartículas (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010; KLEIN *et al.*, 2022; SEZER *et al.*, 2023) devido ao baixo custo, eficiência e ampla escala de produção e das nanopartículas portarem dimensões tão pequenas, as nanopartículas podem alcançar facilmente a atmosfera, água e solo e podem ficar por maior tempo no ambiente, causando um efeito tóxico potencializado em virtude da maior área superficial (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010), acarretando no aumento da exposição humana às nanopartículas (KLEIN *et al.*, 2022).

No que concerne à nanotoxicidade, o campo dos nanomateriais tem se desenvolvido rapidamente nos últimos anos. Devido às propriedades únicas das

nanopartículas, elas são encontradas em uma ampla gama de aplicações comerciais (ABRAMENKO *et al.*, 2018). Os estudos têm relacionado a pesquisa nanotoxicológica e a segurança dos nanomateriais. Muitas das propriedades físico-químicas dos nanomateriais e muitos fatores abióticos afetam a ecotoxicidade dos nanomateriais. Os nanomateriais podem ser transportados para o ambiente, principalmente aquático através da atmosfera, lixiviação superficial, estações municipais de tratamento de águas residuais e atividades de purificação de água (CLEMENTE *et al.*, 2019).

Os nanomateriais de carbono têm sido amplamente estudados devido a suas vantagens de desempenho óptico favorável, síntese fácil e boa permeabilidade celular (GAO; XIE; ZHENG, 2023; JIN *et al.*, 2022; SHI *et al.*, 2022). Consequente, são aplicados a vários setores incluindo sensores de gás, biomedicina (MONTALVÃO *et al.*, 2023), purificação de água (CLEMENTE *et al.*, 2019) e imagem (GAO; XIE; ZHENG, 2023). Como resultado os estudos apontam alterações bioquímicas (CLEMENTE *et al.*, 2019; MONTALVÃO *et al.*, 2023) como o aumento significativo nos níveis em células MDA (MDA-kb2 é um derivado de uma linhagem celular de câncer de mama humano) (WILSON, 2002), induzidos pela exposição a nanomateriais de carbono, efeitos mutagênicos e genotóxicos (MONTALVÃO *et al.*, 2023), aumento da atividade locomotora, redução do tamanho do saco vitelínico e comprimento total e inibição da atividade da AChE (CLEMENTE *et al.*, 2019).

Outras substâncias amplamente investigadas como materiais tóxicos utilizando embriões de peixe-zebra como organismos de teste, são as nanopartículas à base de metal, como prata (Ag), óxido de zinco e dióxido de titânio (SEZER *et al.*, 2023), e nanopartículas de plástico (nanoplásticos e microplásticos) como o bisfenol (WANG *et al.*, 2023), entre outros.

As nanopartículas de prata são amplamente utilizadas por suas propriedades antibacterianas e antifúngicas contra uma variedade de microrganismos. (GALATAGE *et al.*, 2021; GARCIA *et al.*, 2022). Em 2018, as nanopartículas de prata (Ag) representavam aproximadamente 24% da produção total da indústria (ABRAMENKO *et al.*, 2018). Sendo usados na produção de produtos de limpeza e desinfetantes de superfícies e têxteis, géis ou tintas antimicrobianas e embalagens de alimentos e materiais de preservação. Eles são encontrados em muitos itens do

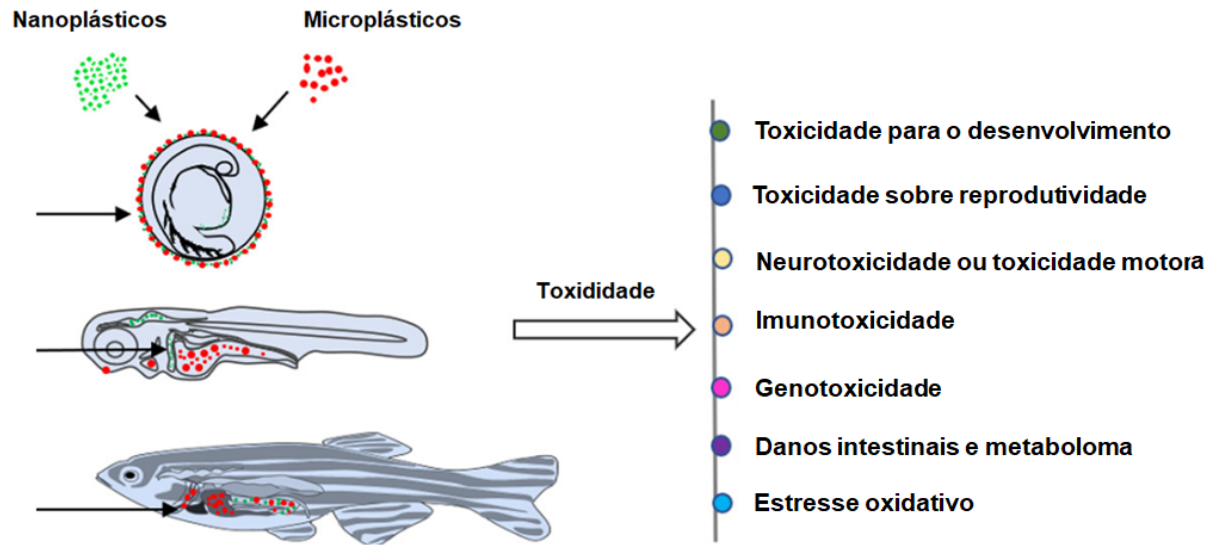
dia a dia, como roupas, pasta de dente, desodorante e outros cosméticos antibacterianos, e até mesmo dentro de geladeiras e máquinas de lavar (CALDERÓN-JIMÉNEZ *et al.*, 2017).

A toxicidade de nanopartículas de prata, geralmente está correlacionada com a emissão de íons de prata da superfície de nanopartículas, tamanho, superfície e a forma (esferas e nanoplacas, por exemplo) (ABRAMENKO *et al.*, 2018; CALDERÓN-JIMÉNEZ *et al.*, 2017). Além disso, outros fatores podem influenciar a experimentação, como a formação de agregados, via de exposição, dose-resposta, duração da exposição, resposta do organismo receptor e interações nos mecanismos envolvidos no processo fisiológico de absorção (CALDERÓN-JIMÉNEZ *et al.*, 2017).

Em um estudo realizado por Kubiński *et al.* (2023), foram utilizadas nanopartículas de prata na incorporação à hidrogel à base de alanina C₁₂, sendo analisadas individualmente ou associadas e a gelificantes, quanto às propriedades ecotóxicas para embriões de peixes-zebra. A síntese de nanopartículas de prata foi estabilizada em ácido cítrico, reduzindo a prata iônica a nanopartículas metálicas em um sistema aquoso com ácido cítrico. O resultado mostrou que, quando juntos, a alanina C₁₂ e nanopartículas de prata não foram tóxicas, enquanto os compostos de nanopartículas de prata e alanina C₁₂ foram tóxicos na coagulação de ovos fertilizados em concentrações de 5 mg/mL e superiores (KUBIŃSKI *et al.*, 2023).

Os microplásticos e nanoplásticos atraíram preocupação global como poluente, decorrente da sua capacidade de contaminação generalizada e de atravessar a barreira biológica, além da ampla utilização de plásticos na última década (WANG *et al.*, 2023; BHAGAT *et al.*, 2020). Os microplásticos são fragmentos de plástico entre 1 a 5.000 µm e os nanoplásticos menores que 0,1 µm. Devido ao pequeno tamanho, eles entram no corpo humano pela ingestão de água e alimentos (WANG *et al.*, 2023). Conseqüente, leva ao acúmulo de micro e nanoplásticos em diferentes fases de desenvolvimento do peixe-zebra (Figura 10), apresentando risco ao meio ambiente e à saúde humana (BHAGAT *et al.*, 2020).

Figura 10. Acúmulo de nanoplásticos e microplásticos em peixe-zebra



Fonte: Adaptado de Jacky *et al.*, 2020.

Wang *et al.* (2023) analisaram as co-exposições de nanoplásticos e bisfenol AF (BPAF) através de parâmetros com foco no neurodesenvolvimento resultante, apoptose, inflamação, danos ao estresse oxidativo e respostas comportamentais locomotoras. Avaliando a variedade de efeitos tóxicos em peixe-zebra. Como resultado à exposição única a BPAF e a co-exposição de BPAF e nanoplásticos, apresentou alteração do comportamento locomotor e social, diminuição da função reprodutiva (diminuição nas desovas), alteração do comprimento do corpo, a taxa de eclosão e a mortalidade na prole do peixe-zebra, alterações do neurodesenvolvimento da expressão gênica apoptótica e inflamatória da prole do peixe-zebra, aumento do nível de estresse oxidativo dos filhotes de peixe-zebra (WANG *et al.*, 2023).

Desta forma, no que tange a ecotoxicologia e a nanotoxicologia os resultados dos estudos têm evidenciado, a importância do peixe-zebra na identificação de substâncias tóxicas presente no meio ambiente, que os seres humanos são expostos. Demonstrando o grande potencial do peixe-zebra em pesquisas associadas a ecotoxicidade e nanotoxicidade.

5.3 PEIXE-ZEBRA NAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte no mundo (Organização mundial da saúde, OMS) e vêm apresentando um aumento que decorre do uso do tabagismo, da falta de exercícios, da alimentação inadequada e da ingestão de grandes quantidades de álcool, que ocasionam fatores de risco como hipertensão arterial, diabetes mellitus, obesidade, entre outros (PATEL *et al.*, 2022; NUNES *et al.*, 2022). Essas doenças ocasionam danos ao coração, artérias, cérebro e rins, podendo ser irreparáveis. Ainda, o envelhecimento leva a perda de células em tecidos como o coração, cérebro, timo e músculo esquelético (NUNES *et al.*, 2022).

O peixe-zebra tem a presença de genes de doenças humanas em seu genoma, a transparência óptica dos embriões (VOLKOV *et al.*, 2022) e um coração anatomicamente parecido ao do ser humano (POON & BRAND, 2013). Sendo composto por um saco pericárdico como visto em humanos, o arterioso bulboso que pode ser comparado ao arco aórtico humano e o seio venoso que é correspondente à veia cava humana (SUN *et al.*, 2009; BELLING *et al.*, 2020). Entretanto, o peixe-zebra tem pequenos vasos capilares coronários localizados na camada muscular compacta, que deve ser levado em consideração para modelos de lesão cardíaca (BELLING *et al.*, 2020), e não uma rede de artérias coronárias como encontrada no coração humano, além disso, apresenta somente um ventrículo e um átrio. (SUN *et al.*, 2009; BELLING *et al.*, 2020, POON & BRAND, 2013).

As alterações cardíacas e vasculares no peixe-zebra são causadas pela mesma regulação molecular e mecanismos celulares presentes em humanos. O peixe-zebra tem um sistema circulatório fechado e a formação de vasos sanguíneos pode ser dividida em dois processos distintos: vasculogênese e angiogênese (COPPOLA *et al.*, 2023). A angiogênese pode ser definida como o processo de formação de vasos sanguíneos em condições fisiológicas e patológicas (DAMICO, 2007). A manutenção ou crescimento inadequado dos vasos sanguíneos leva à isquemia tecidual e está frequentemente associada ao câncer, doenças inflamatórias e retinopatia. Enquanto a vasculogênese é definida como agregação de angioblastos (células germinativas) em vasos sanguíneos (COPPOLA *et al.*, 2023).

Além das similaridades com os humanos, o peixe-zebra apresenta uma alta capacidade de regeneração cardíaca. Esta capacidade de regeneração ocorre através da ativação de programas morfogenéticos em resposta a lesões, que aumentam as cardiomiócitos (NUNES *et al.*, 2022; HONKOOOP *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2022), e através da sinalização de neuregulina 1 e receptores de proteína tirosina quinase (Nrg1/ErbB2) que é suficiente para a reprogramação metabólica em cardiomiócitos adultos de peixes-zebra, visando substituir o músculo cardíaco perdido, sem deixar cicatrizes (HONKOOOP *et al.*, 2019). Portanto, o peixe-zebra pode ser um modelo superior para estudos dos mecanismos celulares e moleculares da regeneração cardíaca (HU *et al.*, 2022).

Com isto, estudos usando o modelo peixe-zebra tem sido utilizados para a pesquisa de mecanismos e de novos fármacos para o tratamento de doenças cardiovasculares (NUNES *et al.*, 2022; THAKKAR *et al.*, 2022), identificar a importância do ciclo circadiano (ritmo do organismo em 24h) (CRNKO *et al.*, 2023), reconhecer os defeitos cardíacos congênitos, cardiomiopatia. Ainda, pode ser aplicado para verificar os efeitos das influências no funcionamento do sistema cardiovascular, fenótipos cardiovasculares que seriam letais a mamíferos e humanos, devido a obtenção do oxigênio por difusão passiva nos primeiros dias de vida (VOLKOV *et al.*, 2022). Este modelo experimental pode ainda ser utilizado para o estudo de insuficiência cardíaca, arritmia, fibrilação atrial e síndrome do nódulo sinusal (COPPOLA *et al.*, 2023), além de avaliar a cardiotoxicidade a partir da medição da frequência cardíaca, atividade enzimática, níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e morte celular (SIM *et al.*, 2023), por indução de toxinas (COPPOLA *et al.*, 2023).

A insuficiência cardíaca (IC) é uma das principais causas de morte em todo o mundo, é uma doença sistêmica que afeta a regulação hormonal que possui opções de tratamento limitadas e mau prognóstico. A IC, altera a morfologia e a função dos neurônios, levando a prejuízos neurocognitivos (CRNKO *et al.*, 2023). A IC pode ser desencadeada por diversos fatores, como o infarto do miocárdio que é uma importante causa de morbidade e mortalidade em humanos, devido à capacidade limitada de regeneração aos danos cardíacos (WU *et al.*, 2022).

No estudo realizado por Wu *et al.* (2022), foi coletada e analisada os principais tipos de células cardíacas do peixe-zebra utilizando a técnica *Gene Ontology*, termo usado na bioinformática que trata de unificar a representação do gene e produto do gene, e transcriptômica de célula única de alta precisão. Os principais tipos de células investigadas são: cardiomiócito atrial (CM-A), cardiomiócito ventricular (CM-V), célula endocárdica (EC), célula epicárdica (EP) e célula derivada do epicárdio (EPDC), a fatores de crescimento como Angiopietina 4 (Angpt4) que é um regulador específico da regeneração cardíaca, sendo conservado em mamíferos, promovendo o reparo cardíaco *in vitro* e *in vivo*. Tendo como resultado, os CM-A e o CM-V aumentaram os genes relativos ao desenvolvimento e função dos cardiomiócitos. As EC aumentaram os genes alusivos ao desenvolvimento da vasculatura, as EP fornecem sinais para proliferação e maturação de células cardíacas. As EPDCs estão relacionadas a genes envolvidos em adesões focais e organização da membrana extracelular, espelhando suas características moleculares durante o desenvolvimento (Wu *et al.*,2022).

Outros estudos utilizam o modelo peixe-zebra devido a sua capacidade regenerativa cardíaca. São exemplos de estudos: a identificação das principais células e mecanismo ligado à regeneração cardíaca do peixe-zebra (WU *et al.*, 2022); a importância da matrix extracelular para a regeneração do coração (GARCIA-PUIG *et al.*, 2019); a estimulação e/ou regeneração de cardiomiócitos (FUKUDA *et al.*, 2020; PENG *et al.*, 2020; BERTOZZI *et al.*, 2022).

5.4 PEIXE-ZEBRA NO ESTUDO DO CÂNCER

Uma das maiores aplicações desse modelo é para o entendimento sobre o câncer e seu tratamento. O câncer é o nome dado a mais de 100 doenças, que possuem as mesmas características, como o crescimento descontrolado de células e a disseminação e invasão de órgãos e tecidos. Os diversos tipos de câncer ainda se diferenciam pela velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos regionais ou distantes, constituindo metástases (INCA, 2022; NATIONAL CÂNCER INSTITUTE, EUA, 2022). Trata-se de um problema de

saúde pública mundial, estando, entre as principais causas de morte no mundo (SUNG *et al.*, 2021).

A incidência e mortalidade por câncer estão aumentando rapidamente no mundo, devido a fatores como o crescimento da população e o envelhecimento. Os cânceres mais diagnosticados são o câncer de mama feminino (11,7%), cânceres de pulmão (11,4%), cólon e reto (10,0%), próstata (7,3%) e estômago (5,6%). O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer em homens (18,0% do total). Nas mulheres, o câncer de mama é a principal causa de morte por câncer (SUNG *et al.*, 2021). A mortalidade por câncer atingiu 158,3 em 100.000 pessoas anualmente entre 2013-2017 no mundo (PALLAVI *et al.*, 2023).

No que tange a pesquisa em oncologia, o peixe-zebra exhibe várias características de grande valor translacional. Como a capacidade de desenvolver tumores se expostos a carcinógenos; a proteção de oncogenes, genes supressores de tumor e principais vias moleculares associadas ao câncer; os embriões podem ser geneticamente manipulados para entender o papel de genes específicos na doença, especialmente o papel no desenvolvimento de tumores, entre outros (COSTA *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2023).

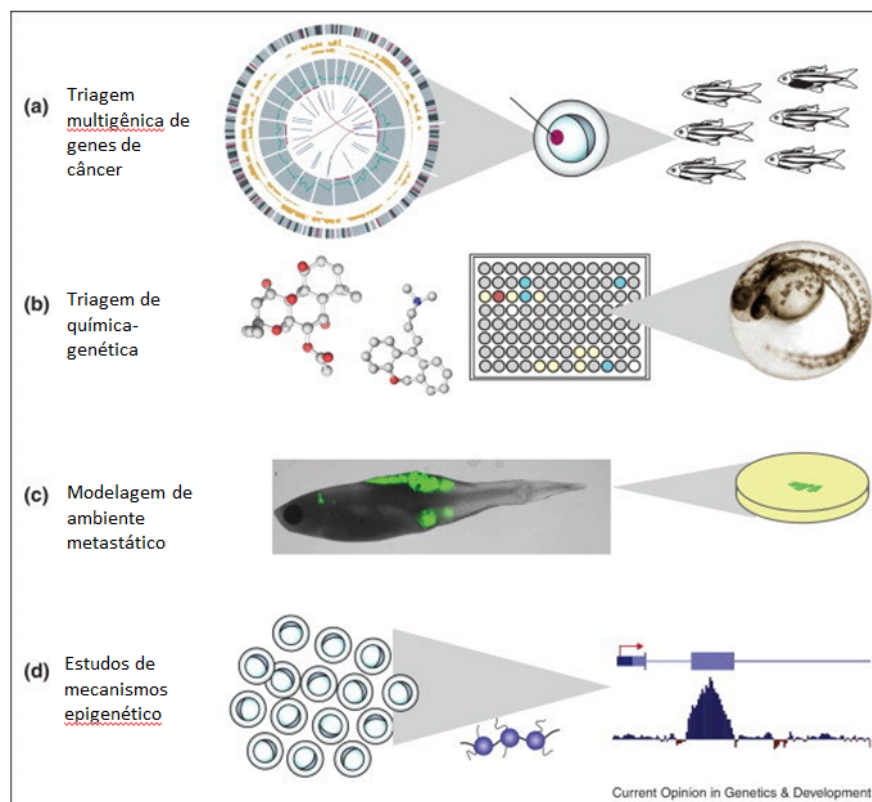
O peixe-zebra possui uma imunidade adaptativa madura entre a segunda e a terceira semana após a fertilização, enquanto a imunidade inata inicia no primeiro dia após a fertilização. Devido a falta de resposta imune madura na fase larval inicial, o transplante de vários tipos de células é facilitado (SARMIENTO *et al.*, 2022; WU *et al.*, 2018). Além disso, o sistema imunológico de larvas imaturas permite o enxerto e a sobrevivência de células cancerígenas humanas sem a necessidade de imunossupressão (COSTA *et al.*, 2020).

Esse modelo animal se tornou uma opção de modelo biológico importante para estudar o câncer devido às suas similitudes genéticas, histológicas e moleculares com os humanos (WERTMAN *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2021), sendo capaz de identificar a proliferação *in vivo* e a capacidade de migração de células cancerígenas (WANG *et al.*, 2023).

Consequente, os peixes-zebra têm sido amplamente utilizados em várias áreas como na triagem multigênica, triagem química, triagem genética, modelagem

de ambiente metastático, estudos de mecanismo epigenéticos (Figura 11). A diversidade genética afeta múltiplos fenótipos tumorigênicos, como ativação de vias de sinalização específicas, senescência, secreção de fatores solúveis, migração e capacidade de invasão, ativação de vias metabólicas, capacidade metastática e, finalmente, resposta/resistência à terapia (COSTA *et al.*, 2020). A epigenética, é definida como mudanças na expressão gênica que podem ser herdadas e que não alteram a sequência do DNA (ácido desoxirribonucleico) (PAIVA *et al.*, 2019).

Figura 11. Aplicação do peixe-zebra na pesquisa do câncer.



Legenda: (a) A triagem multigênica envolve o teste paralelo do potencial oncogênico de genes candidatos ao câncer, injetando plasmídeos contendo genes de interesse em embriões e monitorando o aparecimento acelerado de tumores em peixes adultos. (b) As bibliotecas químicas podem ser rastreadas quanto à atividade em embriões de peixe-zebra vivos usando marcadores fenotípicos embrionários iniciais em placas de 96 poços. (c) A metástase do tumor pode ser seguida através da injeção de culturas de células marcadas com proteína fluorescente verde (GFP, *green fluorescent protein*) em peixe-zebra transparente, chamado *casper*. (d) Um método de estudar a epigenética do câncer em peixes é realizar imunoprecipitação de cromatina (ChIP) em embriões classificados por citometria de fluxo (FACS, *fluorescence activated cell sorter*), seguidos de sequenciamento ou perfil de expressão. Fonte: Adaptado de Yen, White e Stemple (2014).

O tratamento do câncer, geralmente consiste em cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e, às vezes, uma combinação delas são atualmente usadas clinicamente para tratar o câncer (PALLAVI *et al.*, 2023). A cisplatina, uma droga anticancerígena, é a única droga aprovada pelo FDA para o tratamento de câncer avançado (KANDATI *et al.*, 2023). Esta droga é amplamente utilizada no tratamento de tumores sólidos, e várias formas de câncer (KANDATI *et al.*, 2023; HU *et al.*, 2023). O mecanismo antineoplásico principal atividade é promover lesões no DNA, uma vez que interagem com bases purinas, inibindo a produção de DNA, mRNA e proteína (KANDATI *et al.*, 2023). Como limitação, apresenta vários efeitos colaterais, principalmente ototoxicidade e a nefrotoxicidade (KANDATI *et al.*, 2023; HU *et al.*, 2023).

Ainda que a cisplatina possua essa limitação, é considerada pilar do tratamento do câncer (HU *et al.*, 2023). Decorrente destas limitações consideradas graves, estudos com o modelo de peixe-zebra estão sendo realizados para desenvolver métodos para o controle dos efeitos colaterais da cisplatina. Como exemplo, o estudo de nanopartículas de curcumina (CUR) com pontos quânticos de óxido de grafeno (GOQDs). Tendo como resultado, quando testado na concentração de de 20 µg/mL CUR/GOQDs, um efeito protetor e redutor nas células ciliadas do peixe-zebra (HU *et al.*, 2023).

Um outro estudo utilizou os probióticos, e observou modulação das enzimas antioxidantes e os danos nos tecidos induzidos pela cisplatina, melhorando a saúde do peixe-zebra e a diminuição dos efeitos colaterais. Além disso, os probióticos têm sido usados como adjuvante na quimioterapia de diferentes tumores (pulmão, trato gastrointestinal, entre outros) melhorando as taxas de regressão do tumor, bem como aumentando a sobrevida e a qualidade de vida do paciente com câncer humano (KANDATI *et al.*, 2023).

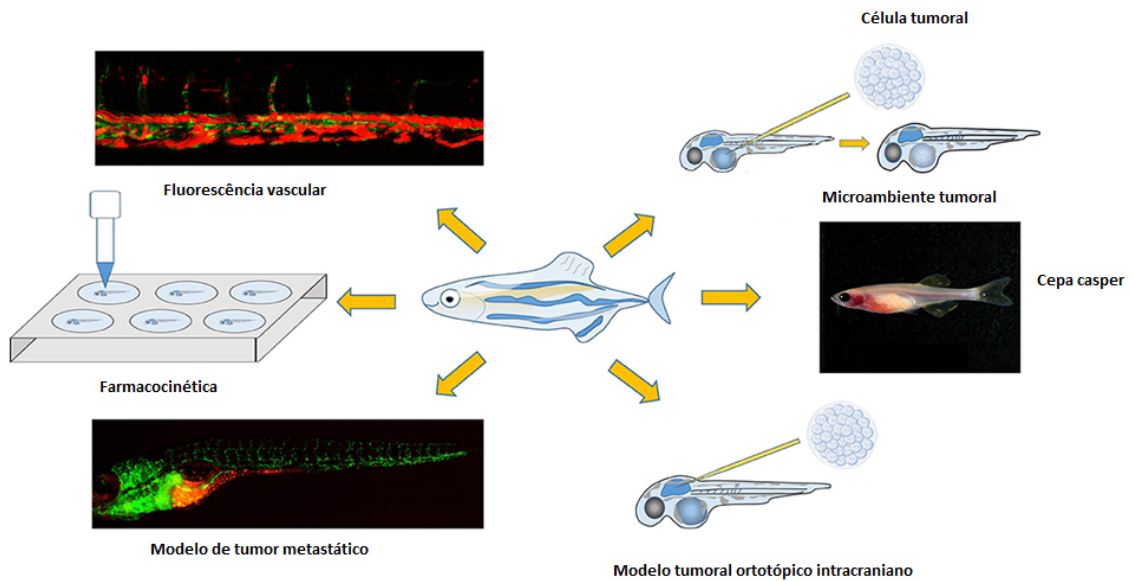
Com o modelo do peixe-zebra, geralmente as células cancerígenas são injetadas e/ou implantadas (WU *et al.*, 2023), os tipos de células incluem células primárias derivadas de pacientes e linhas celulares de laboratório, com diferentes tipos de malignidades como tumores de células germinativas, leucemia, melanoma, neuroblastoma, cânceres epiteliais originários do sistema neuroendócrino, entre outros (CHEN *et al.*, 2021). Sendo assim um modelo adequado para utilização em procedimentos que abrange o transplante, implantação ou infusão de órgãos,

tecidos e/ou células cancerígenas humanas para uma espécie diferente este processo é chamado de xenotransplantes (SARMIENTO *et al.*, 2022; FDA, EUA).

O xenotransplante principalmente nas larvas do peixe-zebra está sendo utilizado para avaliar câncer de fígado, câncer de mama, câncer de colon, carcinomas ovarianos, glioblastoma, células de câncer colo retal, entre outros (SARMIENTO *et al.*, 2022). Estes transplantes visam investigar várias características do câncer, como a angiogênese, invasão/extravasão de células cancerígenas e formação de micrometástases (COSTA *et al.*, 2020). A angiogênese e a vascularização contribuem para o crescimento do tumor e progressão do câncer (JANZADEH *et al.*, 2021). Uma vantagem do uso do peixe-zebra é que o xenotransplante pode ser realizado em/com grandes quantidades de peixes-zebra adultos e de larvas de peixe-zebra (COSTA *et al.*, 2020; SARMIENTO *et al.*, 2022), em um único dia por um operador. Já como limitação às larvas de peixe-zebra, precisam estar em uma temperatura de aproximadamente 28°C (SARMIENTO *et al.*, 2022).

Outras características do modelo de peixe-zebra xenográfico: são transparentes e translúcidas, o uso de imagens de fluorescência vascular, o estabelecimento de modelos ortotópicos metastáticos e intracranianos, medições farmacocinéticas individuais, entre outros (Chen *et al.*, 2021, WU *et al.*, 2023) (Figura 12). Contribuindo assim para o desenvolvimento de pesquisa do câncer e para o estudo do mecanismo de ação da droga *in vivo* (WU *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2023).

Figura 12. Características do modelo de peixe-zebra xenográfico.



Modelos xenólogos são aqueles em que os genes divergem por transferência horizontal de genes, podendo adquirir novas funções. Fonte: Adaptado de Chen et al. (2021).

Isto posto, os avanços no conhecimento sobre o peixe-zebra e o aumento da utilização em estudos têm auxiliado no desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento do câncer, como a utilização do modelo de xenoenxerto de peixe-zebra no processo de descoberta de fármacos e avaliação pré-clínica de diferentes tipos de terapias (COSTA *et al.*, 2020).

A terapêutica do câncer baseia-se no uso de moléculas radioativas para diagnosticar e tratar doenças oncológicas e visa eliminar procedimentos em várias etapas, reduzir atrasos no tratamento e melhorar o atendimento ao paciente (CHEN; WONG, 2014). A utilização de nanopartículas poliméricas, são exemplos de estudos terapêuticos (CREAMER, *et al.* 2023; KOCERE *et al.*, 2020).

No estudo feito Creamer, *et al.* 2023, foi utilizado o poli(9,9-dioctilfluoreno-*alt*) fluorescente-benzotiadiazol) (F8BT), as nanopartículas formadas foram microinjetadas na veia caudal de peixe-zebra. As nanopartículas direcionadas exibiram a capacidade de se ligar com alta especificidade às células cancerígenas que expressam o antígeno alvo fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). As SPNs PEG (pegulados) exibiram uma circulação de sete dias após a injeção,

minimizando a retenção de tecido inespecífico e maximizando a ligação ao alvo. A microinjeção de SPNs revestidos com *Affibodies* (qualquer pequena proteína sintética que imita a ação dos anticorpos, geralmente polipeptídeos) em modelos de peixe-zebra de xenoenxerto mostraram ter uma melhora significativa na associação celular.

No estudo realizado por Kocere *et al.* (2020), foram utilizadas células B16 de melanoma de camundongo, polímeros de poli(etileno glicol)-bloco-poli(2-(diisopropilamino) etil metacrilato) (PEG-PDPA) sensíveis ao pH contendo um corante fluorescente ou doxorrubicina. As nanopartículas poliméricas formadas foram injetadas no tubo neural. Para células cancerígenas, foram injetadas de 100–150 células B16 de melanoma de camundongo no tubo neural de embriões de peixe-zebra três dias após a fertilização. O transplante foi feito no dia 2, pela maior facilidade de obter focos disseminados ao longo do tubo neural do que um tumor sólido. As células B16 xenotransplantadas estimulam a angiogênese. Entretanto, a angiogênese induzida pelo câncer B16 resultou em perda completa de ordem, encolhimento dos vasos e formação de vários novos ramos vasculares. Para o tratamento anticancerígeno, foi utilizado PEG-PDPA contendo 2 mg/ml de doxorrubicina, e doxorrubicina livre 2 mg/ml, as nanopartículas foram injetadas por via intravenosa quatro dias após a fertilização. Foram observados os seguintes parâmetros: crescimento e proliferação de células B16 transplantadas no tubo neural, estímulo da angiogênese local, acúmulo de nanopartículas no local do câncer, toxicidade e potencial terapêutico. A doxorrubicina reduziu a proliferação e aumentou a apoptose das células cancerígenas (KOCERE *et al.*, 2020).

Consequente, os estudos Creamer *et al.* (2023) e Kocere *et al.* (2020), concordaram na capacidade de usar o modelo peixe-zebra para avaliar a eficácia de nanopartículas poliméricas devido ao curto tempo (7-10 dias), e para demonstrar que as nanopartículas poliméricas são uma classe emergente como teranóstico para o câncer.

No estudo feito por Pallavi *et al.* (2023), foram analisadas nanopartículas de ouro conjugado com rodamina (corante) como terapia fotodinâmica com laser, avaliando a toxicidade no modelo de peixe-zebra. A terapia fotodinâmica consiste na excitação de moléculas não tóxicas chamadas fotossensibilizadores, a qual é

aplicado um comprimento de onda específico de luz para gerar espécies reativas de oxigênio, para tratar células cancerígenas e outros patógenos. Sendo considerada uma modalidade clínica para terapia de câncer e infecções multirresistentes. Como resultado, as nanopartículas de ouro conjugado com rodamina foi um agente teranóstico eficaz capaz de prevenir a progressão do câncer e bactérias multirresistentes, além de apresentar toxicidade mínima observada em ensaios *in vivo* usando embriões de peixe-zebra (PALAVI *et al.*, 2023).

No estudo feito por Wu *et al.* (2020), foram analisadas a atividade antiangiogênica embrionária e patológica, e efeito antitumoral de ramucirumabe, apatinibe, regorafenibe e cabozantinibe. Todos os fármacos apresentaram efeito antiangiogênico, foram capazes de inibir a formação de vasos intersegmentares e a capacidade de inibir o crescimento do tumor. Entretanto, todos os tratamentos com as drogas utilizadas mostraram toxicidades relacionadas a doenças cardiovasculares. Destaca-se que todas essas drogas já são utilizadas e liberadas para o uso em diversos cânceres. Ainda no estudo de Wu *et al.* (2020), o cabozantinibe apresentou um potencial como medicamento para câncer gástrico, e apresentou o maior índice terapêutico, exibindo angiogênese induzida por tumor e atividades antiproliferativas no ensaio de xenotransplante, e com uma toxicidade tolerada.

A utilização do peixe-zebra demonstrou ser um modelo emergente para pesquisas de novos fármacos, de toxicidade e identificação do mecanismo de ação em diferentes tipos de câncer.

5.5 UTILIZAÇÃO DO PEIXE-ZEBRA EM OUTRAS DOENÇAS.

5.5.1. Diabetes

O diabetes é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica com comprometimento do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Esse desequilíbrio metabólico resulta da secreção e/ou função prejudicada da insulina (QU *et al.*, 2023; DIOGO *et al.*, 2023). O diabetes tipo 1 é uma doença autoimune crônica caracterizada pela perda de células beta produtores de insulina no pâncreas, resultando em deficiência de insulina. O diabetes tipo II é a resistência adquirida à insulina e pode ocorrer em combinação com a diminuição da secreção de insulina.

Ambos os tipos de diabetes têm uma incidência crescente na população. As causas mais conhecidas de diabetes tipo 2 são fatores de estilo de vida e predisposição genética. A causa do diabetes tipo 1 é devido a muitas razões (DIOGO *et al.*, 2023).

No estudo realizado por Qu *et al.* (2023), decorrente das alterações na composição da flora intestinal em pacientes diabéticos, foi analisada a suplementação com *Akkermansia muciniphila* pasteurizada. Como resultado, *Akkermansia muciniphila* pasteurizada pode melhorar de forma significativa os índices glicêmicos no sangue, o índice de massa corporal e os índices de diabetes do peixe-zebra com diabetes mellitus. Outro estudo feito por Diogo *et al.* (2023) foi avaliado a qualidade dos espermatozoides e os genes importantes para o diabetes, utilizando o modelo peixe-zebra. Como resultados, apresentou menor motilidade, menor viabilidade da membrana plasmática e menor integridade do DNA, ou seja, efeitos relacionados ao diabetes tipo I em espermatozoides de peixe-zebra nos níveis celular e molecular. Validando assim, o modelo peixe-zebra para estudos de diabetes tipo I em células germinativas.

5.5.2. Doenças oculares

Em um estudo de revisão feito por Rosa *et al.* (2023), foi destacado que o peixe-zebra é um modelo adequado para a recapitulação de doenças oculares e visuais, pois possibilita a sub localização do processo lesivo a partir da visualização do olho e suas estruturas através da larva transparente. Desta forma, podem ser compreendidos a patogênese de infecções oculares, doenças autoimunes, mecanismos imunológicos celulares e moleculares subjacentes. A triagem baseada em fenótipos, incluindo a avaliação do padrão de repertório comportamental de larvas de peixe-zebra, tem sido usada para avaliar circuitos neurovisuais, permitindo a triagem simultânea de muitas novas moléculas, reposicionamento de fármacos, incluindo medicamentos já aprovados, bem como explorar terapias alternativas (ROSA *et al.*, 2023).

5.5.3. Doenças infecciosas

O peixe-zebra também pode ser utilizado como modelo de patogenicidade e pesquisa de fármacos para doenças infecciosas (LOGAN *et al.*, 2018; VAN LEEUWEN *et al.*, 2014; WILES *et al.*, 2016). As doenças infecciosas são doenças causadas por microrganismos patogênicos (como bactérias, vírus, protozários/helmintos e fungos) que entram no corpo, se multiplicam e causam uma infecção. Podendo ser transmitida de maneira direta ou indireta. Sendo que, algumas doenças infecciosas são contagiosas e/ou transmissíveis. E outras doenças infecciosas podem ser transmitidas por germes transportados pelo ar, água, alimentos ou solo. Eles também podem ser transmitidos por vetores (como picadas de insetos) ou por animais para humanos (Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, 2023).

O peixe zebra é um organismo modelo capaz de estudar as interações patógenos-hospedeiro. Com isto pesquisadores vêm utilizando este modelo na resposta imune inata (VIANA *et al.*, 2023), nas interações do microbioma (LOGAN *et al.*, 2018), na infecção por *Mycobacterium marinum* (meningite tuberculosa) (VAN LEEUWEN *et al.*, 2014), microbiota intestinal (WILES *et al.*, 2016), entre outros.

No estudo realizado por Viana *et al.* (2023), verificou-se os mecanismos de patogenicidade da bactéria *Legionella pneumophila* durante a infecção no peixe-zebra. A *Legionella pneumophila*, é uma bactéria intracelular facultativa Gram negativa, que habita fontes naturais de água doce, e possui uma ampla gama de hospedeiros como: Amoebozoa (amebas), Percolozoa (escavados) e Ciliophora (protozoários ciliados). Sendo capaz de infectar humanos e causar pneumonia grave. O modelo peixe-zebra foi utilizado para examinar a resposta imune inata, através de micro injetamento das bactérias na corrente sanguínea. O monitoramento de *Legionella pneumophila* (cepa Paris) foi realizado a partir dos níveis de expressão da proteína GFP ou do mutante isogênico deficiente do sistema de secreção tipo IV (T4SS) expressando a proteína GFP, em larvas de peixe-zebra, por contagem de *pixels* fluorescentes em larvas injetadas vivas. Como resultado, quando expostos a bactérias *L. pneumophila* em baixa e em alta concentração, o peixe-zebra controlou progressivamente as bactérias no período de 24 horas após a infecção (hpi, do inglês 'hypothalamo-pituitary-interrenal'). Em alta concentração de 72 hpi,

apresentou um aumento na quantidade de bactérias e algumas larvas de peixe-zebra não eliminaram as bactérias, consequentemente *L. pneumophila* causa a morte de larvas de peixe-zebra de maneira dependente da dose. Nesta infecção, os macrófagos são a primeira linha de defesa e contribuem com os neutrófilos para eliminar a infecção. Os genes de citocinas pró-inflamatórias interleucina 1 β e o fator de necrose tumoral alfa foram regulados positivamente durante a infecção. Todas as larvas injetadas com mutante isogênico deficiente de T4SS HD sobreviveram durante todo o tempo de observação, apontando que o T4SS é de extrema importância para a replicação em larvas de peixe-zebra, assim como em outros modelos de infecção e em humanos (VIANA *et al.*, 2023).

5.5.4. Estresse oxidativo e inflamação

Outros estudos avaliaram o estresse oxidativo no modelo peixe-zebra. O estresse oxidativo consiste no desequilíbrio entre a produção e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células e tecidos (PIZZINO *et al.*, 2017; NUNES *et al.*, 2018) é um mecanismo subjacente a uma série de processos de toxicidade (LUNGU-MITEA *et al.*, 2018, NI *et al.*, 2020).

As ERO exercem muitas funções fisiológicas, como a sinalização celular sendo geralmente um subproduto do metabolismo do oxigênio, incluindo radicais superóxidos, radicais hidroxila e peróxidos de hidrogênio (NI *et al.*, 2020; PIZZINO *et al.*, 2017), contribuem com o desenvolvimento do sistema nervoso, da diferenciação e formação do nervo, do desenvolvimento do pulmão e do tecido vascular (NI *et al.*, 2020). O óxido nítrico (NO) é o radical livre mais conhecido como molécula sinalizadora da inflamação e substância microbicida (PIZZINO *et al.*, 2017). Isto posto, tanto o NO quanto as EROs são mediadores químicos para a inflamação.

A inflamação normalmente é uma resposta protetora a vários estímulos nocivos que contribui para a recuperação do dano tecidual, ou seja, demonstra respostas imunes importantes. Essas respostas imunes são mediadas principalmente pela regulação positiva das vias de sinalização do fator nuclear kappa-B (NF- κ B) e da proteína quinase ativada por mitógeno e a posterior secreção de mediadores pró-inflamatórios, incluindo NO, EROs, interleucina-6 (IL-6), IL-1 β e

fator de necrose tumoral- α (TNF- α), para manter a homeostase (KUANG *et al.*, 2022).

O estresse oxidativo causa modificações contra a estrutura do DNA, como ligações cruzadas de DNA-proteína, quebras de cadeia e locais livres de bases. Como exemplo, a inflamação crônica é fonte de danos oxidativos ao DNA. Além disso, o estresse oxidativo pode ser responsável pelo aparecimento e/ou progressão de várias doenças, como câncer, diabetes, distúrbios metabólicos, aterosclerose e doenças cardiovasculares (PIZZINO *et al.*, 2017). Os fatores ambientais como poluentes, tabagismo e xenobióticos podem aumentar a produção de ERO, levando a um desequilíbrio que posteriormente causa dano celular e tecidual, ou seja, o estresse oxidativo, afetando a viabilidade celular (PIZZINO *et al.*, 2017; NUNES *et al.*, 2018).

As células estabelecem um sistema de defesa antioxidante, composto principalmente por componentes enzimáticos, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, visando se proteger do dano celular estimulado por EROS (PARK *et al.*, 2023; PIZZINO *et al.*, 2017). Os peixes-zebras possuem defesas antioxidantes eficientes, compostas por diferentes enzimas antioxidantes como a catalase, glutathione S-transferase, os tióis não protéicos e ácido ascórbico (NUNES *et al.*, 2018).

Como exemplo, o estresse oxidativo em tuberculose foi um estudo feito por Ni *et al.* (2020), que avaliou os efeitos cardiológicos do fármaco isoniazida em embriões de peixe-zebra. A isoniazida é um fármaco anti-tuberculose, que atua inibindo o crescimento e a reprodução do bacilo da tuberculose pela produção de ERO e espécies reativas de nitrogênio. Neste estudo, o estresse oxidativo foi induzido pela isoniazida nos cardiomiócitos de embriões de peixe-zebra, avaliando as enzimas superóxido dismutase e catalase e o nível de malondialdeído, outro marcador de estresse oxidativo. Tendo como resultado a isoniazida causou malformação cardíaca congênita e a indução do estresse oxidativo depende da concentração de ERO. Em altas concentrações de ERO levou a diminuição das atividades da catalase e da superóxido dismutase, ou seja danos oxidativos, induzindo assim o estresse oxidativo e apoptose de cardiomiócitos durante o desenvolvimento do coração, a desregulação mitocondrial nas células, o que causa a oxidação de lipídios, proteínas

e ácidos nucleicos e destrói suas funções biológicas em embriões de peixe-zebra. O alívio do estresse oxidativo pode proteger o desenvolvimento cardíaco sob a exposição à isoniazida. As ERO são moléculas sinalizadoras importantes no processo de desenvolvimento embrionário.

Outros estudos do estresse oxidativo usando linhagens celulares de peixe-zebra concordam com os resultados de Ni *et al.* (2020), o aumento de ERO levou a danos oxidativos (AHMED *et al.*, 2023; PARK *et al.*, 2023), a diminuição da atividade da catalase e da superóxido dismutase (PARK *et al.*, 2023), a apoptose (PARK *et al.*, 2023), e as enzimas superóxido dismutase e catalase auxiliam para prevenir os danos oxidativos (AHMED *et al.*, 2023).

Além disso, os efeitos oxidativos causado pela exposição a pesticidas vem sendo bem explorado, devido a presença de misturas de pesticidas nos ambientes (LUNGU-MITEA *et al.*, 2018; NUNES *et al.*, 2018; CHAULET *et al.*, 2019; AHMED *et al.*, 2023; PARK *et al.*, 2023; MARTINS *et al.*, 2023) sendo assim uma questão de saúde pública.

No que tange a inflamação, o peixe-zebra é capaz de esclarecer as interações entre o sistema imunológico, o sistema nervoso e a microbiota. Devido principalmente a transparência óptica dos embriões e larvas do peixe-zebra, os estágios de desenvolvimento podem ser destacados com fluorescência que marca as células de interesse, facilitando a visualização das interações imunológicas, neurais e da microbiota em um vertebrado vivo intacto em tempo real, durante o desenvolvimento e em resposta à infecção ou lesão (LEVRAUD *et al.*, 2022).

O cérebro do peixe-zebra inicia a proliferação de neurônios substitutos. Ao incitar a inflamação sem dano neuronal, as células gliais radiais podem ser levadas à neurogênese (KYRITSIS *et al.*, 2012). Sendo capaz de regular positivamente os genes induzíveis por interferon gama (IFN- γ) e pela via de sinalização dos fatores transcricionais JAK-STAT (JAK= Janus quinase; STAT= fator ativador de transcrição e tradução). Além disso, o peixe-zebra têm a capacidade de regenerar células neurais e, portanto, é um modelo valioso para entender como a regeneração neural pode ocorrer na esperança de traduzir esse conhecimento em terapêuticas futuras para tratar lesões traumáticas do cérebro e da medula espinhal e distúrbios

neurodegenerativos. Um exemplo é o peixe-zebra adulto após uma lesão cerebral, na qual os leucócitos migram para os locais em há lesão, e as citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL1 β e IL-8) são expressas, sendo a própria inflamação que aumenta a proliferação de células neuroprogenitoras (KYRITSIS *et al.*, 2012).

Além disso, estudos têm investigado a atividade anti-inflamatória de compostos naturais. Como exemplo, o estudo feito por Kuang *et al.* (2022), analisou a fusaproliferina e seus analogos isolados de *Fusarium proliferatum*. Utilizaram embriões de peixe-zebra induzidos por lipopolissacarídeos para avaliar as propriedades anti-inflamatórias, através dos mediadores químicos da inflamação NO e EROs. Tendo um resultado dose-dependente para a fusaproliferina, que foi capaz de inibir a geração de NO e o acúmulo de EROs em embriões de peixe-zebra induzidos por lipopolissacarídeos (KUANG *et al.*, 2022).

Isto posto, outros estudos também investigaram compostos orgânicos como o esqualeno que diminuiu a intensidade de fluorescência das EROs, apresentando um efeito anti-inflamatório em modelo de peixe-zebra. E foi capaz de exercer um efeito antioxidante *in vivo* (ZHANG *et al.*, 2023). A cisteamina foi capaz de regular positivamente indicadores de estresse oxidativo, como as EROs, superóxido dismutase e malondialdeído (CHEN *et al.*, 2023). Além disso, o peixe-zebra também é usado para triagem de drogas, sendo capaz de revelar moduladores relacionados à inflamação (OPRIŞOREANU *et al.*, 2023).

Sendo assim, devido às suas características, o peixe-zebra é um modelo poderoso para explorar a profundidade e a complexidade das interações entre o sistema nervoso, o sistema imunológico e a microbiota que são importantes para manter a saúde do organismo em um vertebrado vivo , assim como, a importância do estresse oxidativo (LEVRAUD *et al.*, 2022).

Outras aplicações deste modelo podem ser encontradas na literatura e podem ser melhor abordadas em outro estudo.

6 CONCLUSÃO

Nesta revisão, foi observado que nos últimos anos, um modelo de peixe-zebra embrionário fornece flexibilidade na avaliação de toxicidade de substâncias. Trata-se de um dos peixes de água doce mais utilizados como modelo ecotoxicológico para estudo dos perfis de toxicidade induzida por nanomateriais e possui importantes funções ecológicas em seus ambientes naturais. Ainda, é amplamente utilizado como modelo de vertebrado para estudos de toxicologia, incluindo os efeitos de drogas e poluentes ambientais, incluindo microplásticos. A estratégia de usar modelos de xenoenxertos derivados de pacientes em peixe-zebra aprimorados pode ser empregada para acelerar a tomada de decisão de medicamentos personalizados. Além da pesquisa de fármacos e imunobiológicos, em relação à patogenicidade, a criação de peixe-zebra mutantes reproduzem doenças humanas, incluindo câncer, diabetes ou obesidade, doenças neurológicas e neuropsiquiátricas e patologias cardíacas. Sendo um excelente modelo para compreensão de doenças e seus mecanismos patogênicos.

REFERÊNCIAS

- ABRAMENKO, Natalia B.; DEMIDOVA, Tatiana B.; ABKHALIMOV, Evgeny V.; ERSHOV, Boris G.; KRYSANOV, Eugene Yu.; KUSTOV, Leonid M.. Ecotoxicity of different-shaped silver nanoparticles: case of zebrafish embryos. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 347, p. 89-94, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.060>.
- ADEYINKA, Adebayo.; MUCO, Erind.; PIERRE, Louisdon.. **Organophosphates**. [Updated 2022 Sep 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499860/>
- AHMED, Abdalmoiz I.M. *et al.* Short-term effects of the strobilurin fungicide dimoxystrobin on zebrafish gills: a morpho-functional study. **Chemosphere**, [S.L.], v. 333, n. 1, p. 138914, ago. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138914>.
- AKÇAN, Ramazan; AYDOGAN, Halit Canberk; YILDIRIM, Mahmut Şerif; TAŞTEKİN, Burak; SAĞLAM, Necdet. Nanotoxicity: a challenge for future medicine. **Turkish Journal Of Medical Sciences**, [S.L.], v. 50, n. 4, p. 1180-1196, 23 jun. 2020. The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK-ULAKBIM) - ,DIGITAL COMMONS JOURNALS. <http://dx.doi.org/10.3906/sag-1912-209>.
- ALEXANDRATOS, Nikos; BRUINSMA, Jelle. **World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision**. Esa Working Paper, 2012. Roma, FAO. Disponível em: <https://www.fao.org/3/ap106e/ap106e.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2023.
- AMES, Jaíne; MIRAGEM, Antônio Azambuja; CORDEIRO, Marcos Freitas; CEREZER, Felipe Osmari; LORO, Vania Lucia. Effects of glyphosate on zebrafish: a systematic review and meta-analysis. **Ecotoxicology**, [S.L.], v. 31, n. 8, p. 1189-1204, 5 set. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-022-02581-z>.
- ANTHONY, David Skerrett-Byrne; CHEN, Chen Jiang; NIXON, Brett; HONDERMARCK, Hubert. Transcriptomics. **Encyclopedia Of Cell Biology**, [S.L.], p. 363-371, 2023. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-821618-7.00157-7>.
- BELDEN, Jason B; A BRAIN, Richard. Incorporating the joint toxicity of co-applied pesticides into the ecological risk assessment process. **Integrated Environmental Assessment And Management**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 79-91, 28 jul. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ieam.1957>.
- BELLING, Helene Juul; HOFMEISTER, Wolfgang; ANDERSEN, Ditte Caroline. A Systematic Exposition of Methods used for Quantification of Heart Regeneration after Apex Resection in Zebrafish. **Cells**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 548, 26 fev. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells9030548>.
- BERTOZZI, Alberto *et al.* Wnt/ β -catenin signaling acts cell-autonomously to promote cardiomyocyte regeneration in the zebrafish heart. **Developmental Biology**, [S.L.], v.

481, p. 226-237, jan. 2022. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.11.001>.

BHAGAT, Jacky; ZANG, Liqing; NISHIMURA, Norihiro; SHIMADA, Yasuhito. Zebrafish: an emerging model to study microplastic and nanoplastic toxicity. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 728, p. 138707, ago. 2020. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138707>.

BRASIL, “Desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais faz parte da evolução científica” afirma coordenadora do Concea. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br>. Acesso em: 18 out. 2022.

BRASIL, Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Brasília, 2009. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6899.htm. Acesso em: 25 fev. 2022.

BRASIL, Lei 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. Brasília, 2008. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm. Acesso em: 24 mai, 2023.

BRASIL, Síntese de Evidências para Políticas de Saúde: estimulando o uso de evidências científicas na tomada de decisão. 2015. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sintese_evidencias_politicas_saude_1ed.pdf. Acesso em: 25 fev. 2022.

CALDERÓN-JIMÉNEZ, Bryan; JOHNSON, Monique E.; BUSTOS, Antonio R. Montoro; MURPHY, Karen E.; WINCHESTER, Michael R.; BAUDRIT, José R. Vega. Silver Nanoparticles: technological advances, societal impacts, and metrological challenges. **Frontiers In Chemistry**, [S.L.], 21 fev. 2017. Frontiers Media SA.
<http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2017.00006>.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, **National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases** (NCEZID), 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ncezid/who-we-are/index.html#:~:text=Infectious%20diseases%20are%20illnesses%20caused,from%20one%20person%20to%20another>. Acesso em: 23 jun. 2023.

CHAULET, Fabiele da Costa; BARCELLOS, Heloísa Helena de Alcantara; FIOR, Débora; POMPERMAIER, Aline; KOAKOSKI, Gessi; ROSA, João Gabriel Santos da; FAGUNDES, Michele; BARCELLOS, Leonardo José Gil. Glyphosate- and Fipronil-Based Agrochemicals and Their Mixtures Change Zebrafish Behavior. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, [S.L.], v. 77, n. 3, p.

443-451, 12 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00244-019-00644-7>

CHEN, Chao *et al.* Hepatic lipid metabolism disorders and immunotoxicity induced by cysteamine in early developmental stages of zebrafish. **Toxicology**, [S.L.], v. 493, p. 153555, jul. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2023.153555>.

CHEN, Xiaoyuan; WONG, Stephen T.C.. Cancer Theranostics. **Cancer Theranostics**, [S.L.], p. 3-8, 2014. Elsevier.
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-407722-5.00001-3>.

CHEN, Xingyu *et al.* Benefits of Zebrafish Xenograft Models in Cancer Research. **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, [S.L.], v. 9, n. 0, p. 1-14, 11 fev. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2021.616551>.

CLEMENTE, Zaira; SILVA, Gabriela Helena; NUNES, Miriam Celi de Souza; MARTINEZ, Diego Stéfani Teodoro; MAURER-MORELLI, Claudia Vianna; THOMAZ, Andre Alexandre; CASTRO, Vera Lúcia Scherholz Salgado. Exploring the mechanisms of graphene oxide behavioral and morphological changes in zebrafish. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 26, n. 29, p. 30508-30523, 28 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-019-05870-z>.

COLLINS Dictionary. Affibody. Disponível em:
<https://www.collinsdictionary.com/dictionary/english/affibody>. Acesso em: 30 mai, 2023.

COSTA, Bruna *et al.* Zebrafish Avatars towards Personalized Medicine—A Comparative Review between Avatar Models. **Cells**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 293, 25 jan. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells9020293>.

COPPOLA, Annapaola *et al.* Zebrafish as a Model of Cardiac Pathology and Toxicity: spotlight on uremic toxins. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 6, p. 5656, 16 mar. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24065656>.

CREAMER, Adam *et al.* Modular Synthesis of Semiconducting Graft Copolymers to Achieve “Clickable” Fluorescent Nanoparticles with Long Circulation and Specific Cancer Targeting. **Advanced Materials**, [S.L.], n. 1, p. 1, 2 abr. 2023. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/adma.202300413>.

CRNKO, Sandra *et al.* The circadian clock remains intact, but with dampened hormonal output in heart failure. **Ebiomedicine**, [S.L.], v. 91, p. 104556, maio 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104556>.

DALBEN, Djeisa; EMMEL, João Luís. A lei Arouca e os direitos dos animais utilizados em experimentos científicos. **Revista Eletrônica de Iniciação Científica**. Itajaí, Centro de Ciências Sociais e Jurídicas da UNIVALI. v. 4, n.4, p. 280-291, 2013. Disponível em:
<https://www.univali.br/graduacao/direito-itajai/publicacoes/revista-de-iniciacao-cientifica-ricc/edicoes/Lists/Artigos/Attachments/944/Arquivo%2016.pdf>. Acesso em: 18 out. 2022.

DAMICO, Francisco Max. Angiogênese e doenças da retina. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, [S.L.], v. 70, n. 3, p. 547-553, jun. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-27492007000300030>.

DIOGO, Patrícia *et al.* Type I Diabetes in Zebrafish Reduces Sperm Quality and Increases Insulin and Glucose Transporter Transcripts. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 8, p. 7035, 11 abr. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24087035>.

DOKE, Sonali K.; DHAWALE, Shashikant C.. Alternatives to animal testing: a review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 223-229, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>.

FARIA, Melissa; WU, Xiaona; LUJA-MONDRAGÓN, Marlenne; PRATS, Eva; GÓMEZ-OLIVÁN, Leobardo Manuel; PIÑA, Benjamin; RALDŔA, Demetrio. Screening anti-predator behaviour in fish larvae exposed to environmental pollutants. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 714, p. 136759, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136759>.

FARIA, Melissa; BELLOT, Marina; BEDROSSIANTZ, Juliette; RAMÍREZ, Jonathan Ricardo Rosas; PRATS, Eva; GARCIA-REYERO, Natalia; GOMEZ-CANELA, Cristian; MESTRES, Jordi; ROVIRA, Xavier; BARATA, Carlos. Environmental levels of carbaryl impair zebrafish larvae behaviour: the potential role of *adra2b* and *htr2b*. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 431, p. 128563, jun. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128563>.

FAO. 2022. Pesticides use, pesticides trade and pesticides indicators – Global, regional and country trends, 1990–2020. **FAOSTAT Analytical Briefs**, no. 46. Rome. <http://dx.doi.org/10.4060/cc0918en>.

FDA, Food and Drug Administration. FDA's Good Guidance Practices Regulation. EUA: Federal Register. v.65, n.182, 2000 / Disponível em: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2000-09-19/pdf/00-23887.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2022.

FDA, Food and Drug Administration. **Xenotransplantation**. Disponível em: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/xenotransplantation>. Acesso em: 08 mai. 2023.

FILIANO, Anthony J. *et al.* Unexpected role of interferon- γ in regulating neuronal connectivity and social behaviour. **Nature**, [S.L.], v. 535, n. 7612, p. 425-429, jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature18626>.

FUKUDA, Ryuichi *et al.* Stimulation of glycolysis promotes cardiomyocyte proliferation after injury in adult zebrafish. **Embo Reports**, [S.L.], v. 21, n. 8, p. 1, 9 jul. 2020. EMBO. <http://dx.doi.org/10.15252/embr.201949752>.

GALATAGE, Sunil T.; HEBALKAR, Aditya S.; DHOBAL, Shradhey V.; MALI, Omka R.; KUMBHAR, Pranav S.; NIKADE, Supriya V.; KILLEDAR, Suresh G.. Silver Nanoparticles: Properties, Synthesis, Characterization, Applications and Future Trends [Internet]. Silver Micro-Nanoparticles - Properties, Synthesis,

Characterization, and Applications. **IntechOpen**, London, United Kingdom, 2021. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.99173>

GAO, Libo; XIE, Zhigang; ZHENG, Min. Highly efficient carbon dots for quantitatively visualizing pH fluctuations in cells, zebrafish, mice and tumors. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 238, p. 112620, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112620>.

GARCIA, Eduardo Lanzagorta *et al.* Enhanced Antimicrobial Activity of Biocompatible Bacterial Cellulose Films via Dual Synergistic Action of Curcumin and Triangular Silver Nanoplates. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 20, p. 12198, 13 out. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232012198>.

GARCIA-PUIG, Anna *et al.* Proteomics Analysis of Extracellular Matrix Remodeling During Zebrafish Heart Regeneration. **Molecular & Cellular Proteomics**, [S.L.], v. 18, n. 9, p. 1745-1755, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.ra118.001193>.

GIOMMI, Christian *et al.* Metabolomic and Transcript Analysis Revealed a Sex-Specific Effect of Glyphosate in Zebrafish Liver. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 2724, 1 mar. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23052724>.

GONÇALVES, Íris Flávia Sousa; SOUZA, Terezinha Maria; VIEIRA, Leonardo Rogério; MARCHI, Filipi Calbaizer; NASCIMENTO, Adailton Pascoal; FARIAS, Davi Felipe. Toxicity testing of pesticides in zebrafish—a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 27, n. 10, p. 10185-10204, 15 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-020-07902-5>.

HIU, Jia Jin; YAP, Michelle Khai Khun. Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: phospholipase a2 and l-amino acid oxidase. **Biochemical Society Transactions**, [S.L.], v. 48, n. 2, p. 719-731, 8 abr. 2020. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bst20200110>.

HOFFMANN, Sebastian *et al.* A Systematic Review to Compare Chemical Hazard Predictions of the Zebrafish Embryotoxicity Test With Mammalian Prenatal Developmental Toxicity. **Toxicological Sciences**, [S.L.], v. 183, n. 1, p. 14-35, 9 jun. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfab072>.

HONKOOOP, Hessel *et al.* Single-cell analysis uncovers that metabolic reprogramming by ErbB2 signaling is essential for cardiomyocyte proliferation in the regenerating heart. **Elife**, [S.L.], v. 8, n. 0, p. 1-27, 23 dez. 2019. ELife Sciences Publications, Ltd. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.50163>.

HOWE, Kerstin; CLARK, Matthew D.; TORROJA, Carlos F.; TORRANCE, James; BERTHELOT, Camille; MUFFATO, Matthieu; COLLINS, John E.; HUMPHRAY, Sean; MCLAREN, Karen; MATTHEWS, Lucy. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, [S.L.], v. 496, n. 7446, p. 498-503,

17 abr. 2013. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/nature12111>.

HU, An *et al.* Curcumin-loaded graphene oxide quantum dots enhance otoprotective effects via blocking cuproptosis. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1, 19 abr. 2023. Frontiers Media SA.
<http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2023.1183197>.

HU, Bo *et al.* Origin and function of activated fibroblast states during zebrafish heart regeneration. **Nature Genetics**, [S.L.], v. 54, n. 8, p. 1227-1237, 21 jul. 2022. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41588-022-01129-5>.

ICH, International Council for Harmonisation (2020). Diretriz ICH S5 (R3) sobre toxicologia reprodutiva: Detecção de toxicidade reprodutiva para produtos farmacêuticos humanos - etapa 5. Disponível em:
<https://www.ema.europa.eu/en/ich-s5-r3-guideline-reproductive-toxicology-detecção-toxicidade-reprodução-humanos-farmacêuticos>. Acesso em: 18 out. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2020. Disponível em:
<https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao#:~:text=Para%20o%20Brasil%2C%20a%20estimativa,c%C3%A2ncer%20de%20pele%20n%C3%A3o%20melanoma>). Acesso em: 28 out. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). O que é câncer? Disponível em:
<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 28 out. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Registros de Câncer. Disponível em:
<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/registros>. Acesso em: 28 out. 2022.

JANEWAY CA Jr, *et al.* Immunobiologia: O Sistema Imunológico na Saúde e na Doença. 5 ed. Nova York: **Garland Science**; 2001. Citotoxicidade mediada por células T. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27101/>

JANZADEH, Atousa *et al.* Neurotoxicity of silver nanoparticles in the animal brain: a systematic review and meta-analysis. **Forensic Toxicology**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 49-63, 29 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11419-021-00589-4>.

JIN, Liying; WANG, Xiaosong; LIU, Xinyi; JIANG, Yuliang; SHEN, Jian. Preparation of novel fluorescent probe based on carbon dots for sensing and imaging Fe(III) and pyrophosphate in cells and zebrafish. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 414, n. 26, p. 7609-7622, 26 ago. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-022-04290-2>.

KANDATI, Kusuma *et al.* The Influence of Probiotics in Reducing Cisplatin-Induced Toxicity in Zebrafish (*Danio rerio*). **Current Microbiology**, [S.L.], v. 80, n. 4, p. 1, 18 fev. 2023. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00284-023-03203-5>.

KENDALL, Lon V; OWINY, James R; DOHM, Erik D; KNAPEK, Katie J; LEE, Erin s; KOPANKE, Jennifer H; FINK, Michael; A HANSEN, Sarah; AYERS, Jessica D. Replacement, Refinement, and Reduction in Animal Studies With Biohazardous Agents. **Ilar Journal**, [S.L.], v. 59, n. 2, p. 177-194, 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ilar/ily021>.

KLEIN, Jean-Philippe; MERY, Lionel; BOUDARD, Delphine; RAVEL, Célia; COTTIER, Michèle; BITOUNIS, Dimitrios. Impact of Nanoparticles on Male Fertility: what do we really know? a systematic review. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 576, 29 dez. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24010576>.

KOCERE, Agnese *et al.* Real-time imaging of polymersome nanoparticles in zebrafish embryos engrafted with melanoma cancer cells: localization, toxicity and treatment analysis. **Ebiomedicine**, [S.L.], v. 58, p. 102902, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102902>.

KUANG, Qi-Xuan *et al.* Investigation of the Anti-Inflammatory Activity of Fusaproliferin Analogues Guided by Transcriptome Analysis. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1, 5 maio 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2022.881182>.

KUBIŃSKI, Konrad; GÓRKA, Kamila; JANECKO, Monika; MARTYNA, Aleksandra; KWAŚNIK, Mateusz; MASIŃYK, Maciej; ZIĘBA, Emil; KOWALCZUK, Joanna; KUŚTROWSKI, Piotr; BORKOWSKI, Mariusz. Silver Is Not Equal to Silver: synthesis and evaluation of silver nanoparticles with low biological activity, and their incorporation into c12alanine-based hydrogel. **Molecules**, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 1194, 25 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28031194>.

LEVRAUD, Jean-Pierre *et al.* Using zebrafish to understand reciprocal interactions between the nervous and immune systems and the microbial world. **Journal Of Neuroinflammation**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1, 28 jun. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-022-02506-x>.

LIU, Tianju; SANTOS, Francina Gonzalez de Los; PHAN, Sem H.. The Bleomycin Model of Pulmonary Fibrosis. **Fibrosis**, [S.L.], p. 27-42, 2017. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_2.

LIU, Yuanbin; PETERSON, Daniel A.; KIMURA, Hideo; SCHUBERT, David. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 69, n. 2, p. 581-593, 18 nov. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x>.

LOGAN, Savannah L. *et al.* The *Vibrio cholerae* type VI secretion system can modulate host intestinal mechanics to displace gut bacterial symbionts. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 115, n. 16, p. 1, 2 abr. 2018. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1720133115>.

LOPES, Fernanda Moreira; SANDRINI, Juliana Zomer; SOUZA, Marta Marques. Toxicity induced by glyphosate and glyphosate-based herbicides in the zebrafish

hepatocyte cell line (ZF-L). **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 162, p. 201-207, out. 2018. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.005>.

LU, Jian; WANG, Weiguo; ZHANG, Cheng; XU, Wenping; CHEN, Weidong; TAO, Liming; LI, Zhong; CHENG, Jiagao; ZHANG, Yang. Characterization of glyphosate-induced cardiovascular toxicity and apoptosis in zebrafish. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 851, p. 158308, dez. 2022. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158308>.

LUNGU-MITEA, Sebastian *et al.* Development of an oxidative stress in vitro assay in zebrafish (*Danio rerio*) cell lines. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1, 17 ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-30880-1>.

LV, Lu; GAO, Zhongwen; MAO, Liangang; LIU, Xinju; WANG, Qiang; SHEN, Weifeng; WANG, Yanhua. Insights into the combined toxic impacts of phoxim and deltamethrin on the embryo-larval stage of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Sciences Europe**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 0-0, 13 set. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12302-022-00672-6>.

MAMOSHINA, Polina; RODRIGUEZ, Blanca; BUENO-OROVIO, Alfonso. Toward a broader view of mechanisms of drug cardiotoxicity. **Cell Reports Medicine**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 100216, mar. 2021. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100216>.

MARTINS, Illana Kemmerich *et al.* Exposure to Mancozeb results in increased MAPK phosphorylation and locomotor deficits in zebrafish larvae. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S.L.], v. 270, p. 109659, ago. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109659>.

MONTALVÃO, Mateus Flores; CHAGAS, Thales Quintão; RODRIGUES, Aline Sueli de Lima; GUIMARÃES, Abraão Tiago Batista; MALAFAIA, Guilherme. Long-term exposure of zebrafish juveniles to carbon nanofibers at predicted environmentally relevant concentrations: outspreading warns about ecotoxicological risks to freshwater fish. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 878, p. 163153, jun. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163153>.

MOREIRA, David. Orthologous Gene. **Encyclopedia Of Astrobiology**, [S.L.], p. 1-1, 2014. Springer Berlin Heidelberg.
http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-27833-4_1731-3.

National Institutes of Health (NIH). 9000 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20892. Disponível em: <https://www.ninds.nih.gov/health-information/disorders/neurotoxicity>. Acesso em 31 mai, 2023.

NC3Rs. National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of the Animals in Research. Disponível em: <https://www.nc3rs.org.uk/>. Acesso em 18 out 2022.

NCBI. Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia, Bethesda, MD EUA, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=animal+model>. Acesso em: 18 out. 2022

NEYLON, Jeremy; FULLER, Jarrad N.; POEL, Chris van Der; CHURCH, Jarrod E.; DWORKIN, Sebastian. Organophosphate Insecticide Toxicity in Neural Development, Cognition, Behaviour and Degeneration: insights from zebrafish. **Journal Of Developmental Biology**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 49, 21 nov. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jdb10040049>.

NI, Jie *et al.* Isoniazid causes heart looping disorder in zebrafish embryos by the induction of oxidative stress. **Bmc Pharmacology And Toxicology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1, 12 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40360-020-0399-2>.

NUNES, Leandro Silva *et al.* Reconstruction of regulatory network predicts transcription factors driving the dynamics of zebrafish heart regeneration. **Gene**, [S.L.], v. 819, p. 146242, abr. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2022.146242>.

NUNES, Mauro E.M. *et al.* Oxidative effects of the acute exposure to a pesticide mixture of cypermethrin and chlorpyrifos on carp and zebrafish – A comparative study. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S.L.], v. 206-207, n. 1, p. 48-53, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.03.002>.

OCDE (2013), Teste No. 236: Teste de Toxicidade Aguda em Embriões de Peixe (FET) , Diretrizes da OCDE para o Teste de Produtos Químicos, Seção 2, Publicação da OECD, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>.

OECD Chemicals Testing Guidelines (2012). Disponível em: http://www.oecd.org/departament/0,3355,en_2649_34377_1_1_1_1_1,00.html. Acesso em: 18 out. 2022.

OGI, Asahi; LICITRA, Rosario; NAEF, Valentina; MARCHESE, Maria; FRONTE, Baldassare; GAZZANO, Angelo; SANTORELLI, Filippo M.. Social Preference Tests in Zebrafish: a systematic review. **Frontiers In Veterinary Science**, [S.L.], v. 7, n. 0, p. 0-0, 22 jan. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2020.590057>.

OPRIȘOREANU, Ana-Maria *et al.* Drug screening in zebrafish larvae reveals inflammation-related modulators of secondary damage after spinal cord injury in mice. **Theranostics**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 2531-2551, 2023. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/thno.81332>.

PAIVA, J.T. *et al.* Epigenética: mecanismos, herança e implicações no melhoramento animal. **Archivos de Zootecnia**, [S.L.], v. 68, n. 262, p. 304-311, 15 abr. 2019. Cordoba University Press (UCOPress). <http://dx.doi.org/10.21071/az.v68i262.4151>.

PALLAVI, Pragya *et al.* Rhodamine-Conjugated Anti-Stokes Gold Nanoparticles with Higher ROS Quantum Yield as Theranostic Probe to Arrest Cancer and MDR Bacteria. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [S.L.], 28 mar. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-023-04475-0>.

PAOLO, Carolina di; HOFFMANN, Sebastian; WITTERS, Hilda; CARRILLO, Juan-Carlos. Minimum reporting standards based on a comprehensive review of the

zebrafish embryo teratogenicity assay. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 127, p. 105054, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.105054>.

PARICHY, David M. Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. **Elife**, [S.L.], v. 4, 25 mar. 2015. ELife Sciences Publications, Ltd. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.05635>.

PARICHY, David M.; POSTLETHWAIT, John H.. The biotic and abiotic environment of zebrafish. **Behavioral And Neural Genetics Of Zebrafish**, [S.L.], p. 3-16, 2020. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-817528-6.00001-2>.

PARK, Junho *et al.* Developmental defects induced by thiabendazole are mediated via apoptosis, oxidative stress and alteration in PI3K/Akt and MAPK pathways in zebrafish. **Environment International**, [S.L.], v. 176, n. 1, p. 107973, jun. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2023.107973>.

PASCHOALINO, Matheus P.; MARCONE, Glauciene P. S.; JARDIM, Wilson F.. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 421-430, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000200033>.

PATEL, Mubarak; ABATCHA, Salim; UTHMAN, Olalekan. Ethnic differences between South Asians and White Caucasians in cardiovascular disease-related mortality in developed countries: a systematic literature review. **Systematic Reviews**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-21, 29 set. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13643-022-02079-z>.

PENG, Xiangwen *et al.* Wnt2bb Induces Cardiomyocyte Proliferation in Zebrafish Hearts via the jnk1/c-jun/creb1 Pathway. **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1, 25 maio 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2020.00323>.

PIZZINO, Gabriele *et al.* Oxidative Stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2017, p. 1-13, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/8416763>.

PRATS, Eva *et al.* Modelling acrylamide acute neurotoxicity in zebrafish larvae. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 0-20, 24 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-14460-3>.

POON, Kar Lai; BRAND, Thomas. The zebrafish model system in cardiovascular research: a tiny fish with mighty prospects. **Global Cardiology Science And Practice**, [S.L.], v. 2013, n. 1, p. 4, mar. 2013. Global Cardiology Science and Practice. <http://dx.doi.org/10.5339/gcsp.2013.4>.

QU, Linkai *et al.* Improvement in Zebrafish with Diabetes and Alzheimer's Disease Treated with Pasteurized *Akkermansia muciniphila*. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], n. 1, p. 1, 16 maio 2023. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.00849-23>.

RANI-BORGES, Bárbara; VICENTE, Eduardo; POMPÊO, Marcelo. PLÁSTICOS E MICROPLÁSTICOS: POLUIÇÃO EM RESERVATÓRIOS. *In*: POMPÊO, Marcelo *et al*

(org.). **Aspectos da ecotoxicidade em ambientes aquáticos**. São Paulo: Instituto de Biociências – Ib/Usp Universidade de São Paulo, 2022. p. 1-23.

ROSA, João Gabriel Santos *et al.* An Overview towards Zebrafish Larvae as a Model for Ocular Diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 6, p. 5387, 11 mar. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24065387>.

SAIKI, Patrícia *et al.* Sediment toxicity assessment using zebrafish (*Danio rerio*) as a model system: historical review, research gaps and trends. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 793, p. 148633, nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148633>.

SAINI, Rajiv; SAINI, Santosh; SHARMA, Sugandha. Nanotechnology: the future medicine. **Journal Of Cutaneous And Aesthetic Surgery**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 32, 2010. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0974-2077.63301>.

SALEEM, Suraiya; KANNAN, Rajaretinam Rajesh. Zebrafish: an emerging real-time model system to study alzheimer's disease and neurospecific drug discovery. **Cell Death Discovery**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1, 3 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41420-018-0109-7>.

SARMIENTO, Beatriz E.; CALLEGARI, Santiago; GHOTME, Kemel A.; AKLE, Veronica. Patient-Derived Xenotransplant of CNS Neoplasms in Zebrafish: a systematic review. **Cells**, [S.L.], v. 11, n. 7, p. 1204, 2 abr. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells11071204>.

SCHWEIZER, Mona; BRILISAUER, Klaus; TRIEBSKORN, Rita; FORCHHAMMER, Karl; KÖHLER, Heinz-R.. How glyphosate and its associated acidity affect early development in zebrafish (*Danio rerio*). **PeerJ**, [S.L.], v. 7, p. 7094-0, 19 jun. 2019. PeerJ. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.7094>.

SELVARAJ, Chandrabose; SAKKIAH, Sugunadevi; TONG, Weida; HONG, Huixiao. Molecular dynamics simulations and applications in computational toxicology and nanotoxicology. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 112, p. 495-506, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.028>.

SEZER, Selda *et al.* Comparison of ZnO doped different phases TiO₂ nanoparticles in terms of toxicity using zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, [S.L.], v. 325, p. 138342, jun. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138342>.

SHARMA, Anket; KUMAR, Vinod; SHAHZAD, Babar; TANVEER, Mohsin; SIDHU, Gagan Preet Singh; HANDA, Neha; KOHLI, Sukhmeen Kaur; YADAV, Poonam; BALI, Aditi Shreeya; PARIHAR, Ripu Daman. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **Sn Applied Sciences**, [S.L.], v. 1, n. 11, p. 0-0, 21 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>.

SHI, Jiahui; ZHOU, Yunhao; NING, Juan; HU, Guizhen; ZHANG, Qingyou; HOU, Yabin; ZHOU, Yanmei. Prepared carbon dots from wheat straw for detection of Cu²⁺ in cells and zebrafish and room temperature phosphorescent anti-counterfeiting. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S.L.], v. 281, p. 121597, nov. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2022.121597>.

SIEBEL, A. M. BONAN, C. D. SILVA, R. S. Zebrafish como Modelo para Estudos Comportamentais. *In:RESENDE. RR Biotecnologia aplicada à saúde: Fundamentos e aplicações*, São Paulo, Ed. Blucher, v. 1, p. 1-611, 2015.

SILVEIRA, Themis Reverbel da; SCHNEIDER, Ana Claudia; HAMMES, Thais Ortiz. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, [S.L.], v. 64, n. 2, p. 4-5, jun. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.21800/s0009-67252012000200002>.

SIM, Yugyeong *et al.* Combined effects of microplastics and benz[a]anthracene on cardiotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) larvae: size matters. **Chemosphere**, [S.L.], v. 330, p. 138723, jul. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138723>.

SOUZA, Irisdoris Rodrigues de; SIVEK, Tainá Wilke; OLIVEIRA, Júlia Beatriz Vaz de; CANAVEZ, Andrezza di Pietro Micali; VITA, Natália de Albuquerque; SCHUCK, Desiree Cigaran; SOUZA, Isisdoris Rodrigues de; CESTARI, Marta Margarete; LORENCINI, Marcio; LEME, Daniela Morais. Cytotoxicity Assays with Zebrafish Cell Lines. **Journal Of Visualized Experiments**, [S.L.], n. 191, 6 jan. 2023. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/64860>.

SUN, Ping *et al.* Micro-Electrocardiograms to Study Post-Ventricular Amputation of Zebrafish Heart. **Annals Of Biomedical Engineering**, [S.L.], v. 37, n. 5, p. 890-901, 12 mar. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10439-009-9668-3>.

SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 71, n. 3, p. 209-249, 4 fev. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21660>.

SUURVÄLI, Jaanus; WHITELEY, Andrew R; ZHENG, Yichen; GHARBI, Karim; LEPTIN, Maria; WIEHE, Thomas. The Laboratory Domestication of Zebrafish: from diverse populations to inbred substrains. **Molecular Biology And Evolution**, [S.L.], v. 37, n. 4, p. 1056-1069, 6 dez. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msz289>.

TARAZONA, J.V.; RAMOS-PERALONSO, M.J.. Ecotoxicology. **Encyclopedia Of Toxicology**, [S.L.], p. 276-280, 2014. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-386454-3.00494-2>.

THAKKAR, Sweta *et al.* Endocrine-Disrupting Chemicals Exposure Alter Neuroendocrine Factors, Disrupt Cardiac Functions and Provokes Hypoxia Conditions in Zebrafish Model. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 201-213, 7 set. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-022-00955-2>.

TOLEDO, P. A importância do zebrafish para a avaliação toxicológica, um peixe que tem chamando a atenção da comunidade científica, foi tema da palestra de profissional do INCQS. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. FIOCRUZ, 2019. Disponível em:

https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1854:a-importancia-do-zebrafish-para-a-avaliacao-toxicologica-um-peixe-que-tem-chamando-a-atencao-da-comunidade-cientifica-e-foi-tema-da-palestra-de-profissional-do-incqs&catid=42&Itemid=132. Acesso em: 30 mai, 2023.

TORRES-RUIZ, Mónica *et al.* Neurotoxicity and endocrine disruption caused by polystyrene nanoparticles in zebrafish embryo. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 874, p. 162406, maio 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162406>.

TRANSCRIPTÔMICA. Referência Oxford. Recuperado em 4 de abril de 2023, em <https://www.oxfordreference.com/view/10.1093/oi/authority.20110803105320145>.

TUDI, Muyesaier; RUAN, Huada Daniel; WANG, Li; LYU, Jia; SADLER, Ross; CONNELL, Des; CHU, Cordia; PHUNG, Dung Tri. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 1112, 27 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph18031112>.

UFPB, Universidade Federal da Paraíba. Notícias: Pesquisadores da UFPB substituem ratos por peixes-zebra em experimentos. 2020. Disponível em: <https://www.ufpb.br/ufpb/contents/noticias/pesquisadores-da-ufpb-substituem-ratos-p-or-peixes-zebra-em-experimentos>. Acesso em: 29 nov. 2022.

VAN LEEUWEN, Lisanne M. *et al.* Modelling tuberculous meningitis in zebrafish using *Mycobacterium marinum*. **Disease Models & Mechanisms**, [S.L.], n. 1, p. 1, 1 jan. 2014. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.015453>.

VIANA, Flávia *et al.* Hiding in the yolk: a unique feature of legionella pneumophila infection of zebrafish. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 19, n. 5, p. 1011375, 8 maio 2023. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1011375>.

VOLKOV, Mikhail *et al.* Optical transparency and label-free vessel imaging of zebrafish larvae in shortwave infrared range as a tool for prolonged studying of cardiovascular system development. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1, 3 dez. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-25386-w>.

WANG, Lei; ZHU, Yuanhui; GU, Jie; YIN, Xiaogang; GUO, Liguu; QIAN, Lingling; SHI, Lili; GUO, Min; JI, Guixiang. The toxic effect of bisphenol AF and nanoplastic coexposure in parental and offspring generation zebrafish. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 251, p. 114565, fev. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114565>.

WANG, Shaoli *et al.* RNU12 inhibits gastric cancer progression via sponging miR-575 and targeting BLID. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1, 9 maio 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-34539-4>.

WANG, Xixin; COPMANS, Daniëlle; WITTE, Peter A. M. de. Using Zebrafish as a Disease Model to Study Fibrotic Disease. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 12, p. 6404, 15 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22126404>.

WANG, Yanhua; GAO, Zhongwen; LIU, Chuande; MAO, Liangang; LIU, Xinju; REN, Jindong; LU, Zeqi; YAO, Jie; LIU, Xuan. Mixture toxicity of pyraclostrobin and metiram to the zebrafish (*Danio rerio*) and its potential mechanism. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 30, n. 15, p. 44400-44414, 24 jan. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-023-25518-3>

WERTMAN, Jaime *et al.* The Zebrafish Xenograft Platform: evolution of a novel cancer model and preclinical screening tool. **Cancer And Zebrafish**, [S.L.], p. 289-314, 2016. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-30654-4_13.

WILES, Travis J *et al.* Host Gut Motility Promotes Competitive Exclusion within a Model Intestinal Microbiota. **Plos Biology**, [S.L.], v. 14, n. 7, p. 1002517, 26 jul. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1002517>.

WILSON, V. S.. A Novel Cell Line, MDA-kb2, That Stably Expresses an Androgen- and Glucocorticoid-Responsive Reporter for the Detection of Hormone Receptor Agonists and Antagonists. **Toxicological Sciences**, [S.L.], v. 66, n. 1, p. 69-81, 1 mar. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/66.1.69>.

WU, Chuntao *et al.* Assessment of stromal SCD-induced drug resistance of PDAC using 3D-printed zPDX model chips. **Iscience**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 105723, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2022.105723>.

WU, Jia-Qi *et al.* A systematical comparison of anti-angiogenesis and anti-cancer efficacy of ramucirumab, apatinib, regorafenib and cabozantinib in zebrafish model. **Life Sciences**, [S.L.], v. 247, p. 117402, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117402>.

WU, Qiong *et al.* Tanshinone-IIA-Based Analogues of Imidazole Alkaloid Act as Potent Inhibitors To Block Breast Cancer Invasion and Metastasis in Vivo. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 61, n. 23, p. 10488-10501, 6 nov. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01018>.

WU, Zekai *et al.* Single-cell analysis reveals an Angpt4-initiated EPDC-EC-CM cellular coordination cascade during heart regeneration. **Protein & Cell**, [S.L.], n. 1, p. 1, 18 maio 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1093/procel/pwac010>.

YEN, Jennifer; WHITE, Richard M; STEMPLE, Derek L. Zebrafish models of cancer: progress and future challenges. **Current Opinion In Genetics & Development**, [S.L.], v. 24, p. 38-45, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2013.11.003>.

ZHANG, Peng *et al.* Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Squalene in Copper Sulfate-Induced Inflammation in Zebrafish (*Danio rerio*). **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 10, p. 8518, 10 maio 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24108518>.

ZHANG, Weidong; WANG, Jiachao; SONG, Jianshi; FENG, Yanru; ZHANG, Shujuan; WANG, Na; LIU, Shufeng; SONG, Zhixue; LIAN, Kaoqi; KANG, Weijun. Effects of low-concentration glyphosate and aminomethyl phosphonic acid on zebrafish embryo development. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 226, p. 112854, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112854>.

ZHOU, Hailong; XIANG, Nan; XIE, Jia; DIAO, Xiaoping. Ecotoxicology: the history and present direction. **Encyclopedia Of Ecology**, [S.L.], p. 415-423, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.10888-7>.

ZON, Leonard. Modeling human diseases: an education in interactions and interdisciplinary approaches. **Disease Models & Mechanisms**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 597-600, 1 jun. 2016. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.025882>.

ZULAZMI, Nurul Atiqah; ARULSAM, Alina; ALI, Idrish; ABIDIN, Syafiq Asnawi Zainal; OTHMAN, Iekhsan; SHAIKH, Mohd. Farooq. The utilization of small non-mammals in traumatic brain injury research: a systematic review. **Cns Neuroscience & Therapeutics**, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 381-402, 4 fev. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cns.13590>.