

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

JOÃO MATEUS SILVA FEITOZA

PADRONIZAÇÃO DE RETINOPATIA EM LARVAS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Maceió-AL
2022

JOÃO MATEUS SILVA FEITOZA

PADRONIZAÇÃO DE RETINOPATIA EM LARVAS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação de Bacharelado em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr^a. Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira

Co-Orientador: Dr. João Gabriel dos Santos da Rosa

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

F311p Feitoza, João Mateus Silva.
Padronização de retinopatia em larvas de zebrafish (*Danio rerio*) / João Mateus Silva Feitoza. – Maceió, 2022.
64 f. : il.

Orientadora: Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira.

Co-orientador: João Gabriel dos Santos da Rosa.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 55-64.

1. Oftalmopatias. 2. Distrofias de cones e bastonetes. 3. Retinopatia diabética
4. Retinopatia da prematuridade. I. Título.

CDU: 597.5:617.73

"Nolite te bastardes carborundorum".

The Handmaid's Tale (2017).

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer e dedicar este trabalho à **minha família** e, em especial, à minha mãe/avó **Divina Silva**. Ela como mãe e magistrada me criou, incentivou os meus estudos e sempre me concedeu um lugar em suas orações.

É de desejo meu também agradecer aos exemplos que tive no ensino médio para seguir carreira dentro das Ciências Biológicas. Por isso, neste trabalho faço menção aos meus brilhantes professores **Ângela Barros, Luzenita Mallmann, Ebenézer Silva, Márcio Vila Nova** e **Fábio Calazans**. O meu tempo de 04 anos no IFAL foi muito enriquecedor, majoritariamente graças a estes professores e aos meus amigos de turma, ao qual agradeço o incentivo constante.

Em especial, gostaria de agradecer a minha amiga de longa data **Sayonara Assis**. Ela é e tem sido um grande incentivo para mim, como bióloga, cientista, sonhadora e conterrânea. À minha amiga **Fernanda Lima**, que junto comigo iniciou uma jornada de estudos e pesquisa científica, ao qual fomos confidentes de muitas dificuldades nesse caminho. Às minhas amigas **Renata Ferreira** e **Rebeca Barboza**, parceiras no meu primeiro laboratório de pesquisa e participantes de muitos momentos desafiadores na minha graduação. À **Daniela Santos, Mirna Silva** e **Sandra Silva**, que também sempre apoiaram o meu crescimento e sonhos.

Não poderia deixar de citar a minha turma excepcional de graduação, carinhosamente conhecida como "**Perdidos do ICBS**". O meu carinho a cada um de vocês que me permitiram guardar momentos memoráveis e, até mesmo os perrengues, tornaram-se motivo de riso para nós. Espero em breve que todos sejamos colegas de profissão. Destaco entre eles o meu grupo fixo de trabalho: **Fernando Silva, Jhenifer Paz, Rebeca Alves** e **Arthur Silva**. Agradeço a paciência comigo e a parceria. Vocês sempre tornaram tudo mais fácil. À **Rebeca** e **Arthur**, menciono ainda o nosso trio de estudos. As tardes de riso na biblioteca, as madrugadas de revisão, as pipocas "Gula" e os cafés para aguentar o rojão, as cantorias, músicas clássicas, os encontros no Google meet e tantos outros eventos que guardo carinhosamente no coração.

Sou grato também a minha amiga, consultora e confidente **Aline Gabriely**, que em muitos momentos foi fundamental para o meu bom desempenho na graduação. Agradeço aos meus amigos revisores de carta de intenção/motivação **Celson Vinicius** e **Arthur Bertoldo**, pessoas que sempre me ajudaram a tornar possível a minha expansão pelo país. O que me faz lembrar dos **meus amigos adquiridos em viagens acadêmicas**. Vocês são muitos, mas saibam que são exemplos de profissionais para mim e uma esperança para a ciência no Brasil.

Aqui, uma menção mais que especial a alguém que tornou quase que literalmente possível à existência deste trabalho escrito: **Thiago Vidotto** e à sua empresa **Word-aid**. Obrigado por ter me ensinado com maturidade sobre pensamento crítico e científico, ciência e, principalmente, escrita científica. Foi e é uma honra ser seu aluno, parceiro de trabalho e amigo.

Agradeço também às diferentes gestões da **Coordenação, Colegiado e Centro Acadêmico** do meu curso que, em muitos momentos, foram solícitos a mim e participantes ativos em muitas das minhas conquistas ao longo da graduação. Sou grato também a todos os meus professores de graduação que contribuíram muito com a minha formação acadêmica. Deixo registrado um salve especial também a equipe da POLC/AL: **Rosana, Bárbara, Carmélia, Marek e Marina**. Vocês me forneceram uma experiência incrível durante o estágio supervisionado 1.

Agradeço também à **ESIB** e à(o)s Dr(as). **Mônica Lopes, João Gabriel e Carla Lima** pelo estágio supervisionado 2 realizado no LETA, onde enriqueci o meu conhecimento sobre ciência e que possibilitou de fato a realização deste TCC. E aos amigos que conquistei nele: **Lorena Aguiar, Guilherme Martins, Felipe Pinto, Thauany Barbace, Gláucia Pereira, Vinicius Cavalheiro e Yasmin Costa**. Fica aqui também toda a minha gratidão à equipe do LETA: **Aline Barros, Wilton Souza, Jefferson Bernardo, Viviane Cunha** e Dr. **Geonildo Disner**. Vocês tornaram essa jornada mais proveitosa e muito me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço também às redes de fomento **Fundepes e CNPq** que, ao longo do meu curso superior, possibilitaram não somente a sua execução e finalização, mas também conquistas pessoais e acadêmicas; e à **FAPESP**, órgão de apoio fundamental e sem o qual este trabalho não seria possível. E agradecer também a todos aqueles que tiveram um papel mesmo que mínimo, mas positivo para que eu enfim chegasse a este ponto. A vocês ofereço o meu eterno obrigado.

RESUMO

As retinopatias são distúrbios que causam a perda progressiva da capacidade visual, podendo levar à perda total da visão e, atualmente, representam um problema de saúde pública. Além do desafio do desenvolvimento de novas terapias para essa doença, a aplicação de um modelo ideal para pesquisas oculares é outra lacuna na área. Com isso, a larva de *Danio rerio* tem sido apontada como um potencial substituto para a investigação de problemas oftalmológicos graças a vantagens, como: homologia visual; desenvolvimento prematuro do olho; resposta visual precoce e comportamento diurno, semelhante aos humanos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi padronizar diferentes métodos de indução de retinopatia em larvas de zebrafish a fim de testar novas terapias oculares. Inicialmente, embriões de zebrafish foram obtidos a partir do cruzamento de peixes adultos. Estes foram incubados em meio E2A 0,5x ou PTU 0,001% e armazenados em estufa a 28 °C até o estágio de 72 hpf. A indução de retinopatia ocorreu por: (1) exposição de larvas por 72h a uma solução de CoCl_2 0,5 mM; e (2) retenção de larvas em escuro total durante 24h (grupo LIRD), seguido de exposição à luz intensa por 24h. Para o controle foram consideradas larvas cultivadas no meio E2A ou PTU sob fotoperíodo normal e a sobrevivência dos grupos foi observada diariamente. Após os tratamentos, realizou-se o Teste de Resposta Visual Motora (VMR), que consistiu de um período de aclimação de 15 min em luz, seguido por 6 ciclos alternados de claro-escuro. Como parâmetro comportamental, o deslocamento dos indivíduos durante o teste foi mensurado e registrado. Após o VMR, foi realizada a eutanásia das larvas com exposição à triclaína a 4%. Em seguida, realizou-se o processo de fixação em formol 4%, desidratação, reidratação e incubação em sucrose 30% para o preparo de lâminas histológicas, e as larvas seccionadas foram coradas com Hematoxilina-Eosina. Para a identificação de alterações na retina de zebrafish, a espessura das camadas retinianas foi medida e a análise estatística foi reproduzida, considerando o valor de $p < 0,05$ como significativo. As larvas presentes nas soluções de incubamento (E2A e PTU) e tratamento (CoCl_2) apresentaram baixa mortalidade. O VMR demonstrou que todos os grupos tratados, com exceção do LIRD incubado em PTU, apresentaram um menor deslocamento do que os controles, sugerindo alterações do comportamento visual das larvas tratadas. No grupo LIRD, a diferença entre as camadas retinianas se mostrou significativa: na Camada de Fotorreceptores, onde a espessura do grupo LIRD foi menor que a do controle; e nas Camadas Plexiforme Interna e Ganglionar, onde a espessura do grupo LIRD foi maior que a do grupo controle. Já nas larvas em que a retinopatia foi induzida por CoCl_2 , a diferença estatística foi registrada apenas na Camada Plexiforme Externa, onde a espessura dessa camada no grupo tratado estava maior do que a do controle. Com isso, os resultados sugerem que os protocolos realizados parecem ser eficazes para a indução de retinopatia em larvas de zebrafish, corroborando com o uso desse modelo como alternativa para estudos terapêuticos de doenças oftalmológicas. Assim, zebrafish em seu estágio larval pode tornar-se canônico como modelo para o estudo de doenças oculares.

Palavras-Chave: Doenças oculares; Comportamento visual; Degeneração da retina; Retinopatia; Larvas; Paulistinha.

ABSTRACT

Retinopathy is an illness that causes the progressive loss of eyesight. It can lead to total vision loss which currently presents a public health problem. Beyond the challenge of developing new therapies for this disease, ocular researchers cannot count on an ideal model to further their studies. Therefore, *Danio rerio* larvae has been appointed as a potential substitute for the investigation of ophthalmological problems due to advantages, such as: visual homology; early eye development; early visual response and diurnal behavior, similar to those of human's. Thus, the goal of this thesis was to standardize different methods of retinopathy induction in zebrafish larvae in order to test new ocular therapies. At first, zebrafish eggs were generated from crossing adult fish. These were incubated in E2A 0.5x or PTU 0.001% environment and stored in an oven at 28 °C for up to 72 hpf. The retinopathy induction occurred by: (1) exposure of larvae for 72h in a CoCl_2 0.5 mM solution; and (2) retention of larvae in total darkness for 24h (LIRD group), followed by intense light exposition for 24h. The control group included larvae cultivated in the E2A or PTU environment under normal photoperiod, and the survival of the groups was observed daily. Following the treatments, the Visual Motor Response (VMR) Test was performed, which consisted of one period of acclimatization for 15 min under light, followed by 6 alternating clear-dark cycles. The individual displacement during the test was measured and registered in order to be used as a behavioral parameter. After the VMR, euthanasia of the larvae was conducted by exposing them to 4% tricaine. Afterwards, the process included the fixation in 4% formalin, dehydration, rehydration, and incubation in 30% sucrose for the preparation of histological slides, then the sectioned larvae were tinted with Hematoxylin-eosin. To identify the changes in the zebrafish retina, the thickness of retinal layers was measured and statistical analysis was performed, considering the $p < 0.05$ value as significant. The larvae in the incubating solutions (E2A e PTU) and treatment (CoCl_2) showed low mortality. The VMR demonstrated that all treated groups, except for the PTU-incubated LIRD, showed a smaller displacement of the controls, suggesting alterations in visual behavior of treated larvae. In the LIRD group, the difference between the retinal layers showed to be significant: in the Photoreceptor Layer, where the LIRD group thickness was smaller than the control's; and in the Inner Plexiform and Ganglion Layers, where the LIRD group thickness was higher than control group. However, concerning the larvae on which the retinopathy was induced by CoCl_2 , the statistical difference was observed only in the Outer Plexiform Layer, where the layer thickness in the treated group was higher than the control's. Therefore, the results suggest that the protocols performed seem to be effective for the induction of retinopathy in zebrafish larvae, corroborating with the use of this model as alternative for therapeutic studies of ophthalmological diseases. Thus, zebrafish in your larval stage can be canonical as a model to study of ocular diseases.

Keywords: Ocular diseases; Retinal degeneration; Retinopathy; Larvae; Paulistinha.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01 - Classificação taxonômica de zebrafish (<i>D. rerio</i>).....	14
FIGURA 02 - Dimorfismo sexual em <i>D. rerio</i>	15
FIGURA 03 - Via fisiológica da liberação dos gametas em zebrafish (via hipotalâmica-pituitária-gonadal).....	17
FIGURA 04 - Estrutura do embrião de zebrafish.....	18
FIGURA 05 - Esquema do desenvolvimento embrionário do zebrafish.....	19
FIGURA 06 - Anatomia da larva de <i>D. rerio</i> no estágio de 96 hpf.....	20
FIGURA 07 - Anatomia de <i>D. rerio</i> na idade adulta.....	21
FIGURA 08 - Organogênese da retina de zebrafish e humanos.....	23
FIGURA 09 - Diferenças morfológicas entre o olho humano e o de <i>D. rerio</i>	24
FIGURA 10 - Composição celular básica e simultânea do olho de zebrafish e humanos.....	26
FIGURA 11 - Camadas Celulares da retina de <i>D. rerio</i>	27
FIGURA 12 - Órgãos conservados entre humanos e zebrafish.....	28
FIGURA 13 - Principais tipos de Retinopatia.....	32
FIGURA 14 - Esquema temporal do experimento de Retinopatia Induzida por Luz (LIRD) nas larvas de zebrafish.....	37
FIGURA 15 - Esquema temporal da exposição de larvas de zebrafish à Cloreto de Cobalto para indução de retinopatia via hipóxia.....	37
FIGURA 16 - Esquema representativo da disposição das larvas no Teste de VMR.....	38
FIGURA 17 - Esquema representativo da performance do Teste de VMR.....	39
FIGURA 18 - Esquema representativo do gráfico gerado a partir do Teste de VMR.....	39
FIGURA 19 - Fluxograma da metodologia aplicada no presente trabalho.....	42
FIGURA 20 - Fisiopatologia da Retinopatia Induzida por Luz (LIRD) e por Hipóxia.....	50

LISTA DE PAINÉIS

PAINEL 01 - Gráficos de Sobrevivência de larvas expostas à luz.....	43
PAINEL 02 - Gráficos de Sobrevivência de larvas expostas à solução de Cloreto de Cobalto (CoCl ₂).....	44
PAINEL 03 - Gráficos da Resposta Visual Motora (VMR) das larvas expostas à solução de 0,5 CoCl ₂ mM.....	45
PAINEL 04 - Gráficos da Resposta Visual Motora (VMR) das larvas expostas à luz.....	46
PAINEL 05 - Corte histológico da retina das larvas do experimento de Retinopatia Induzida por Luz.....	47
PAINEL 06 - Corte histológico da retina das larvas do experimento de Retinopatia Induzida por CoCl ₂	48
PAINEL 07 - Gráficos da espessura das camadas da retina das larvas expostas à luz.....	51
PAINEL 08 - Gráficos da espessura das camadas da retina das larvas expostas à solução de CoCl ₂ 0,5 mM.....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Descrição dos principais sistemas de <i>D. rerio</i>	22
TABELA 02 - Principais diferenças entre o olho humano e o de <i>D. rerio</i>	24
TABELA 03 - Vantagens e limitações de <i>D. rerio</i> como organismo modelo.....	29
TABELA 04 - Diluição de álcoois para desidratação e hidratação histológica.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CoCl₂ - Cloreto de Cobalto

dpf - Dias pós-fertilização

DR - Retinopatia Diabética

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

GCL - Camada de Células Ganglionares

GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofina

HE - Hematoxilina-Eosina

hpe - Horas pós-exposição

HIF1 α - Fator Induzível por Hipóxia 1 alfa

hpf - Horas pós-fertilização

HPG - Hipotalâmica-pituitária-gonadal

INL - Camada Nuclear Interna (*Inner Nuclear Layer*)

IPL - Camada Plexiforme Interna (*Inner Plexiform Layer*)

IS - Segmento Interno (*Inner Segment*)

LH - Hormônio Luteinizante

LIRD - Degeneração da Retina Induzida por Luz (*Light-Induced Retinal Degeneration*)

NaCl - Cloreto de Sódio

ONL - Camada Nuclear Externa (*Outer Nuclear Layer*)

OPL - Camada Plexiforme Externa (*Outer Plexiform Layer*)

OMR - Resposta Optomotora (*Optomotor Response*)

OS - Segmento Externo (*Outer Segment*)

PRL - Camada de Fotorreceptores (*Photoreceptors Layer*)

PTU - N-Phenylthiourea

ROP - Retinopatia da Prematuridade (*Retinopathy of Prematurity*)

RPE - Epitélio Pigmentado da Retina

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VMR - Resposta Visual Motora

WT AB - Wild-Type AB

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 Origem, Biologia e Criação de Zebrafish.....	14
3.2 Reprodução, Desenvolvimento embrionário e Anatomia de Zebrafish.....	16
3.3 Desenvolvimento e Composição da Retina e Fisiologia da Visão de <i>D. rerio</i>	22
3.4 Zebrafish Como Sistema Modelo Para Doenças Oculares.....	27
3.5 Tipos e Formas de Indução de Retinopatias.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Tipo e Local de Estudo.....	34
4.2 Criação de Zebrafish e Obtenção de Embriões.....	34
4.3 Indução de Retinopatia em Larvas de Zebrafish.....	35
4.4 Avaliação de Comportamento Visual de Zebrafish.....	37
4.5 Preparação Histológica das Larvas de Zebrafish.....	39
4.6 Avaliação das Camadas Retinianas.....	41
4.7 Análises Estatísticas.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

A retinopatia consiste em um termo genérico utilizado para designar qualquer lesão que ocorra na porção da retina do olho, podendo apresentar um quadro mais grave quando induz cegueira (CORRÊA; EAGLE, 2005). Esta patologia está associada com desordens causadas nos mecanismos de inflamação e de resposta imune inata e pode ser classificada de diferentes formas, como Retinopatia Diabética (DR), Retinopatia da Prematuridade (ROP) e Retinopatia Induzida por Luz (LI; FU; LO, 2012; POLOSA; BESSAKLIA; LACHAPELLE, 2016; CHRZANOWSKA; MODRZEJEWSKA; MODRZEJEWSKA, 2018). Desta forma, considerando que doenças visuais são um problema internacional de saúde pública e de urgência terapêutica, padrões metodológicos eficazes de estudo já estabelecidos precisam ser reproduzíveis, testados e padronizados com o intuito de avançar em etapas de estudos biomédicos.

O zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe ornamental que tem sido utilizado em pesquisas biomédicas de maneira complementar a estudos com experimentação animal, apresentando-se como um potencial substituto de organismos modelos clássicos (BAILEY; OLIVERI; LEVIN, 2013; YAO; WANG; WANG, 2020). Isso se deve a uma série de características intrínsecas, tais como: rápido desenvolvimento embrionário e organogênese acelerada, transparência durante o estágio embrio-larval, homologia significativa com humanos e fácil manipulação genética (BROWN *et al.*, 2016). No entanto, atualmente é preferível a utilização de embriões e larvas de *D. rerio* ao invés de espécimes adultos, o que pode exigir uma adequação no delineamento experimental de estudos que utilizam esse modelo (LESSMAN, 2011; BELANGER; RAWLINGS; CARR, 2013).

Graças a ectogênese do embrião de zebrafish, todos os seus órgãos, incluindo os olhos, estão formados aproximadamente após 72h da fertilização do seu ovo (KIMMEL *et al.*, 1995). Nesta fase, a retina da larva do peixe-zebra se assemelha com a dos humanos em função e estrutura, além de já apresentar um tamanho consideravelmente grande, o que facilita a sua manipulação e caracteriza essa espécie como ideal para pesquisas oftalmológicas (BABICH; VAN BENEDEN, 2019; SHEN; ZUO, 2020). De acordo com Strähle e colaboradores (2012), larvas de zebrafish de até 120 hpf não estão submetidas à diretiva da União Europeia de bem-estar animal (EU 2010/63/EU). Assim, experimentos neste estágio são considerados *in vitro*, o que atende a princípios de refinamento animal e corrobora com a potencial padronização da

larva de zebrafish como modelo para estudos oculares (SCHOLZ *et al.*, 2013; WAN; GOLDMAN, 2016; DANG; VAN DER VEN; KIENHUIS, 2017).

Considerando a urgência do desenvolvimento de novos tratamentos terapêuticos para várias doenças, a aplicação de biomodelos ainda é necessária (TEAM *et al.*, 2019). Além disso, apesar de pesquisas biomédicas serem majoritariamente desenvolvidas com mamíferos, métodos alternativos precisam ser desenvolvidos visando o custo-benefício (STRÄHLE *et al.*, 2012). Com isso, a larva de zebrafish tem se mostrado um modelo emergente, tendo um impacto positivo na redução animal durante a experimentação (ROSA; LIMA; LOPES-FERREIRA, 2022). Por isso, o presente trabalho procurou estabelecer métodos de indução de retinopatia em larvas de zebrafish.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Padronizar larvas de zebrafish (*Danio rerio*) como sistema modelo para o estudo de retinopatias.

2.2 Objetivos Específicos

- Induzir retinopatia em larvas de zebrafish por diferentes métodos;
- Avaliar as diferentes anomalias na retina de *D. rerio* estimuladas pelos agentes indutores de retinopatia;
- Estimar a viabilidade de larvas de zebrafish como sistema modelo para o estudo de retinopatias;
- Padronizar no laboratório o uso de um ou todos os métodos de indução de retinopatia avaliados em larvas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Origem, Biologia e Criação de Zebrafish

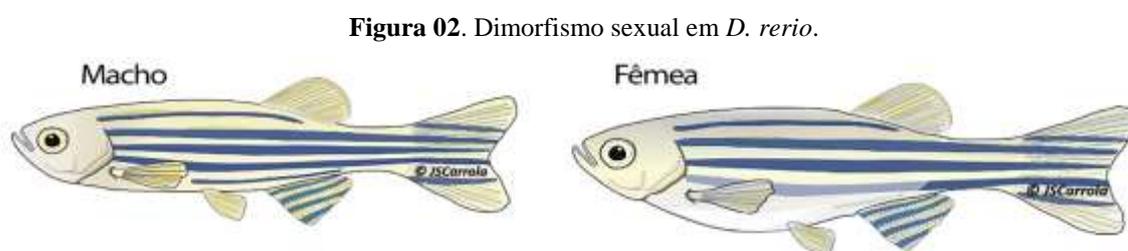
O zebrafish, como é popularmente conhecido, é um peixe tropical de água doce da Ordem Cypriniformes e de epíteto específico *Danio rerio* (NELSON, 1994; SCHNEIDER *et al.*, 2009). De maneira mais formal, ele é designado como *Brachydanio rerio* (LAALE, 1997) e a sua classificação taxonômica pode ser observada na **Figura 01**. Fora da comunidade acadêmica, o zebrafish pode ser conhecido por diversos nomes populares, como: peixe-zebra, paulistinha e bandeirinha (CARDOSO *et al.*, 2021; PERILLO *et al.*, 2018; SILVEIRA, SCHNEIDER; HAMMES, 2012). Estas nomenclaturas estão associadas com a anatomia deste peixe, além da sua semelhança com a bandeira do Estado de São Paulo (MANSUR, 2014).

Figura 01. Classificação taxonômica do zebrafish (*D. rerio*).



Fonte: João Mateus (2022).

O *D. rerio* é oriundo da Ásia, onde habita alagações de plantações de arroz com águas turvas, calmas e escuras, principalmente em rios da Índia, Bangladesh e Nepal (ARUNACHALAM *et al.*, 2013). Desenvolve-se rápido e pode chegar à idade adulta dentro de 4 meses, apresentando um tamanho médio de 3-5 cm (LOPES-FERREIRA *et al.*, 2021). Neste estágio - e somente a partir dele -, os espécimes de zebrafish apresentam dimorfismo sexual (RODRÍGUEZ, 2016). Os machos são mais delgados, com barbatanas de tonalidade amarelo intenso e de abdome achatado, enquanto as fêmeas são mais robustas, maiores e com abdome prateado e alargado, devido ao grande volume de seu ovário (KOSSACK; DRAPER, 2019; RUHL; MAACK; SEGNER, 2003; MCROBERT; CURRIE, 2009). Outra característica perceptível é a continuidade das listras na região abdominal do peixe-macho, o que não ocorre na fêmea, como demonstrado na **Figura 02**.



Padrão de 5-7 listras presentes no corpo plano de zebrafish e dimorfismo sexual evidente pela protuberância abdominal na fêmea (característica ausente no macho). **Fonte:** Ribeiro *et al.* (2022).

O zebrafish é um animal social e, por isso, vive em cardumes de até 20 peixes (SAVERINO; GERLAI, 2008). Possui hábito predatório e é um animal onívoro e eurifágico, sendo a sua alimentação baseada principalmente no consumo de zooplânctons, fitoplânctons e insetos (SPENCE *et al.*, 2007). Na natureza, estes peixes apresentam uma tolerância térmica demasiada, podendo viver na faixa de 24-36,5 °C e com pH 7,0 (LAWRENCE, 2007). No entanto, para fins de reprodução, eles preferem habitar ambientes com águas rasas, vegetadas e com uma temperatura ideal de 28 °C (SESSA *et al.*, 2008; LAWRENCE, 2007).

O peixe-zebra é muito conhecido por ser uma espécie ornamental e a sua expectativa de vida é de até 4 anos, tendo sua fase reprodutiva ocorrendo de maneira contínua durante toda a sua maturidade sexual (NAZARIO, 2016; nascimento, 2019). Tem hábito diurno, apresentando uma maior taxa de atividade no período matutino (PONTES; COSTA, 2017; ZHDANOVA, 2011). No Brasil, a linhagem mais empregada e a única permitida em estudos biomédicos é a Wild-Type AB (WT/AB), pois a comercialização de linhagens transgênicas em território nacional é ilegal (MAGALHÃES *et al.*, 2020). Esta linhagem pôde dar origem às demais e, portanto, possui um maior background genético e uma melhor adaptação à

variação ambiental (NASIADKA; CLARK, 2012; VIGNET *et al.*, 2013; PFEFFERLI; JAZWIŃSKA, 2017).

A criação de *D. rerio* é possível devido a sua alta capacidade de aclimação e resistência a variantes ambientais (HOSSEINI *et al.*, 2019). Entretanto, algumas condições de manejo dentro do biotério podem diferir daquelas que ocorrem no ambiente natural (PONTES; COSTA, 2017). Em biotério, por exemplo, os peixes se reproduzem ao longo de todo o ano, com curtos espaçamentos temporais entre as reproduções, enquanto no meio ambiente eles estão sujeitos à sazonalidade (REZENDE, 2013; SPENCE *et al.*, 2008). Em condições controladas, o acasalamento é performado de tal forma a mimetizar o seu ambiente natural. Os aquários tendem possuir uma coloração mais azul escura, com ornamentações artificiais de plantas, e a reprodução ocorre em uma proporção de 02 machos para uma fêmea devido ao seu comportamento de disputa (SILVA, 2020).

Em um ambiente artificial também é necessário fornecer ao zebrafish uma dieta alternada entre ração seca e alimentos vivos, mantendo a sua qualidade de vida (AVDESH *et al.*, 2012). Nos viveiros, geralmente, o alimento processado consiste em rações comerciais de lojas de aquicultura, enquanto a nutrição orgânica pode variar entre náuplios de artêmias e cultura de *Paramecium* (CARVALHO; ARAÚJO; SANTOS, 2006). Outras variáveis importantes a serem controladas é a qualidade da água, a dureza da água e o fotoperíodo, pois afetam de maneira direta o desenvolvimento e reprodução destes peixes (BLANCO-VIVES; SANCHEZ-VAZQUEZ, 2009; PONTES; COSTA, 2017).

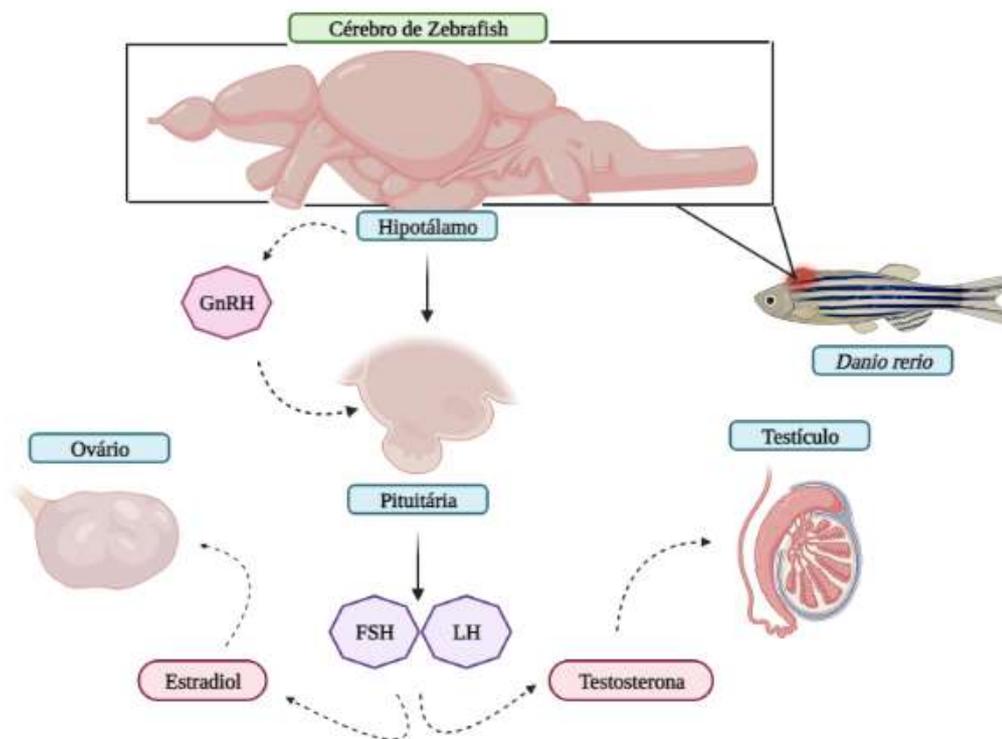
3.2 Reprodução, Desenvolvimento Embrionário e Anatomia de Zebrafish

A maturidade sexual do *D. rerio* ocorre por volta de 3-6 meses após a fertilização do seu embrião (CLELLAND; PENG, 2009; SPENCE *et al.*, 2008). O zebrafish é conhecido por ser um peixe r-estrategista, isto é, possui desova numerosa e prolongada, com pouco ou nenhum cuidado parental (EGGE, 2008). Por isso, os intervalos entre os períodos reprodutivos nesta espécie são curtos (NUSSLEIN-VOLHARD; DAHM, 2002). Sua reprodução acontece por ovuliparidade e a fecundação dos seus gametas ocorre de maneira ex utero (HOO *et al.*, 2016; PICHLER *et al.*, 2003). Ademais, existe entre eles o hábito de consumir seus ovos (BILOTTA *et al.*, 1999).

A reprodução de *D. rerio* é estimulada por um fotoperíodo positivo, ou seja, quando o período de luz é maior que o período escuro (ABDOLLAHPOUR; FALAHATKAR;

LAWRENCE, 2020). Fisiologicamente, isto é importante devido à via pela qual os peixes são estimulados a liberarem seus gametas: a via Hipotalâmica-Pituitária-Gonadal - HPG (LIU *et al.*, 2011), representada na **Figura 03**. Na presença de luz, o hipotálamo produz o Hormônio Liberador de Gonadotrofina (**GnRH**), que induz a glândula pituitária a produzir os hormônios Folículo Estimulante - **FSH** - e Luteinizante - **LH** (THOMPSON; KAISER, 2014). Nas **fêmeas de peixe**, o FSH induz o crescimento de folículos e a produção de estradiol a partir deles (BURGER *et al.*, 2004). O estradiol induz o fígado a produzir vitelogenina, que é incorporada pelos folículos (WALLACE, 1985; WANG *et al.*, 2005). O LH promove também a maturação folicular (FONTAINE *et al.*, 2013). Nos **machos**, o FSH promove a proliferação celular e desenvolvimento da espermatogônia em espermatócito; o LH, por sua vez, promove a espermeação dos espermatozoides para o meio aquoso (FONTAINE *et al.*, 2013).

Figura 03. Via fisiológica da liberação dos gametas em zebrafish (via Hipotalâmica-Pituitária-Gonadal).

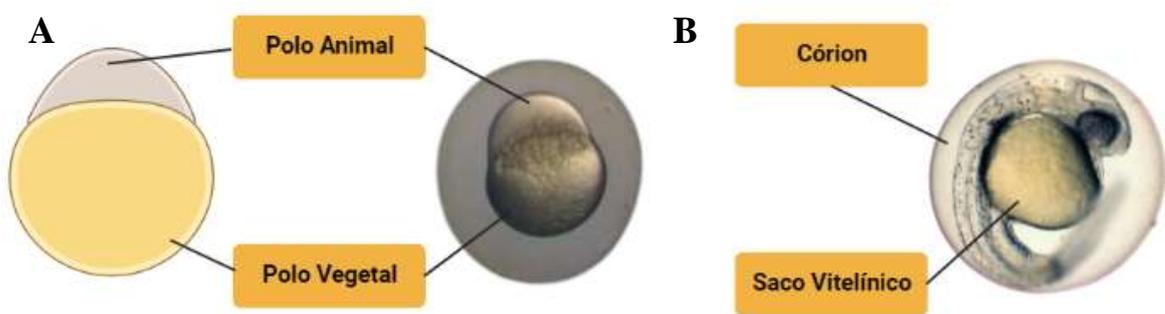


O hormônio GnRH é produzido no hipotálamo de zebrafish e induz a produção de FSH e LH na glândula pituitária. Estes compostos químicos, por sua vez, agem nas gônadas dos peixes e promovem a maturação de seus gametas. **Fonte:** João Mateus (2022).

Durante a sua morfogênese, o peixe-zebra passa pelos estágios de embrião, larva, juvenil e adulto (SILVA, 2019). Uma vez fertilizados, os embriões transparentes de zebrafish iniciam o seu desenvolvimento no estágio de uma célula (SOARES, 2017). Estas células são caracterizadas por apresentar um **polo vegetal** (que abriga a reserva energética necessária para

os eventos celulares e organogênese) e um **polo animal** (LANGELAND; KIMMEL, 1997), como demonstra a **Figura 04**. Os embriões são envolvidos por uma membrana de origem proteica chamada de **córior**, que funciona como barreira física e permite a nutrição por meio de difusão de partículas (COWARD *et al.*, 2002; HENN; BRAUNBECK, 2011). Em até 2 hpf, dá-se início ao processo de **Clivagem Meroblástica Discoïdal**, no qual a célula embrionária se divide exponencialmente (CARTNER *et al.*, 2019). Em 3 hpf, com **30% de epibolia**, o ovo adquire a forma de **blástula** (estado de 1000 células) e as células do polo animal realizam uma série de **movimentos embrionários** (epibolia) que acabam por definir toda a distribuição de células do corpo do peixe, bem como a formação dos folhetos embrionários (CARTNER *et al.*, 2019).

Figura 04. Estrutura do embrião de zebrafish.



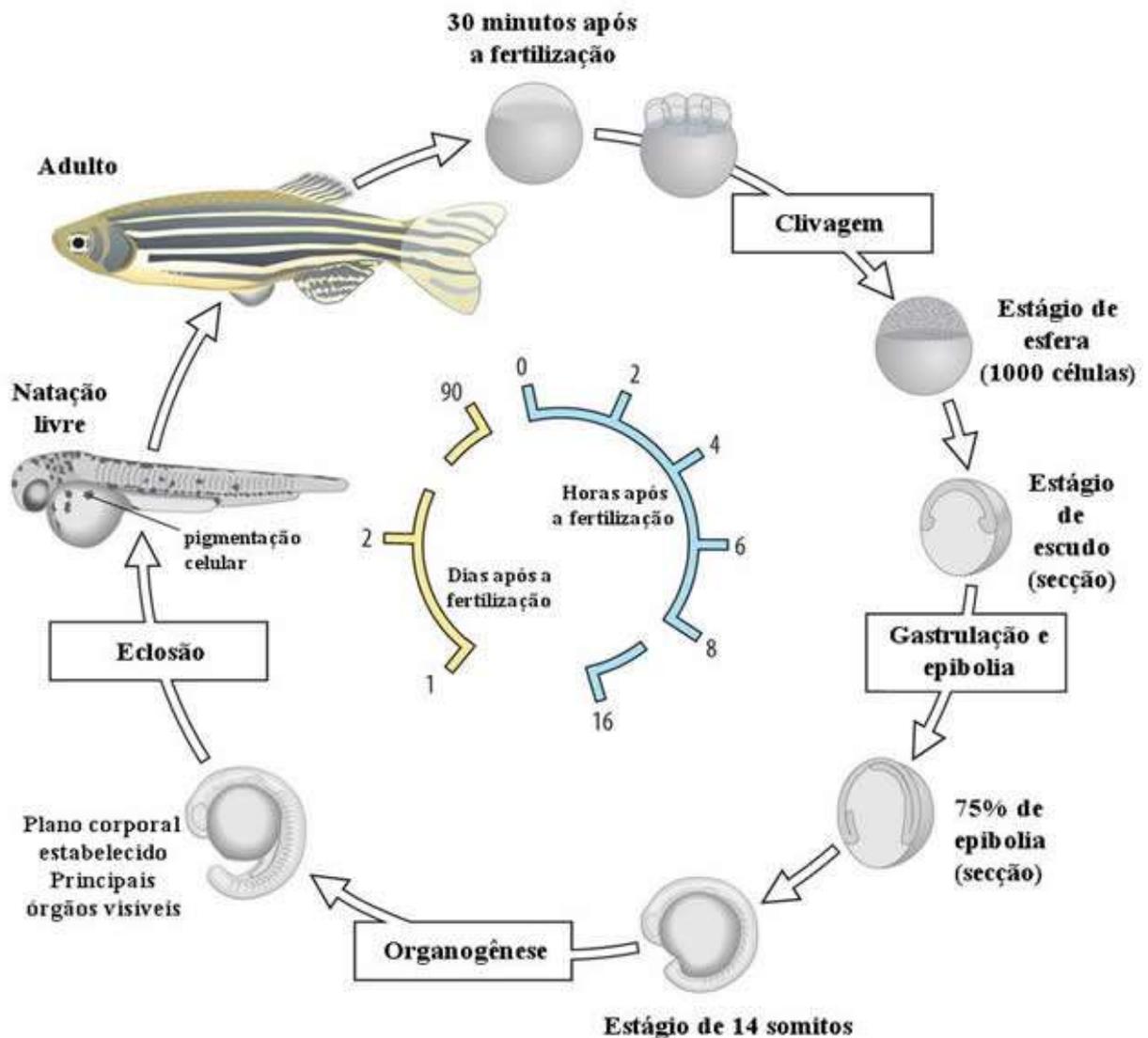
(A) Porções do embrião do zebrafish no estágio de uma célula: polos animal (região de divisão celular) e vegetal (fonte nutricional endógena) destacados. (B) Fase de eleuteroembrião (transição de embrião-larva antes da eclosão) com a presença de córior (barreira física) e saco vitelínico (fonte nutricional endógena). **Fonte:** João Mateus (2022).

Em até 8 hpf, no estágio de **50% de epibolia** no qual a gástrula é formada, ocorre a migração das células em direção ao saco vitelínico, formando uma invaginação que dá forma ao epiblasto e o hipoblasto (CARTNER *et al.*, 2019). O **epiblasto** originará a ectoderme, enquanto o **hipoblasto** dará origem a endoderme e mesoderme (WARGA; NUSSLEIN-VOLHARD, 1999). As células superficiais do mesoderma se diferenciam e dão origem ao ectoderma, que irá originar o **neuroectoderma** (dando origem ao Sistema Nervoso Central e às células que o compõem) e o **ectoderma** (FEKANY-LEE *et al.*, 2000).

Em 72 hpf, a maior parte do corpo do animal está formada, apesar dele continuar se desenvolvendo (HORZMANN; FREEMAN, 2018). No entanto, a presença do vitelo continua (fonte endógena de energia), pois o peixe só abre a sua boca de 3-5 dias pós-fertilização - dpf (STRÄHLE *et al.*, 2012). Entre 72-96 hpf, ocorre a eclosão da larva de zebrafish, liberando-o

do córion (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015). A representação esquemática do desenvolvimento embrionário de zebrafish pode ser observada na **Figura 05**.

Figura 05. Esquema do desenvolvimento embrionário do zebrafish.

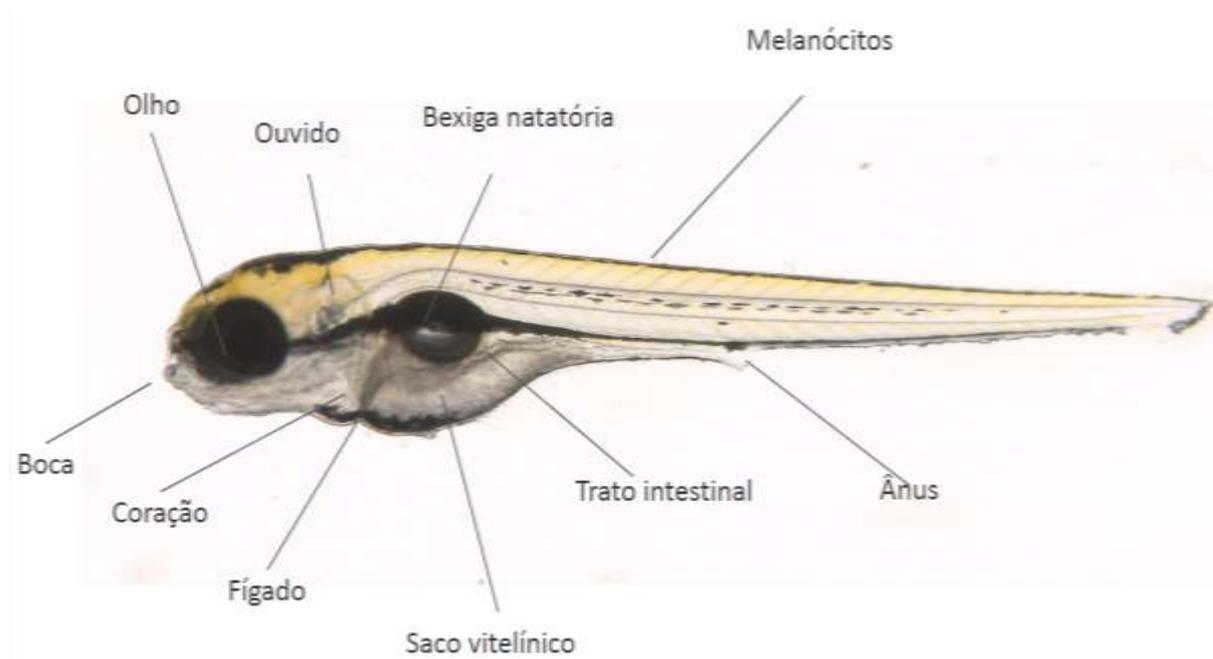


Fonte: Adaptado de D'costa e Shepherd (2009).

No estágio de 96 hpf, já é possível identificar porções como o ouvido, a bexiga natatória, o coração e o trato digestório, ilustrados na **Figura 06**. Durante o seu desenvolvimento, o zebrafish cresce aceleradamente até os seus 3 primeiros meses, mas mudanças morfológicas podem seguir ao longo de sua vida (DAMMSKI; MÜLLER; GAYA, 2011). Os estágios larval, juvenil e adulto iniciam-se respectivamente em 72h, 30 dias e 90 dias pós-fertilização (DAMMSKI; MÜLLER; GAYA, 2011). A diferenciação sexual neste organismo não parece se dar apenas por eventos genéticos e, portanto, não está bem

esclarecida (HSU *et al.*, 2018; RIBAS *et al.*, 2017). Fatores ambientais e nutricionais têm sido levantados como hipóteses da influência de agentes externos no dimorfismo sexual desses peixes (SANTOS; LUZIO; COIMBRA, 2017; WATTS; POWELL; D'ABRAMO, 2012).

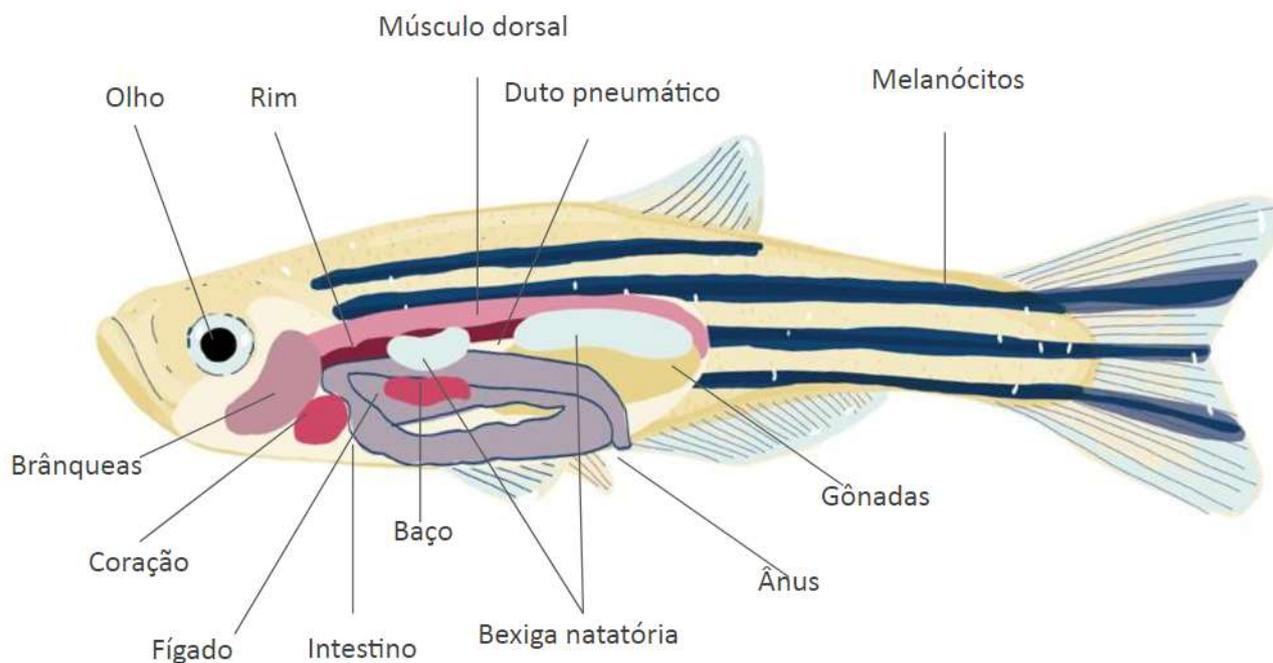
Figura 06. Anatomia da larva *D. rerio* no estágio de 96 hpf.



No estágio de 96 hpf, as larvas de zebrafish já apresentam a maioria dos seus órgãos essenciais formados, como coração e bexiga natatória. **Fonte:** Plataforma Zebrafish®.

O corpo de *D. rerio* adulto (**Figura 07**) apresenta formato plano/fusiforme e é achatado lateralmente (SANDERS, 2020). Além disso, possui olhos centrais, mandíbula inferior protudente e uma cauda homocerca (PONTES; COSTA, 2017). Na superfície do corpo do peixe juvenil e adulto, um padrão de 5-7 listras que segue do opérculo até a sua nadadeira dorsal pode ser observado (SINGH; NÜSSLEIN-VOLHARD, 2015). As suas cores são originárias de três células pigmentadas: **melanóforos** - que dão a cor escuro e azulado; **xantóforos** - responsáveis pela cor amarelo ouro, visualizada principalmente durante a fase reprodutiva; e **iridóforos** - que atribuem a cor iridescente/fluorescente (PICKART *et al.*, 2004; RAWLS; MELLGREN; JOHNSON, 2001).

Figura 07. Anatomia de *D. rerio* na idade adulta.



Fonte: Plataforma Zebrafish®.

Os principais sistemas de zebrafish estão caracterizados na **Tabela 01**. O seu tegumento não é queratinizado, mas sim coberto por escamas ciclóides que se ocupam pelas funções de barreira física e controle de patógenos (DAMMSKI; MÜLLER; GAYA, 2011). Além disso, ele é denominado como um peixe ósseo e, portanto, apresenta coluna vertebral que é segmentada em vértebras pré-caudais e caudais (PONTES; COSTA, 2017). Possui, ainda, três nadadeiras ímpares - caudal, anal e dorsal - e duas nadadeiras pares - pélvicas e peitorais (DAMMSKI; MÜLLER; GAYA, 2011).

O sistema gastrointestinal de *D. rerio* difere do de mamíferos, consistindo em um intestino longo com alta capacidade absorptiva e ausência de estômago verdadeiro (ULLOA *et al.*, 2011). A respiração na fase adulta, bem como a osmorregulação, ocorre através das brânquias, enquanto no estágio larval estas ocorrem por meio de difusão cutânea (LIAO; CHEN; HWANG, 2009; KÄMMER; ERDINGER; BRAUNBECK, 2022).

Tabela 01. Descrição dos principais sistemas de *D. rerio*.

SISTEMAS	CARACTERIZAÇÃO
Tegumentar	Presença de escamas ciclóides com função de barreira física.
Esquelético	Constituição complexa com presença de cartilagem e osso.
Gastrointestinal	Constituído por: boca, faringe, esôfago, intestinos e abertura anal. Apresenta ainda um par de dentes e papilas gustativas.
Respiratório	Brânquias - para realização das trocas gasosas, balanço osmótico, excreção de compostos nitrogenados e manutenção do balanço ácido-básico.
Urogenital	O rim - principal órgão responsável pela hematopoiese. Possui um par de testículos (macho) e ovários contendo oócitos (fêmeas).
Cardiovascular	Coração com átrio e ventrículo, seios venosos e bulbo arterial.
Nervoso e Sensorial	Olho, sistema olfativo e ouvido (órgãos especializados). A linha lateral é um sistema sensorial que permite que o animal detecte e responda a variações de movimento na água.

Fonte: Adaptado de CONCEA NR 34 (2017).

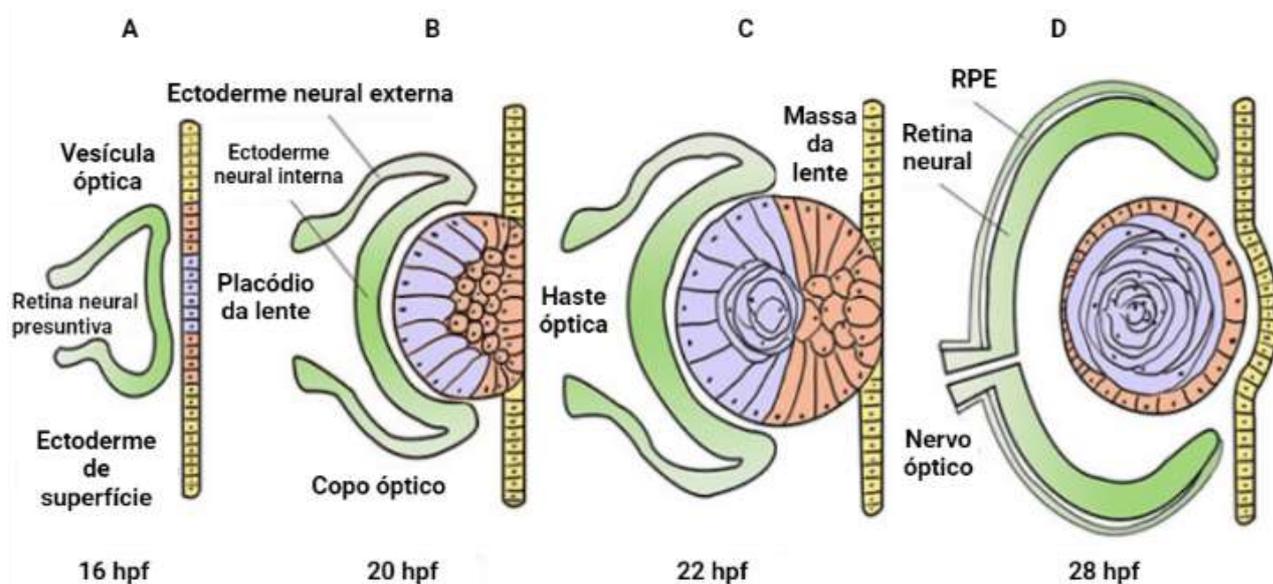
3.3 Desenvolvimento, composição da retina e fisiologia da visão de *D. rerio*

O zebrafish, como qualquer outro animal de seu porte, precisa formar rapidamente estruturas que o auxiliem no comportamento de fuga, a exemplo, os seus olhos (FLEISCH; NEUHAUSS, 2006). A retina é a porção do olho responsável pela captação do sinal luminoso e pela sua conversão em sinal elétrico, no qual a informação é encaminhada para o Sistema Nervoso Central para interpretação (FÖRSTER *et al.*, 2020; HAGEN *et al.*, 2022). Durante o

desenvolvimento de zebrafish, a formação do seu arcabouço visual advém de três folhetos embrionários distintos (ectoderme, neuroectoderma e mesênquima), tendo a sua retina uma origem embrionária similar aos demais vertebrados (SCHMITT; DOWLING, 1994; RICHARDSON *et al.*, 2017).

Em meio a outros processos morfogênicos do olho de zebrafish, a neuroectoderme dá origem ao Epitélio Pigmentado da Retina (REP) e à retina neural (**Figura 08**), que ocupa 75% do seu olho no estágio larval (ZIMMERMANN *et al.*, 2018; HONG, LUO, 2021). Dentro de 72 hpf todo o sistema visual do peixe-zebra já é similar ao de humanos morfofuncionalmente (EASTER; NICOLA, 1996).

Figura 08. Organogênese da retina de zebrafish.

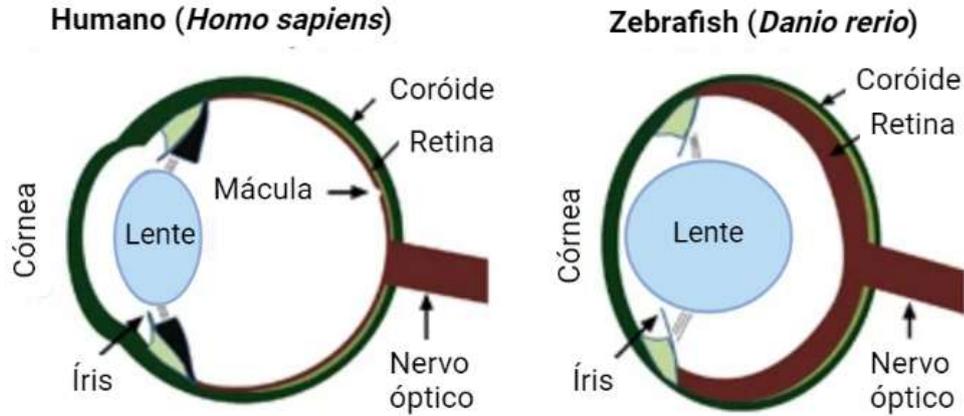


(A) No estágio de 16 hpf, ocorre a formação da vesícula óptica de zebrafish. (B) Esta vesícula sofre invaginação, dando origem às porções interna e externa da ectoderme neural em 20 hpf. (C) A camada interna do cálice óptico (*optic cup*) forma a retina neural, enquanto a camada externa dá origem ao RPE (D). **Fonte:** Adaptado de Hong e Luo (2021).

Apesar do olho do peixe-zebra e o dos humanos apresentarem algumas distinções (**Figura 09** e **Tabela 02**), ambos possuem as mesmas estruturas básicas em termos de composição da retina (SOULES; LINK, 2005), como é possível observar na **Figura 10**. O Epitélio Pigmentado da Retina (RPE), tanto em humanos como em zebrafish, consiste em uma monocamada responsável pelo suporte metabólico dos fotorreceptores (JAROSZYNSKA; HARDING; MOOSAJEE, 2021; COUNTRY, 2017). Os cones e bastonetes possuem um Segmento Externo (OS) e um Segmento Interno (IS), que são responsáveis pelo início da fototransdução (JAROSZYNSKA; HARDING; MOOSAJEE,

2021). O OS dos fotorreceptores contém as opsoninas (rodopsinas principalmente), que são os fotopigmentos responsáveis pela captação da luz (ROBINSON *et al.*, 1993).

Figura 09. Diferenças morfológicas entre o olho humano e o de *D. rerio*.



A diferença morfológica mais marcante entre os olhos humanos e do zebrafish consiste principalmente no formato da lente e no espaço entre a lente e a retina, além da ausência da mácula em *D. rerio*. **Fonte:** Adaptado de Chhetri; Jacobson; Gueven (2014).

Tabela 02. Diferenças morfológicas entre o olho humano e o de *D. rerio*.

Estrutura	Humano	Zebrafish
Posição dos olhos	Apresenta olhos frontais com visão binocular e altamente sobreposta.	Possui olhos laterais com visão binocular menos sobreposta.
Lente	Elipsoidal.	Completamente esférico, estendendo-se parcialmente através da íris, proporcionando visão de grande angular.
Espessura da Retina	≅ 289 μm .	≅ 180 μm .
Células ganglionares	Altamente povoado.	Menos densamente povoado.
Presença de fóvea	Sim.	Não.

Estrutura	Humano	Zebrafish
Visão	Cone dominante e visão tricromática (falta de visão colorida sensível a UV).	Visão de cone dominante e tetracromática (contém cones únicos curtos sensíveis a UV).
Projeção retinotectal	Metade das fibras ópticas de cada olho se projeta para o mesmo lado do cérebro e a outra metade cruza no quiasma óptico e se projeta para o outro lado do cérebro.	Todas as fibras ópticas provenientes de cada olho cruzam no quiasma óptico e se estendem para o lado oposto do cérebro.
Mielinização	A parte das fibras ópticas antes da lâmina cribrosa não é mielinizada, enquanto as fibras após a projeção da lâmina cribrosa são todas mielinizadas.	Fibras ópticas inteiras são mielinizadas. A bainha de mielina de camada única e frouxa está presente ao redor do axônio intra-retiniano e o nervo óptico consiste em mielina compacta.

Fonte: Adaptado de Chhetri; Jacobson; Gueven (2014).

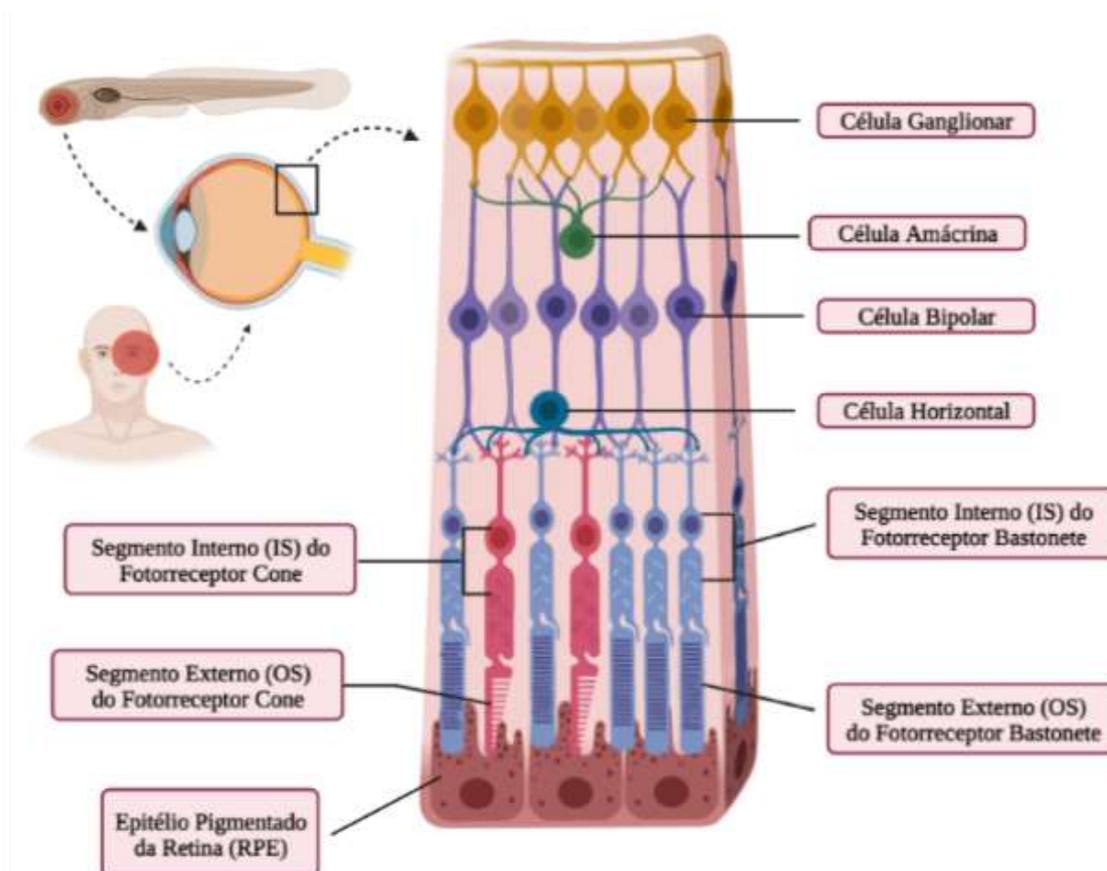
As células horizontais e as células amácrinas são responsáveis pela sinapse lateral da retina (DE HOZ *et al.*, 2016; VECINO *et al.*, 2016). As células bipolares e ganglionares são incubadas de transmitir o sinal elétrico gerado nos fotorreceptores para o cérebro (MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021). E as células de Müller desempenham um papel de suporte funcional, estrutural e regenerativo deste tecido neural em zebrafish (BRINGMANN; REICHENBACH, 2001). Essas células da glia também estão presentes no olho humano, no entanto, não são capazes de desempenhar um papel regenerativo na retina humana (JAYARAM *et al.*, 2014).

As células de Müller podem apresentar uma função similar às células tronco na retina do olho humano após a ativação do processo de gliose e representam, atualmente, uma possibilidade terapêutica para distúrbios visuais (EASTLAKE *et al.*, 2021). Terapias experimentais que utilizaram células de Müller humanas e neurônios derivados dessas células

têm demonstrado uma melhora na homeostasia da retina, mas sem atividade regenerativa (EASTLAKE *et al.*, 2019; SINGHAL *et al.*, 2012). Pesquisas desenvolvidas com zebrafish com esta célula da glia têm permitido a construção do conhecimento acerca dos mecanismos de reprogramação e regeneração desempenhados pelas células de Müller (SALMAN; MCCLEMENTS; MACLAREN, 2021). No entanto, apesar de resultados obtidos em zebrafish poderem ser extrapolados para situações clínicas humanas, é necessário uma criticidade ao considerar a translação dessas informações (DAHM *et al.*, 2007; OOSTERHOF; BODDEKE; VAN HAM, 2015).

A retina também pode ser entendida histologicamente em camadas, apresentando-se no sentido ântero-posterior da seguinte forma: Camada de Células Ganglionares (GCL), Camada Plexiforme Interna (IPL), Camada Nuclear Interna (INL), Camada Plexiforme Externa (OPL), Camada Nuclear Externa (ONL) e Camada de Células Receptoras (PRL) (DOWLING, 1987). Todas estas camadas estão representadas na **Figura 11**.

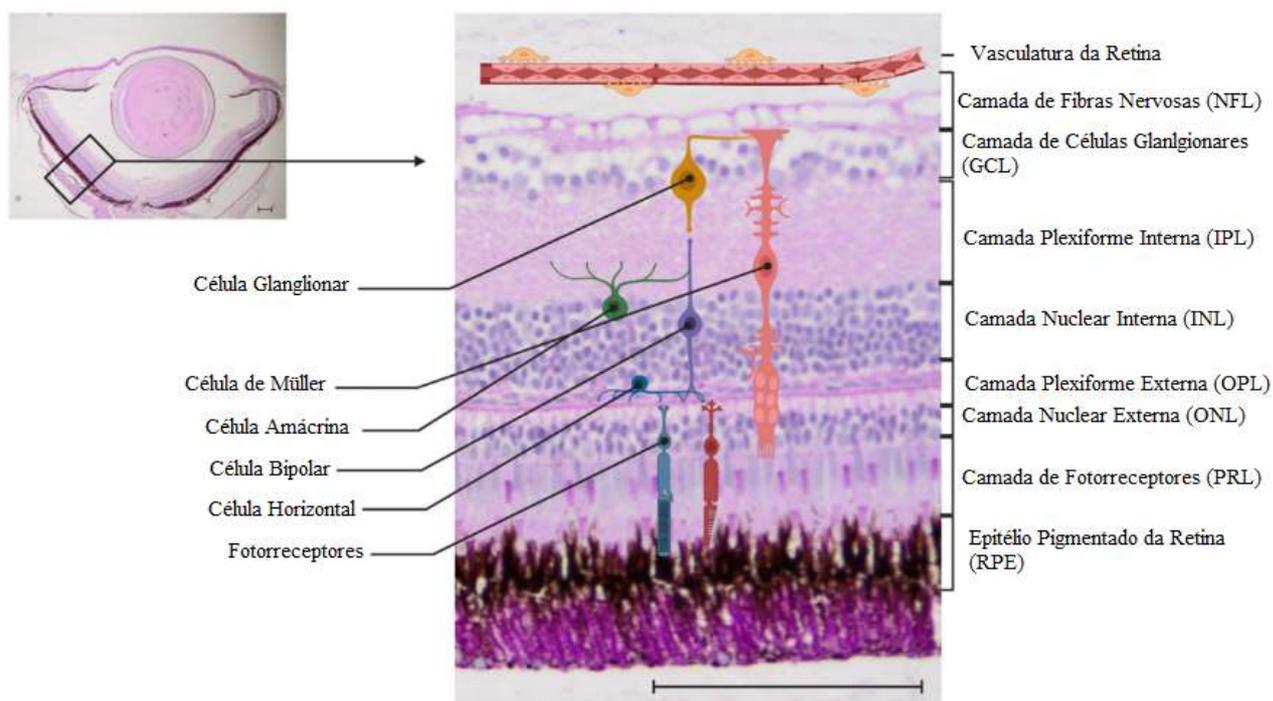
Figura 10. Composição celular básica e simultânea entre o olho de zebrafish e humanos.



Fonte: João Mateus (2022).

Para que o evento de fototransdução ocorra, a luz atravessa todas as camadas retinianas, interage com os fotorreceptores (cones e bastonetes) e o sinal é propagado via nervo óptico, permitindo a visualização de imagens (LAMB; PUGH, 2006). Danos nessa estrutura podem comprometer a visão e, por isso, há uma atual e constante busca terapêutica para o tratamento de deficiências visuais desse tipo (BIBLIOWICZ; TITTLE; GROSS, 2011).

Figura 11. Camadas celulares da retina de *D. rerio*.



A retina de humanos e de zebrafish é composta por células ganglionares, de Müller, amácrinas, bipolares, horizontais e pelos fotorreceptores (cones e bastonetes). Estas células compõem diferentes camadas, como descrito na imagem acima. Em sua porção mais interna, a retina apresenta, ainda, vasos sanguíneos e fibras nervosas que conduzem o sinal elétrico da fototransdução. **Fonte:** Adaptado de Middel; Hammes; Kroll (2021).

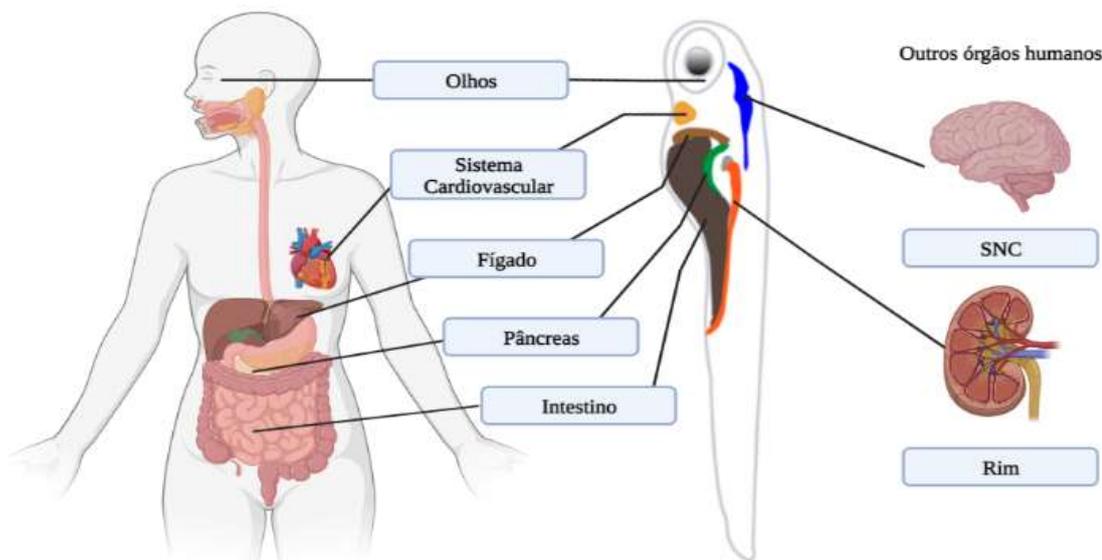
3.4 Zebrafish Como Sistema Modelo Para Doenças Oculares

Um organismo modelo pode ser definido como uma espécie capaz de reproduzir respostas fisiológicas, bioquímicas e comportamentais similares a humanos quando expostos a um agente (MATTHEWS; VOSSHALL, 2020). Não por acaso, o zebrafish apresenta órgãos e vias metabólicas altamente conservadas entre os vertebrados, incluindo humanos (HORZMANN; FREEMAN, 2018), como descrito na **Figura 12**. Uma das principais razões pelas quais espécimes de zebrafish têm sido cada vez mais utilizados como modelo é a flexibilidade do seu uso nos diferentes estágios de vida (EHRlich *et al.*, 2019; MAO *et al.*, 2020; KASAR *et al.*, 2021).

Durante a sua fase de larva, em especial, o zebrafish apresenta características como desenvolvimento externo, translucidez, órgãos vitais como coração e bexiga natatória já formados e fácil manipulação (DRIEVER *et al.*, 1994). Por isso, *D. rerio* tem subido no ranking de estudos científicos com experimentação animal, estando abaixo apenas do uso de camundongos e ratos (VAN SLYKE *et al.*, 2018; YAO; WANG; WANG, 2020). No entanto, como este modelo vertebrado não é um mamífero e, portanto, não apresenta algumas das estruturas corporais deste clado ou possui alguns sistemas dissociativos comparado com os dos humanos, a sua aplicação exige cautela (KARI; RODECK; DICKER, 2007).

De modo geral, as principais vantagens atreladas ao peixe-zebra como animal modelo são: (1) numerosa oviposição pelos reprodutores; (2) fácil manipulação e criação dos espécimes; (3) translucidez dos ovos e larvas; e (4) genoma totalmente sequenciado e 75% homólogo com humanos (VELDMAN; LIN, 2008; BEFFAGNA, 2019; CHEN *et al.*, 2020). Outra característica positiva é a possibilidade de performar testes com os diferentes estágios do zebrafish (embrião, larva, juvenil e adulto), sendo consideravelmente mais barato do que outros modelos animais, incluindo camundongos (LEITE *et al.*, 2021).

Figura 12. Órgãos conservados entre humanos e zebrafish.



Fonte: João Mateus (2022).

Em meio a tantas vantagens, uma série de estudos apontam *D. rerio* como potencial substituto de outros sistemas modelo, o que inclui mamíferos (CHAKRABORTY *et al.*, 2009). Para uma melhor visualização, todas as vantagens de zebrafish na aplicação de estudos biomédicos estão descritas na **Tabela 03**, bem como as suas principais limitações.

Tabela 03. Vantagens e limitações de *D. rerio* como organismo modelo.

Aplicação de Zebrafish Como Animal Modelo

Vantagens	Limitações
<p>Alta fecundidade (100-200 embriões por desova), curto tempo de geração e reprodução o ano todo.</p>	<p>Organismo não-mamífero.</p>
<p>Curto tempo de desenvolvimento (organogênese completa até 72 hpf e indivíduo adulto dentro de 4 meses).</p>	<p>Dissimilaridade entre alguns sistemas humanos (sistema respiratório e reprodutor).</p>
<p>Fácil criação: baixo custo e possibilidade de abrigar vários espécimes em um curto espaço.</p>	<p>Difícil extração de órgãos devido ao pequeno tamanho.</p>
<p>Embriões e larvas transparentes.</p>	
<p>Pequeno Porte: atinge 3-5 cm quando adulto.</p>	
<p>Emprego de todos os seus estágios de desenvolvimento (embrião, larva, juvenil e adulto) na pesquisa.</p>	
<p>Fácil manipulação: (1) imersão do animal em solução de análise; (2) administração de substâncias por diferentes vias (oral, intramuscular, intravenosa e intraperitoneal).</p>	
<p>Baixo custo de criação.</p>	
<p>Genoma sequenciado e homólogo a humanos em 70%.</p>	
<p>Fácil aplicabilidade de ferramentas genéticas e embriológicas.</p>	
<p>Desenvolvimento de linhagens mutantes.</p>	

Outro fator que tem tornado o zebrafish famoso em experimentos animais é a sua utilização até o estágio de 120 hpf sem preocupação com questões éticas (CORNET; DI DONATO; TERRIENTE, 2018; CASSAR *et al.*, 2019). Isto é devido a sua caracterização como um modelo que preenche um nicho entre estudos *in vitro* e modelos biomédicos mamíferos (BAILEY; OLIVERI; LEVIN, 2013). Além disso, até 120 hpf, o peixe-zebra não é capaz de se alimentar sozinho e, por isso, não é considerado um ser de vida livre até esta fase (STRÄHLE *et al.*, 2012). Ademais, os resultados de pesquisa observados com zebrafish são muito similares aos observados em experimentos animais com mamíferos, o que o torna favorável como uma alternativa substitutiva dentro da experimentação animal (TAVARES; LOPES, 2013).

Uma preocupação atual no ramo científico é a utilização cada vez menor e de forma eficiente de organismos em seus estudos, a fim de diminuir o impacto da experimentação animal na ciência (FISHER; WALKER, 2019). Com isso, a filosofia dos 3Rs (redução, substituição e refinamento) tem sido amplamente difundida em uma tentativa de conscientizar acerca da utilização destes animais de uma maneira mais ética (DOKE; DHAWALE, 2015; CASSAR *et al.*, 2019). Em um recente artigo de descrição, CANEDO e colaboradores (2022) acrescentaram a esta reflexão mais 7Rs (registro, relatório, robustez, reprodutibilidade, relevância, responsabilidade e respeito), com a finalidade de complementar ideias sobre princípios e conduta científica.

Graças às suas numerosas vantagens, o zebrafish também tem sido cada vez mais utilizado para o estudo de doenças humanas e o desenvolvimento de novas terapias (TEAME *et al.*, 2019). Doenças visuais e cegueira, por exemplo, têm sido alguns dos problemas de saúde pública mais discutidos mundialmente (SCOTT; MARSDEN; SLUSARSKI, 2016). Por isso, a busca por organismos que funcionem como modelo para estudos pré-clínicos de patogênese e desenvolvimento terapêutico tem sido uma necessidade atual (CHHETRI; JACOBSON; GUEVEN, 2014). Com isso, este peixe assume bem o potencial papel por todas as características já descritas acima, mas também pela grande similaridade do seu sistema visual com o de humanos dentre os modelos vertebrados (BILOTTA; SASZIK, 2001).

Outra vantagem que torna este modelo ideal para estudos de doenças oculares é a sua alta qualidade de imagem *in vivo* e *ex vivo*, o que possibilita o emprego de diferentes técnicas de pesquisa (JAFFE *et al.*, 2010). Além disso, zebrafish possui um comportamento de fácil observação e que já está bem caracterizado, o que auxilia na performance de testes de comportamento visual (ORGER; POLAVIEJA, 2017; FITZGERALD *et al.*, 2021). Ademais,

em 72 hpf o seu olho já é responsivo funcionalmente, facilitando a observação de endpoints significativos no seu estágio de eleuteroembrião, como é recomendado (STRÄHLE *et al.*, 2012; SHEN; ZUO, 2020).

O estudo de doenças como catarata, glaucoma e retinopatias já estão bem estabelecidas utilizando este peixe (LINK; COLLERY, 2015). Isso se deve a precoce presença de informações visuais ainda no estágio de larva, o que facilita o emprego deste modelo em trabalhos oftalmológicos (BOLLMANN, 2019). Porções do olho de larvas de zebrafish como a retina, devido a grande massa de cones, têm sido utilizadas como modelo para a fóvea de primatas (YOSHIMATSU *et al.*, 2020). Dessa forma, zebrafish tem se mostrado um potencial modelo para o estudo de doenças envolvendo distúrbios visuais (SAIDI; DAVEY; CAMERON, 2015).

Ainda em estágio precoce de desenvolvimento, os olhos de *D. rerio* já são demasiadamente grandes, facilitando a sua manipulação e aplicação em estudos oculares (RICHARDSON *et al.*, 2017). Semelhante a humanos, o peixe-zebra é um animal diurno e, diferente de outros modelos, apresenta uma retina rica em fotorreceptores do tipo cone (BILOTTA; SASZIK; SUTHERLAND, 2001). Adicionalmente, uma série de testes podem ser aplicados com esse organismo, tais como Resposta Visual Motora (RVM) e Resposta Optomotora (OMR), a fim de identificar danos na retina (ZHANG *et al.*, 2016; CONNAUGHTON *et al.*, 2020). Essa versatilidade e soma de características pode canonizar este teleósteo como modelo para estudos do sistema ocular (ZANG; NEUHAUSS, 2021).

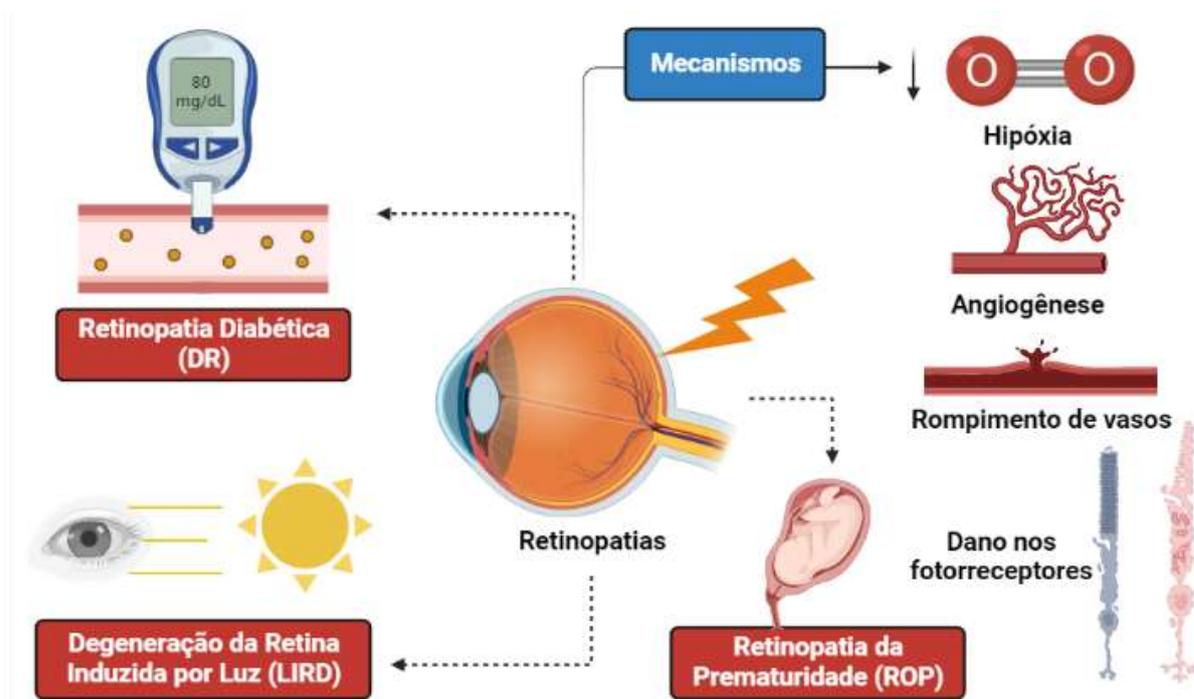
Por fim, a aplicação de larvas de zebrafish é ideal também para pesquisas oculares devido ao seu potencial de refinamento, redução e substituição dentro da experimentação animal, uma vez que utiliza um baixo número de organismos e obtém resultados similares aos de modelos mamíferos (FORN-CUNÍ *et al.*, 2017; ANSELMO *et al.*, 2018).

3.5 Tipos e Formas de Indução de Retinopatias

A retinopatia consiste em um tipo de deficiência visual caracterizada por danos no sistema visual na porção da retina (na camada dos fotorreceptores, principalmente) e que pode resultar em cegueira (SASONGKO *et al.*, 2017). Diferentes etiologias dessa doença têm sido relatadas, sendo as mais comuns as induzidas por hipóxia (Retinopatia da Prematuridade), por hiperglicemia (Retinopatia Diabética) e por luz (CHEN; PERUSEK; MAEDA, 2016; RATHI *et al.*, 2017; YIN *et al.*, 2020), representadas na **Figura 13**. Experimentalmente, no zebrafish,

estas retinopatias podem ser mimetizadas através de imersão em solução rica em glicose, Cloreto de Cobalto ou por exposição direta à luz no (KAWASE *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2021; LEE; YANG, 2021).

Figura 13. Principais tipos de Retinopia.



Os principais tipos de retinopia consistem na da prematuridade (ROP), a diabética (DR) e a induzida por luz (LIRD). Os fatores que acabam por implantar estes quadros clínicos podem ser resumidos em hipóxia tecidual, criação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), rompimento de vasos devido a sua obstrução (hiperglicemia) e dano direto nos fotorreceptores (alta incidência de luz). **Fonte:** João Mateus (2022).

A Retinopia da Prematuridade (ROP) consiste em uma doença vasoproliferativa da retina que atinge principalmente bebês prematuros e é a causa mais comum de cegueira em crianças (SHAH *et al.*, 2016). A sua manifestação pode estar atrelada a condições da gestante e/ou do próprio recém-nascido, como fatores neonatais, genéticos, nutricionais e físicos (KIM *et al.*, 2018). A perda da visão via ROP comumente está relacionada à angiogênese patológica, que resulta no deslocamento da retina (HARTNETT, 2015). Este processo é desencadeado inicialmente devido a hipóxia tecidual, que é capaz de ativar vias celulares como a do HIF1 α (Fator Induzível por Hipóxia 1 alfa) e VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular (BUDD; HARTNETT, 2010; KROCK; SKULI; SIMON, 2011).

A Retinopia Diabética (DR) é consequência da alta concentração de glicose no sangue e é uma das principais causas mundiais de cegueira (ANTONETTI; SILVA; STITT, 2021). Como resultado da Diabetes mellitus, a hiperglicemia acaba por resultar em rompimento de microvasos e hipóxia (AL-KHARASHI, 2018; MIDDEL; HAMMES;

KROLL, 2021). Em uma tentativa de restringir danos teciduais, fatores de transcrição como VEGF são expressos e a angiogênese patológica é estabelecida (LE, 2017). Assim, com alterações inflamatórias e no sistema imune, a DR induz o dano tecidual da retina (CURTIS; GARDINER; STITT, 2009).

Já a Retinopatia induzida pela luz - também conhecida como Degeneração da Retina Induzida por Luz (LIRD) - consiste em um dano derivado da exposição prolongada ao espectro luminoso visível (CHEN; PERUSEK; MAEDA, 2016). No entanto, a sua manifestação está atrelada a múltiplas razões, como fatores genéticos, envelhecimento e aspectos ambientais (WENZEL *et al.*, 2005). Por isso, a indução de LIRD em estudos experimentais consiste em uma tentativa de desenvolvimento terapêutico para casos de degeneração da retina (TSUMURA *et al.*, 2014).

O emprego de animais em pesquisa na ciência ainda é necessário, uma vez que estes permitem validar resultados observados em estudos *in vitro* (TEAM *et al.*, 2019). Apesar de pesquisas biomédicas serem bastante desenvolvidas com modelos mamíferos, estas são bastante custosas e, por isso, métodos alternativos precisam ser desenvolvidos (STRÄHLE *et al.*, 2012). O zebrafish tem sido indiscutivelmente um ótimo e crescente organismo utilizado em pesquisas translacionais (HORZMANN; FREEMAN, 2018). Todavia, para que este modelo efetue uma performance experimental eficiente e com custo-benefício, adaptações metodológicas precisam ser realizadas (LAWRENCE, 2016).

O emprego experimental de *D. rerio* funciona como um sistema complementar aos experimentos com organismos mamíferos (LEVIN; CERUTTI, 2011). No entanto, para que os resultados experimentais com este peixe sejam significativos, é necessário que os métodos sejam bem desempenhados (LEFAUVE *et al.*, 2021). Ademais, embriões/larvas de zebrafish funcionam como um modelo substitutivo e de refinamento dentro da experimentação animal (STRÄHLE *et al.*, 2012).

Com isso, graças à similaridade do sistema visual das larvas de zebrafish com humanos e o rápido desenvolvimento e responsividade do olho *D. rerio*, a utilização desse modelo neste estágio configura uma alternativa para a redução animal, além da substituição de outros biomodelos (BILOTTA; SASZIK, 2001; CANEDO *et al.*, 2022; RICHARDSON *et al.*, 2017). Ademais, pensando no desenvolvimento de novas drogas, a larva de zebrafish funciona como um ótimo meio de triagem para a descoberta de novas moléculas terapêuticas (ROSA; LIMA; LOPES-FERREIRA, 2022).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo e Local de Estudo

Este trabalho foi caracterizado como resultado de uma pesquisa de natureza básica, quantitativa, descritiva e com emprego de experimentação animal. O método quantitativo visa uma abordagem de resultados com enfoque em resultados numéricos, permitindo através dos seus padrões a classificação e discussão dos dados obtidos. Já a experimentação animal, visa a translação dos resultados *in vivo* ou *in vitro* em laboratório para humanos, possibilitando a resolução de problemas.

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Toxinologia Aplicada (LETA), localizado no Instituto Butantan (São Paulo, Brasil). Este laboratório comporta a Plataforma Zebrafish, que faz parte do Centro de Toxinas, Resposta-imune e Sinalização Celular (CeTICS). De maneira geral, o LETA desenvolve experimentos animais com o peixe zebrafish (*Danio rerio*), durante o estágio embrio-larval. Suas principais áreas de atuação são: imunologia (inflamação), comportamento animal, infecção, toxicidade e doenças (como cardiopatias e câncer).

4.2 Criação de Zebrafish e Obtenção de Embriões

Peixes adultos de epíteto específico *D. rerio* da linhagem Wildtype (WT) AB foram armazenados em prateleiras de fluxo (ALESCO, Campinas, Brasil e Tecniplast, Varese, Itália) com um sistema de água (60 µg/mL de sais marinhos Instant Ocean) no LETA/Instituto Butantan. Os espécimes de zebrafish foram separados por sexo, retidos em grupos de até 15 organismos (dentro de aquários de 3L) e mantidos sob condições padrão de: temperatura (28 °C); pH (6,4-7,4); fotoperíodo (ciclo 14/10h - claro/escuro) para a reprodução; dureza da água (9-14°); condutividade da água (400-700 µS); e estabilidade iônica - Amônia (< 0,1 ppm), Nitrito (< 0,2 ppm) e Nitrato (< 25 ppm).

A alimentação dos peixes ocorreu diariamente, duas vezes ao dia, consistindo em ração seca comercial da marca “JBL Novo Bits”, pela manhã, e por náuplios de artêmias pela tarde. O preparo das artêmias ocorria da seguinte forma: 48h antes da alimentação, cistos liofilizados de artêmias eram cultivados em um sistema de aeração. Em 1L de água deionizada, adicionou-se 300g de Cloreto de Potássio (NaCl) e 02 microtubos de cistos de artêmia nas garrafas pets de cultivo. Os cistos ficaram expostos à luz constante por dois dias

para que ocorresse a sua eclosão, junto com tubos de regulação de ar. A aeração é importante para evitar que a água fique parada e que ocorra a formação de lodo.

Para fins de reprodução, os espécimes adultos de zebrafish foram escolhidos com 24h de antecedência do acasalamento e mantidos em um aquário na proporção de 02 machos para 01 fêmea (2♂ x 1 ♀). Os peixes dividiram a mesma água para que o cortejo pudesse ocorrer, mas permaneceram separados por sexo por uma divisão física existente no aquário entre eles. No dia seguinte, foram dispostos em uma sala isolada, bastante iluminada (com um sistema artificial de luz branca - abajures) e silenciosa por 30-40 min para acasalarem. Os ovos fertilizados decantaram por perfurações que existiam em uma grade que separava o zebrafish do fundo do aquário, para evitar o consumo dos embriões pelos seus parentais.

Os embriões obtidos, por sua vez, foram analisados, contados e limpos com o auxílio de um estereomicroscópio EZ4W (Microsistemas Leica, Cambridge, Reino Unido) em placas de Petri (100 x 20 mm) contendo o meio E2A 0,5x (KIMMEL *et al.*, 1995). O meio salino consistiu de uma mistura dos meios E2A, E2B e E2C nas seguintes proporções: 5 mL de meio E2A, 1 mL de meio E2B e 1 mL de meio E2C para 1L de solução. Este meio de cultivo evita a coagulação e acelera o desenvolvimento do embrião.

Os embriões viáveis foram incubados a 28 °C em uma estufa (#10054-476-11 EA-INCUB-Line VWR® Digital Mini Incubator) e o seu desenvolvimento foi registrado em horas pós-fertilização (hpf). A mortalidade dos embriões foi contada e anotada diariamente. A fim de obter uma melhor visualização da imagem *in vivo* das larvas, um protocolo de inibição de pigmentação foi performedo. Este método consistiu na incubação de embriões de 6 hpf à uma solução de N-Phenylthiourea 0,001% (PTU), que é um inibidor enzimático utilizado para evitar a expressão dos pigmentos das células de zebrafish. A incubação nesse meio ocorreu nos demais métodos a seguir até o tópico de Resposta Visual Motora.

Todos os protocolos seguiram as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle para Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal do Instituto Butantan (CEUAIB) protocolado sob o CEUA de nº #2014291021.

4.3 Indução de Retinopatia em Larvas de Zebrafish

Larvas de zebrafish no estágio de 72 hpf foram separadas para os diferentes tratamentos de indução de retinopatia. O procedimento ocorreu pela exposição a dois agentes distintos: a luz e o Cloreto de Cobalto (CoCl₂). O CoCl₂ foi preparado a partir da pesagem do

soluto suficiente para preparar uma solução de uso de 0,5 mM e 1 mM, sendo diluído em meio E2A 0,5x ou PTU 0,001%. Como controle negativo, foi utilizado o meio E2A 0,5x ou PTU 0,001%, que se manteve em condições padrão, bem como os tratamentos. O PTU foi preparado a partir da pesagem do soluto suficiente para preparar uma solução de uso de 0,001%, que foi diluído em meio E2A 0,5x.

Indução de Retinopatia por Luz: embriões de zebrafish com 72 hpf foram transferidos para placas de 24 poços (5 larvas/poço) e embalados com papel alumínio para privação de luz por até 24h (Grupo LIRD). No estágio de 96 hpf, as larvas foram distribuídas em uma placa de 96 poços (5 larvas/poço) contendo 2 mL de meio E2 0,5x e foram dispostas no equipamento Zebrabox (ViewPoint Life sciences, Lyon, França) para exposição à luz com intensidade de 15 mil LUX em um período de 24h. Para o controle negativo, embriões foram mantidos sob condições padrão de temperatura (28 °C) e fotoperíodo normal (ciclo 14/10h - claro/escuro), incubados com 2 mL de meio E2 0,5x ou PTU 0,001% em estufa. Após a exposição luminosa, no estágio de 120 hpf, as larvas seguiram para análise comportamental e, em seguida, para preparação histológica. O protocolo utilizado está esquematizado na **Figura 14**.

Indução de Retinopatia por Hipóxia (CoCl₂): larvas de zebrafish com 72 hpf foram dispostas em uma placa de 24 poços (5 larvas/poço) e incubadas a 28 °C em 2 mL de meio E2 0,5x ou PTU 0,001% (controle) e na solução de Cloreto de Cobalto 0,5 mM. A exposição durou 72h com troca diária da solução de CoCl₂. Após o tratamento, as larvas foram submetidas a teste comportamental e, em seguida, para preparação histológica. O protocolo utilizado está esquematizado na **Figura 15**.

Figura 14. Esquema temporal do experimento de Retinopatia Induzida por Luz (LIRD) nas larvas de zebrafish.



Embriões/larvas de zebrafish foram mantidos em meio E2A 0,5x ou PTU 0,001% até o estágio de 96 hpf. Em 72 hpf, larvas foram privadas da luz, sendo cobertas com papel alumínio (Grupo LIRD) até o período de 96 hpf. Como grupo controle, utilizou-se larvas com fotoperíodo normal. Do estágio de 96 a 120 hpf, ambos os grupos foram expostos a uma intensidade luminosa de 15 mil LUX para induzir retinopatia. **Fonte:** João Mateus (2022).

Figura 15. Esquema temporal da exposição de larvas de zebrafish à Cloreto de Cobalto para indução de retinopatia via hipóxia.



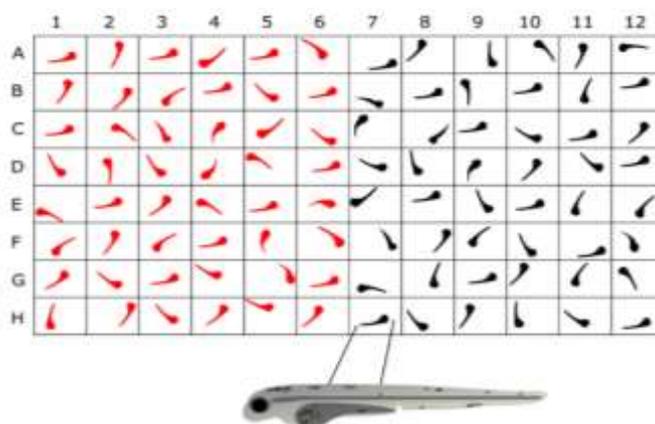
Larvas de zebrafish foram mantidas em meio E2A 0,5x ou PTU 0,001% até o estágio de 72 hpf. Na fase de 72 hpf até 144 hpf, as larvas foram expostas à solução de CoCl_2 0,5 mM (com ou sem PTU 0,001%). Como grupo controle, utilizou-se larvas expostas somente ao meio E2A 0,5x acrescidas ou não de PTU. **Fonte:** João Mateus (2022).

4.4 Avaliação de Comportamento Visual de Zebrafish

A realização de testes de comportamento visual é ideal para avaliar a presença de danos na retina do zebrafish. Para este estudo, realizou-se o teste de Resposta Visual Motora (VMR), que já está bem estabelecido para *D. rerio*. Como controle negativo, larvas não tratadas e imersas em meio E2 0,5x ou PTU 0,001% tiveram o seu comportamento de natação observado. Um fluxograma resumindo as etapas da metodologia deste trabalho está representado na **Figura 19**.

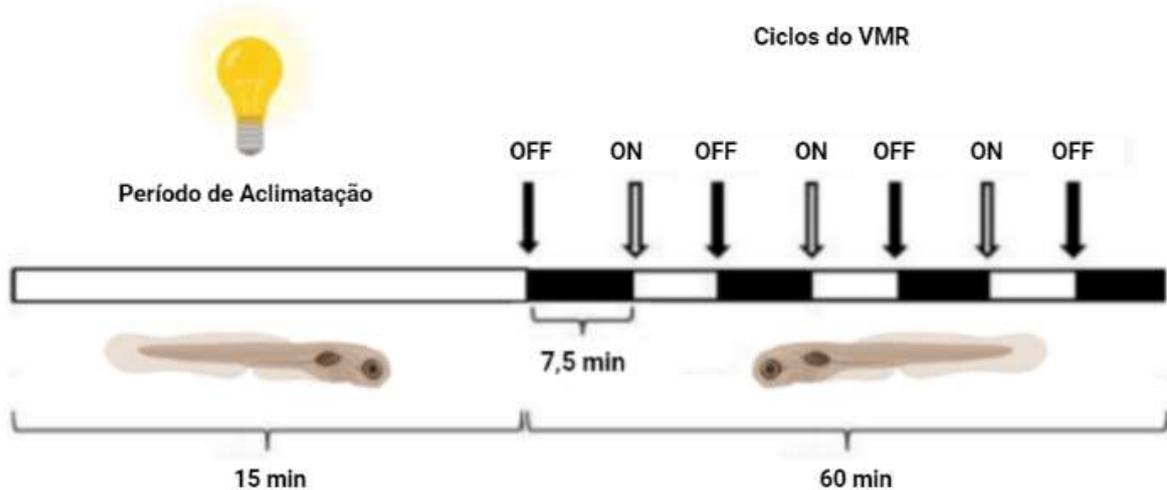
Para observar a **VMR**, as larvas tratadas foram transferidas para uma placa de 96 poços (1 larva/poço) e imersas em 100 μ L de meio E2 0,5x para avaliação do comportamento visual motor no equipamento Zebrabox (ViewPoint Life sciences, Lyon, França), como esquematizado na **Figura 16**. Para a aclimação das larvas, elas foram mantidas por 15 min em um ambiente com luz. Após esse período, foram expostas a uma série de 6 ciclos alternando escuro-claro (7,5 min escuro/7,5 min claro), como exemplificado na **Figura 17**. O deslocamento foi quantificado e interpretado através do ZebraLab™ versão 3.52 (Pisa, Itália) por ViewPoint. Já a velocidade média foi padronizada entre 1,8 e 4,0 mm/s, onde valores inferiores a 1,8 mm/s indicaram inatividade, e maiores de 4,0 mm/s foram interpretados como agitados. A distância total foi calculada pela soma das distâncias percorridas nas velocidades média e agitada, e a velocidade média total através da divisão da distância pelo tempo de análise durante o período de exposição. O padrão de gráfico que é gerado é realçado na **Figura 18**.

Figura 16. Esquema representativo da disposição das larvas no Teste de VMR.



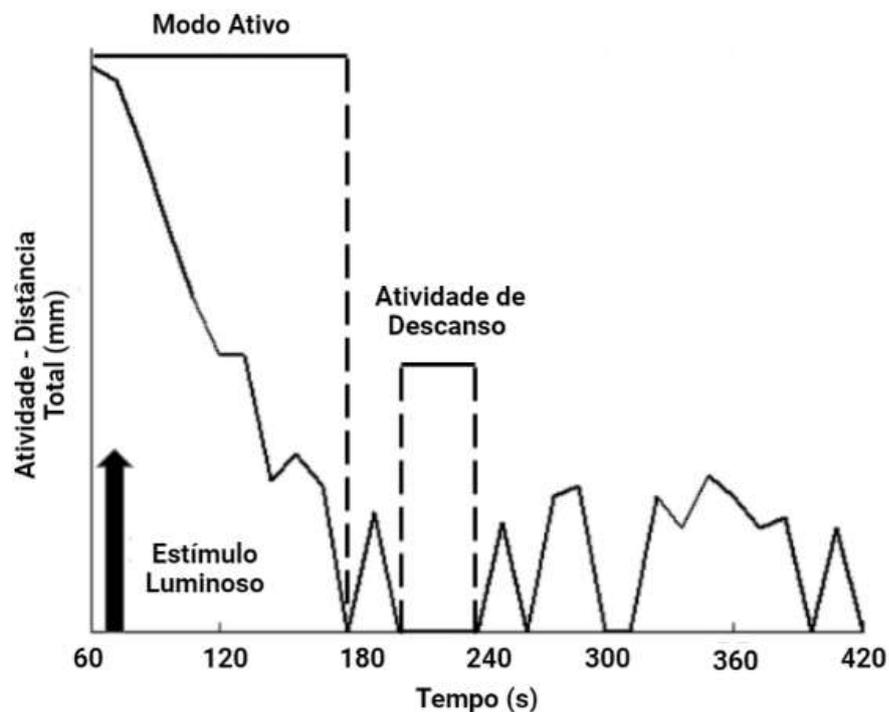
No estágio apropriado, as larvas de zebrafish são colocadas em uma placa de 96 poços para facilitar o rendimento, armazenamento e coleta de dados durante o ensaio do VMR. As larvas são dispostas no sistema Zebrabox e expostas ao início da luz ou ao estímulo do deslocamento da luz. A produção locomotora das larvas é registrada e processada. Os dados gravados podem ser visualizados por meio de programas como Graph Prism.
Fonte: Ganzen *et al.* (2017).

Figura 17. Esquema representativo da performance do Teste de VMR.



As larvas foram adaptadas ao claro no Zebrabox por 15 min imediatamente antes do experimento. O ensaio durou 1h com estímulos luminosos: OFF-ON alternados que duravam 7,5 min. **Fonte:** Adaptado de Gao *et al.* (2014).

Figura 18. Esquema representativo do resultado expresso gráfico gerado a partir do teste de VMR.



O principal recurso utilizado no VMR para obter uma resposta locomotora das larvas de zebrafish consiste no estímulo luminoso. No período de aclimação é perceptível o modo ativo de nado das larvas, seguido por picos gerados devido a transição claro/escuro (on/off) gerado no zebrabox e uma atividade de descanso nos intervalos entre essa transição. **Fonte:** Adaptado de Gao *et al.* (2016).

4.5 Preparação Histológica das Larvas de Zebrafish

Inicialmente, as larvas de *D. rerio* foram anestesiadas com a adição de Tricaína 0.4% ao meio E2 0.5x ou PTU 0,001%, por dois minutos. Em seguida, as larvas foram imersas em tricaína 4% para o processo de eutanásia. Para confirmar se os seus batimentos cardíacos

pararam, as larvas foram observadas em estereomicroscópio M205C (Microsistemas Leica) em solução de água sanitária 10%. Após a eutanásia, as larvas foram lavadas 3x com o meio E2 0,5x para remoção de toda tricaína.

Para o preparo de lâminas histológicas, as larvas de zebrafish foram primeiramente transferidas para uma placa de 12 poços (5 larvas/poço) e fixadas em 2 mL de formaldeído 4% overnight e armazenados a 4 °C na geladeira. No dia seguinte, a solução de formol foi removida e as larvas passaram por um processo cuidadoso de remoção do formaldeído, em temperatura ambiente, que consistiu de: duas passagens em 2 mL de PBSt (Solução de PBS + 0,1% Tween 20) sob agitação por 5 min. Logo após, o PBSt foi removido e as larvas passaram pelo processo de desidratação com a aplicação seriada de Metanol (MeOH 30%, 50% e 70%), diluído em PBSt, por 10 min sobre a mesa agitadora. A diluição ocorreu conforme descrito na **Tabela 04**. Entre uma lavagem e outra, o conteúdo da solução anterior foi removido cuidadosamente para não causar dano às larvas.

Tabela 04. Diluição de álcoois para desidratação e hidratação histológica.

[Metanol - CH ₃ OH]	Solução Preparada
Metanol 30%	600 µL + 1400 µL PBSt
Metanol 50%	1000 µL + 1000 µL PBSt
Metanol 70%	1400 µL + 600 µL PBSt

Fonte: João Mateus (2022).

Com isso, as larvas foram mantidas na placa de 12 poços em metanol 100% a -20 °C em freezer, por no mínimo 14h. Logo após, todo o conteúdo de metanol foi removido cuidadosamente e as amostras passaram por um processo sequencial de reidratação, em temperatura ambiente, com banhos em MeOH (70%, 50% e 30%) diluído em PBSt por 10 min sob agitação, seguido de dois banhos em PBSt por 5 min na mesa agitadora. Entre uma lavagem e outra, o conteúdo da solução anterior foi removido cuidadosamente para não causar dano às larvas. Em seguida, o PBSt foi removido e as larvas foram transferidas para um microtubo de 2 mL (12 larvas/microtubo), onde foram mantidas overnight em um 1 mL de solução de sucrose 30% em temperatura ambiente.

No dia seguinte, as amostras passaram por uma substituição de sucrose pela solução de OCT (temperatura ótima de corte): removeu-se 500 µL de sucrose e adicionou-se 500 µL de OCT, deixando as larvas em repouso durante 1h na solução. Esta etapa foi repetida removendo-se 500 µL do líquido e adicionando-se 500 µL de OCT, onde novamente as larvas foram deixadas em repouso durante 1h. Após estes procedimentos, seguiu-se para a etapa de emblocamento em OCT: as larvas foram dispostas em criomoldes (03 larvas/molde) embebidos em OCT (Neg-50 Richard Allan) na posição decúbito-ventral (coronal). Os cortes histológicos foram confeccionados em um criótomo (Criostato Leica CM1860), sob a temperatura de 30-31 °C, elemento Routier 10 e espessura de 18 µm. A “pescagem” dos tecidos foi realizada com lâminas cobertas com poly-L-lysine.

Para a coloração tecidual, as lâminas preparadas foram dispostas em frascos com ranhuras e foram submersas em solução de Hematoxilina por 5 min para fixação dos núcleos celulares. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água corrente de maneira suave por 5 min e mantidas em água destilada por aproximadamente 2 min. Logo depois, as lâminas foram incluídas em solução de álcool 80% por 2 min e em Eosina por 1 minuto. As larvas coradas também foram submersas em álcool 95% por 2 min para remoção da solução de eosina em excesso e lavadas em água destilada por 2 min. Esta última etapa repetiu-se 2 vezes. Depois, as lâminas foram dispostas em álcool PA (100%) por 2 min e lavadas em água destilada por 2 min. Esta etapa também foi executada 2 vezes. Por fim, as lâminas foram submersas de maneira reversa nos álcoois 95% e 80% duas vezes por 2 min cada e lavadas em água destilada por 2 min após cada banho de álcool.

As lâminas foram secadas em estufa em até 30 °C por 5 min e, para a fixação das lamínulas (Precision Glass Line 24x50), pingou-se 3 gotas de Fluoromount-GTM nas lâminas, selando-as com esmalte-base. A leitura das lâminas ocorreu após 25 min (período de secagem) através de microscopia de luz.

4.6 Avaliação das Camadas Retinianas

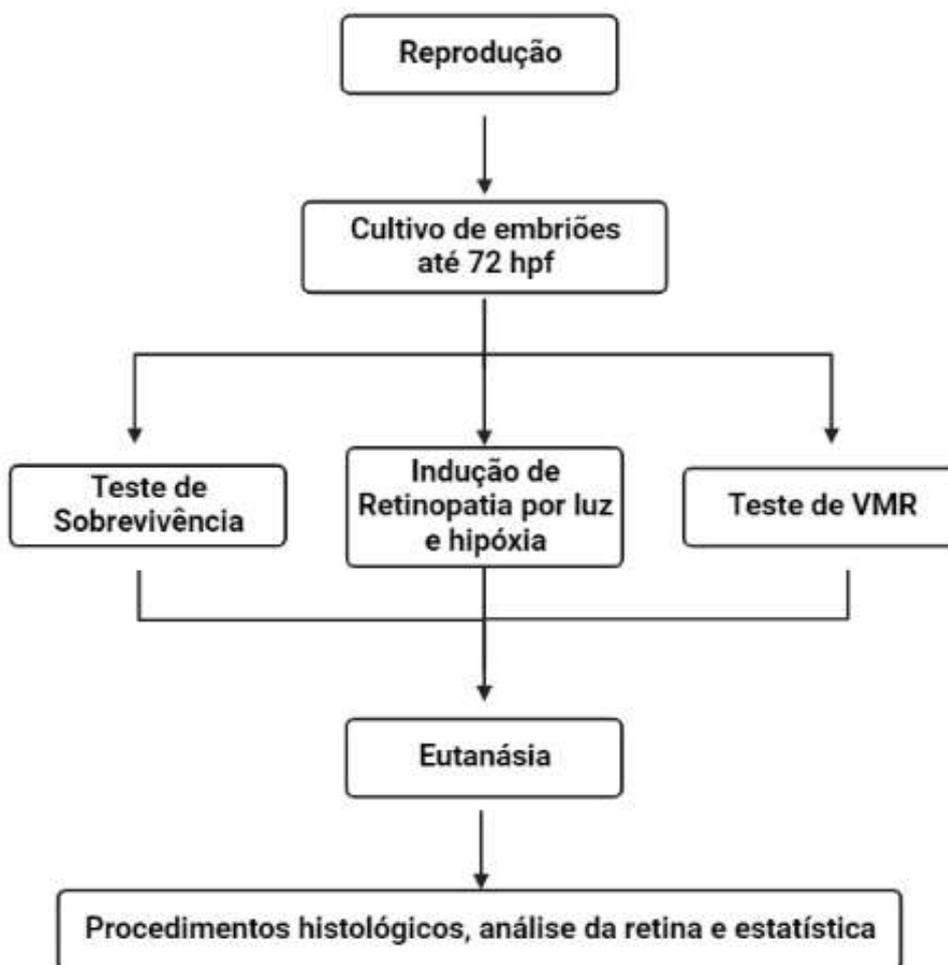
Para cada grupo de 12 larvas, 08 seções coradas de 03 larvas foram analisadas através de fotografias registradas com auxílio de um microscópio de luz com um aumento de 40x (Axio Imager A1, Carl Zeiss; Oberkochen, Alemanha). As imagens foram avaliadas por meio do software ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), medindo a espessura da: Camada de Células Ganglionares (GCL), Camada Plexiforme Interna (IPL),

Camada Nuclear Interna (INL), Camada Plexiforme Externa (OPL), Camada Nuclear Externa (ONL) e do Epitélio Pigmentado da Retina (RPE). As medições foram feitas na escala de 50 μm e em triplicata para obtenção da média da espessura de cada camada.

4.7 Análises Estatísticas

Todos os valores obtidos foram expressos como \pm SEM, aplicando de 7-10 larvas por grupo analisado. Os experimentos ocorreram em duplicata e a avaliação dos dados paramétricos se sucedeu com análises de teste T. O valor de $p < 0,05$ foi utilizado como significativo através do GraphPad Prism (GraphPad Software, v6.02, 2013, La Jolla, CA, USA).

Figura 19. Fluxograma da metodologia aplicada no presente trabalho.

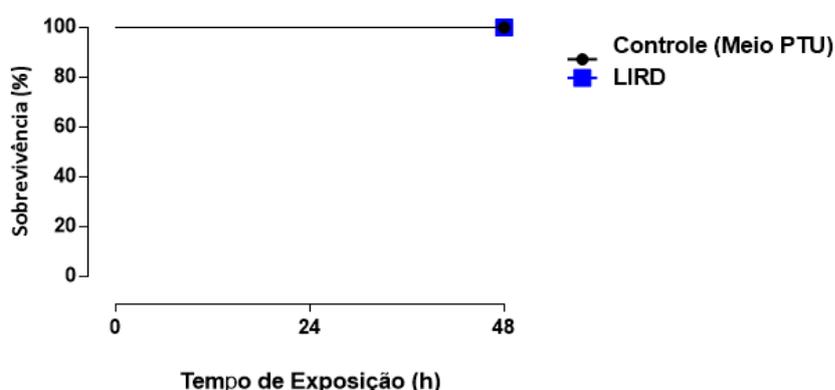
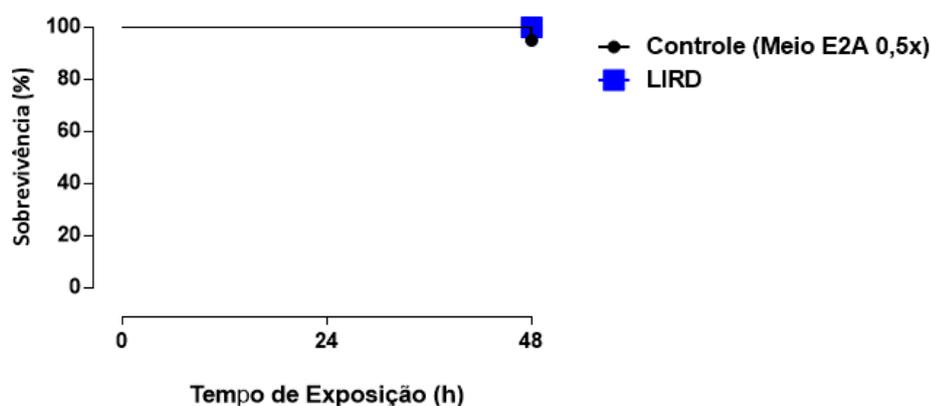


Fonte: João Mateus (2022).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de testar a reprodutibilidade de diferentes métodos de indução de retinopatia, um total aproximado de 200 larvas de zebrafish foi empregado para a realização dos métodos já descritos. Adicionalmente, a sobrevivência das larvas nas soluções de incubação (E2A 0,5x e PTU 0,001%) e tratamento (CoCl_2 0,5 mM) foi avaliada. Como é possível observar nos **Painéis 01** e **02**, a mortalidade das larvas mostrou-se baixa. Para os grupos cultivados previamente em escuro por 24h - LIRD24, a taxa de sobrevivência foi expressa da seguinte forma: 100% (grupo controle-PTU e tratado/cultivados em E2A e PTU) e 95% (grupo controle-E2A).

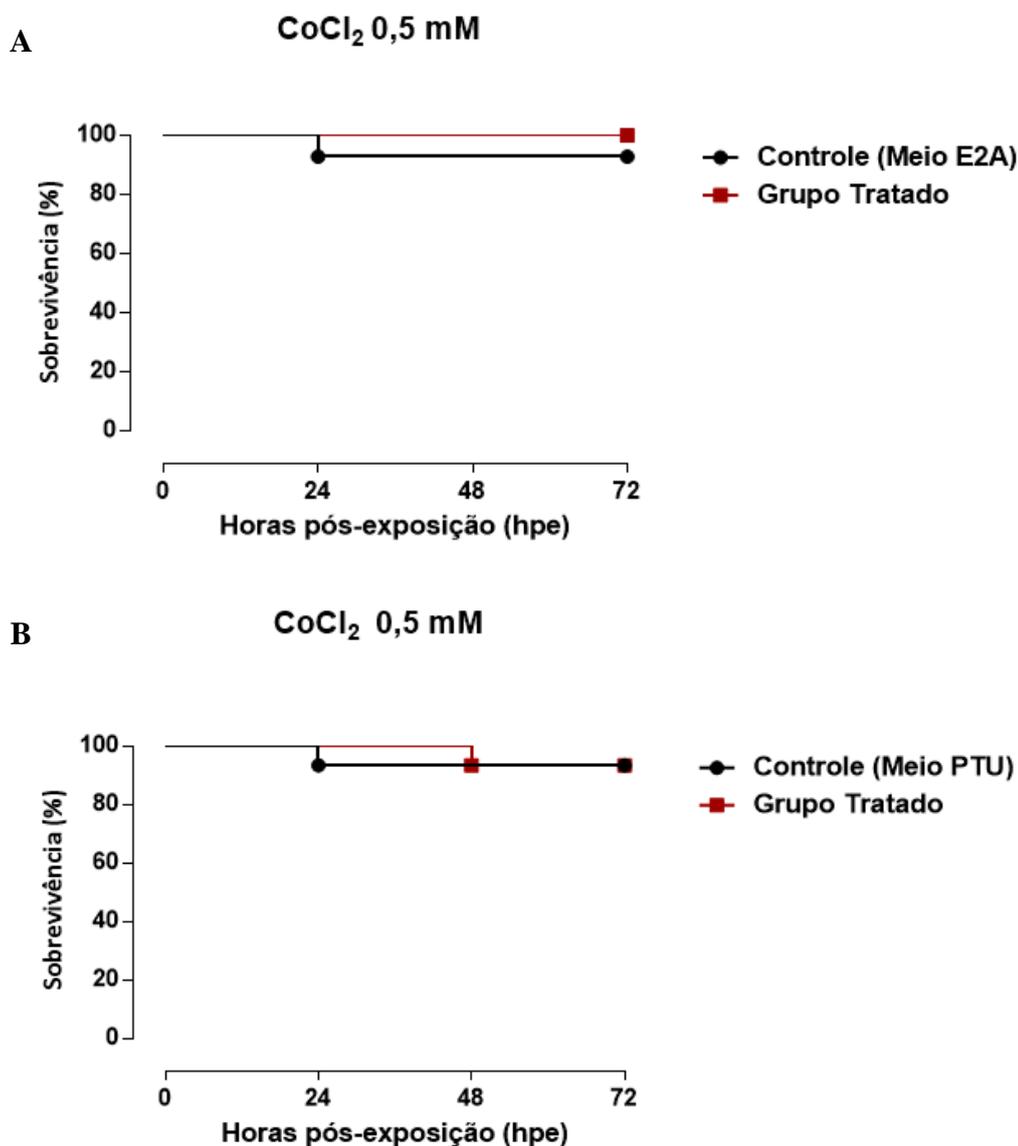
Painel 01. Gráficos de sobrevivência de larvas expostas à luz.



Larvas de zebrafish foram mantidas em uma placa de 6 poços com meio E2A 0,5x (n= 20) ou PTU 0,001% (n=26) e expostas em fotoperíodo normal (controle) ou isoladas da luz por 24h (LIRD24), seguido por exposição à luz intensa (15000 lux) de 96 a 120 horas pós-fertilização (24h de exposição). A taxa de sobrevivência foi contada a cada 24h. Após o período de exposição, a taxa de sobrevivência de 100% foi registrada para o grupo controle (cultivado em PTU) e para os grupos LIRD (cultivado em E2A e PTU), enquanto o grupo controle (cultivado em E2A) teve uma taxa de sobrevivência de 95%. **Fonte:** João Mateus (2022).

Já para os grupos expostos à solução de CoCl_2 (**Painel 02**), a taxa de sobrevivência observada foi: 92,8% para o grupo controle (cultivado em E2A); 100% para o grupo exposto (cultivado em CoCl_2 +E2A); e 93,33% para o grupo controle (cultivado em PTU) e tratado (cultivado em CoCl_2 +PTU).

Painel 02. Gráficos de sobrevivência de larvas expostas à solução de Cloreto de Cobalto (CoCl_2) 0,5 mM.

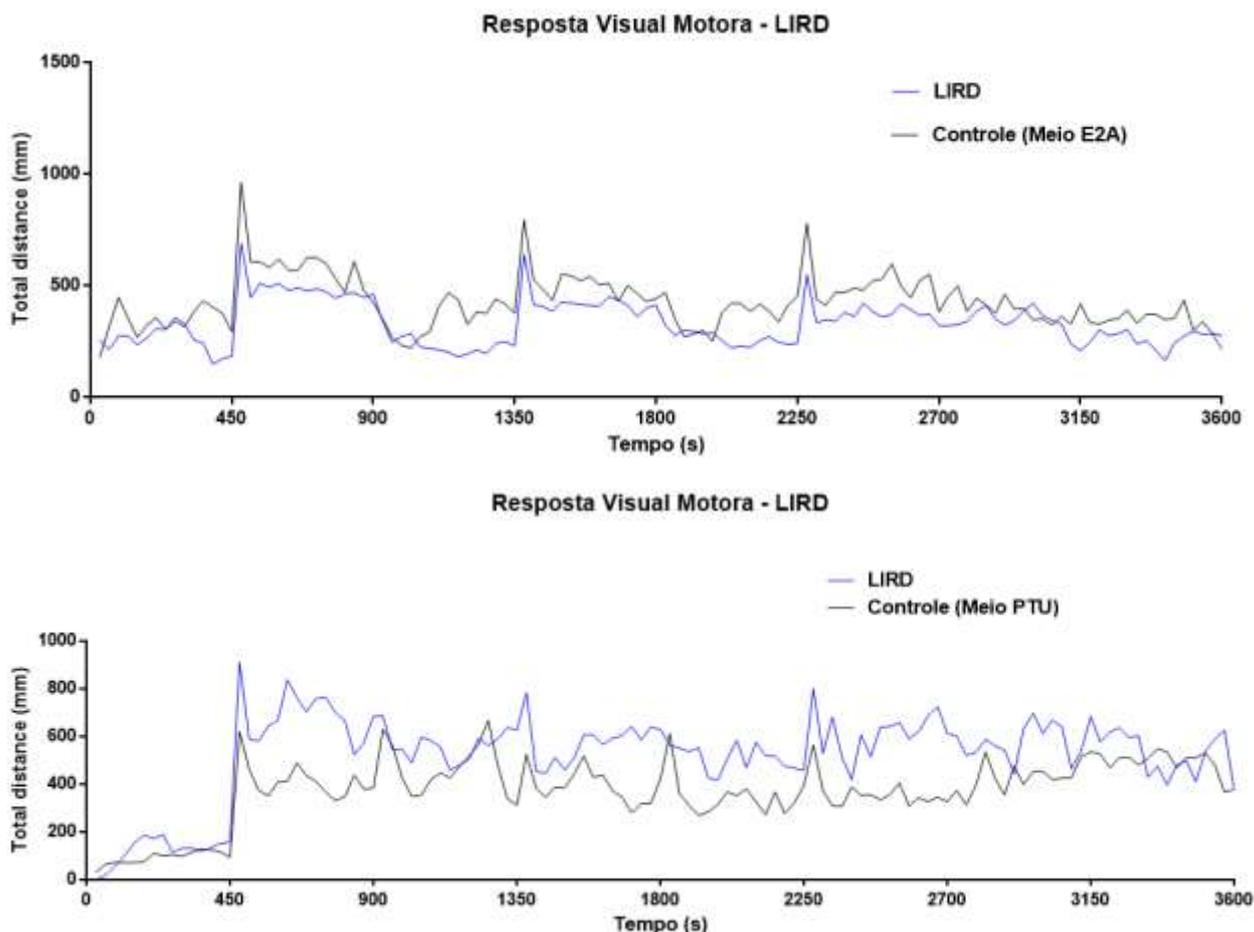


Quinze larvas de zebrafish ($n=5/\text{poço}$) foram utilizadas para os grupos controle (larvas incubadas nos meios E2A 0,5x ou PTU 0,001%) e tratado (larvas expostas à solução de CoCl_2 0,5 mM + E2A ou PTU) do experimento. A taxa de sobrevivência foi registrada a cada 24h. Após 72 hpe: (**A**) o grupo controle (cultivado em E2A) apresentou uma taxa de sobrevivência de 92,8%, enquanto que o grupo tratado correspondeu a 100%; (**B**) Já para o grupo controle (cultivado em PTU) e o seu grupo tratado, ambos apresentaram uma taxa de sobrevivência de 93,33%. **Fonte:** João Mateus (2022).

Com o objetivo de avaliar a eficácia dos métodos de indução de retinopatia em causar dano no comportamento visual das larvas, o Teste de Resposta Visual Motora foi performedo.

No grupo de larvas em que a retinopatia foi induzida por luz (LIRD24) e incubadas no meio E2A, a distância percorrida pelo grupo LIRD foi menor do que as larvas-controle (**Painel 03**). Isso diferiu do grupo que foi incubado no meio PTU, onde as larvas que ficaram reclusas em total escuro por 24h apresentaram uma distância percorrida maior do que aquelas que pertenciam ao grupo controle.

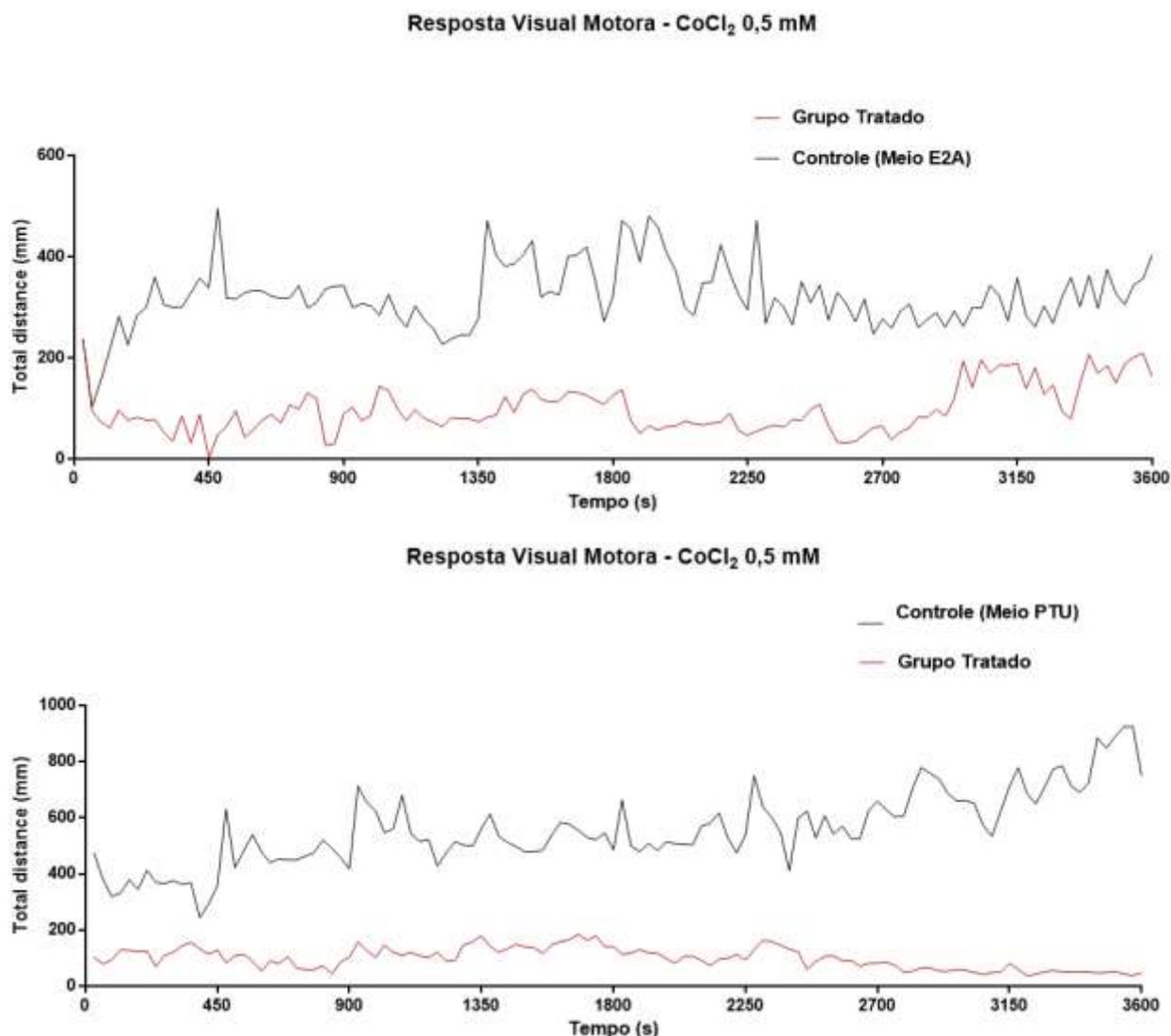
Painel 03. Gráficos de Resposta Visual Motora (VMR) das larvas expostas à luz.



Larvas de zebrafish foram mantidas em uma microplaca de 06 poços com o meio de incubação (E2A 0,5x ou PTU 0,001%) e expostas a um fotoperíodo normal (grupo controle) ou a uma condição de escuro por 24h (LIRD24), seguido por uma exposição à luz intensa (15000 lux) de 96 a 120 horas pós-fertilização (hpf). Após o período de exposição, as larvas foram individualmente distribuídas em uma microplaca de 96 poços e a sua atividade locomotora foi analisada no sistema Zebibox (ViewPoint 3.22.3.85, Viewpoint Life Sciences, Inc., Civrieux, França). O teste consistiu, inicialmente, em um período de aclimação no claro durante 15 min, seguido por 60 min de ciclos alternados de estímulos luminosos e de escuro em temperatura ambiente. A atividade locomotora foi avaliada pela medição da distância total percorrida (mm). O grupo controle incubado em meio E2A teve uma maior atividade locomotora, enquanto que o grupo previamente privado no escuro e incubado em PTU realizou uma maior locomoção do que seu grupo controle. **Fonte:** João Mateus (2022).

Em relação às larvas expostas à solução de Cloreto de Cobalto, para ambos os grupos incubados tanto em meio E2A e PTU, as larvas tratadas percorreram uma distância menor quando comparadas às larvas-controle (**Painel 04**).

Painel 04. Gráficos de Resposta Visual Motora (VMR) das larvas expostas à solução de CoCl_2 0,5 mM.



Larvas de zebrafish foram mantidas em uma microplaca de 06 poços com o meio E2A ou PTU (grupo controle) ou CoCl_2 + PTU ou CoCl_2 + E2A (tratamento) por 72h (de 72 a 144 horas pós-fertilização - hpf). Após o período de exposição, as larvas foram individualmente distribuídas em uma microplaca de 96 poços e a sua atividade locomotora foi analisada no sistema Zebbox (ViewPoint 3.22.3.85, Viewpoint Life Sciences, Inc., Civrieux, França). O teste consistiu, inicialmente, em um período de aclimação no claro durante 15 min, seguido por 60 min de ciclos alternados de estímulos luminosos e de escuro em temperatura ambiente. A atividade locomotora foi avaliada pela medição da distância total percorrida (mm). Em ambos os testes, o grupo tratado apresentou uma menor atividade locomotora em relação ao grupo controle. **Fonte:** João Mateus (2022).

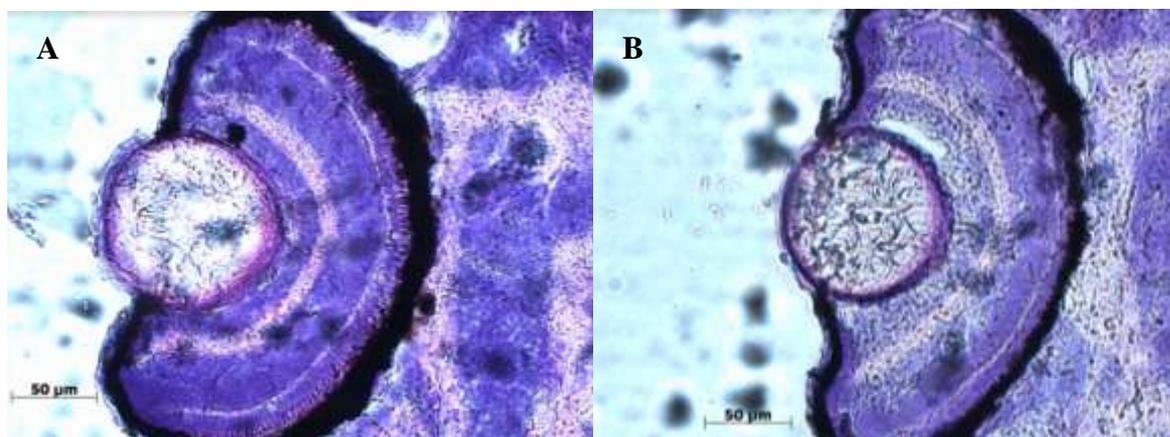
O VMR consiste no período de atividade locomotora inicial do zebrafish que é guiada pela visão (GAO *et al.*, 2016). Em um ambiente constante de luz, as larvas de zebrafish apresentam movimentos repetitivos, impulsivos e circulares, mas menos extensos (BURGESS; GRANATO, 2007). Já no escuro contínuo, as larvas se comportam de maneira agitada seguido por um estado de repouso (BURGESS; GRANATO, 2007). Durante o VMR, no entanto, as respostas das larvas são expressas em um nado repentino e vigoroso nos momentos de alternância claro/escuro (GANZEN *et al.*, 2017). Todavia, a exposição a

químicos até o estágio de 6 dpf pode resultar em malformações no olho, influenciando na atividade locomotora e comportamento visual (PADILLA *et al.*, 2011), o que parece ter sido observado através do menor deslocamento das larvas tratadas com CoCl_2 .

Quando expostos à luz intensa, espécies suscetíveis podem ter a sua camada de fotorreceptores danificada e/ou lesionada (ORGANISCIAK; VAUGHAN, 2010). Assim, sem ter a integridade das células que são responsáveis pela percepção de luz, um efeito reductivo na atividade locomotora pode surgir (WANG *et al.*, 2017), como observado no grupo LIRD. Além disso, com a sobrecarga dos fotorreceptores, as células ganglionares entram em um estado de hiperatividade, que culmina na redução da acuidade visual (TELIAS *et al.*, 2019).

Para avaliar as alterações morfológicas da retina nas larvas de zebrafish submetidas aos métodos de indução de retinopatia, lâminas histológicas foram preparadas para permitir a medição das camadas retinianas (**Painéis 05 e 06**).

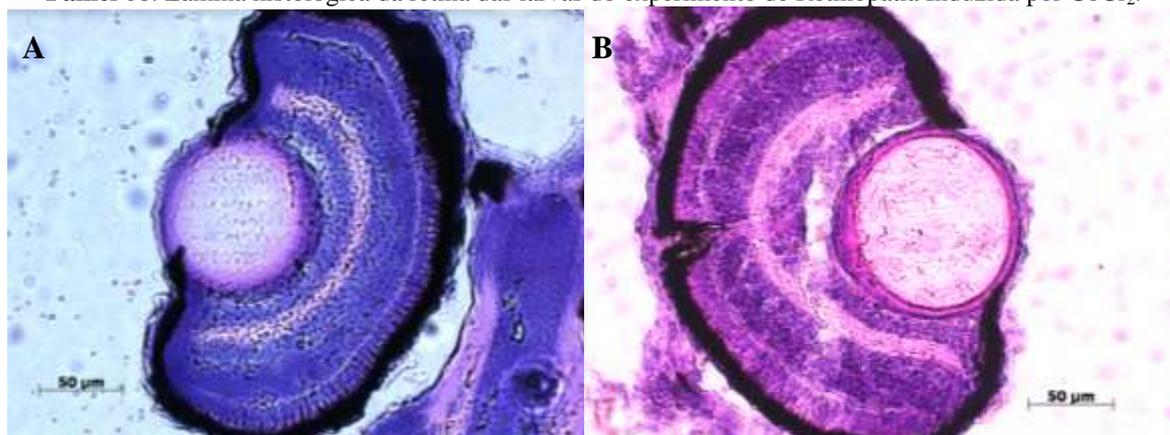
Painel 05. Lâmina histológica da retina das larvas do experimento de retinopatia induzida por Luz.



Para medir as camadas retinianas das larvas que foram induzidas à retinopatia por exposição à luz intensa, lâminas histológicas da porção da retina foram confeccionadas e coradas em HE. Na Figura, está representada em (A) a retina de uma larva do grupo controle (cultivado em E2A) e em (B) a retina de uma larva do grupo tratado. Aumento: 40x. Escala: 50 μm . **Fonte:** João Mateus (2022).

No grupo de larvas que foram sensibilizadas à luz (LIRD24), as camadas RPE, ONL, OPL e INL não apresentaram alterações significativas quando comparadas ao grupo controle (**Painel 07**). No entanto, as Camadas Plexiforme Interna ($p < 0,0128$) e a de Células Ganglionares ($p < 0,035$) apresentaram uma espessura aumentada. Já na Camada de Fotorreceptores do grupo LIRD detectada uma redução significativa na sua espessura ($p < 0,0001$), quando comparada ao grupo controle.

Painel 06. Lâmina histológica da retina das larvas do experimento de Retinopatia Induzida por CoCl_2 .



Para medir as camadas retinianas das larvas que foram induzidas à retinopatia por exposição à solução de Cloreto de Cobalto, lâminas histológicas da porção da retina foram confeccionadas e coradas em HE. Na Figura, está representada em (A) a retina de uma larva do grupo controle (cultivado em E2A) e em (B) a retina de uma larva do grupo tratado. Aumento: 40x. Escala: 50 μm . **Fonte:** João Mateus (2022).

No grupo de larvas que foram expostas à solução de Cloreto de Cobalto (**Painel 08**), a espessura das Camadas Retinianas RPE, PRL, ONL, INL, IPL e GCL não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle. Todavia, a Camada Plexiforme Externa mostrou um aumento significativo em sua espessura ($p < 0,0207$), quando comparado ao grupo das larvas-controle.

Alterações observadas na retina podem surgir em consequência de vários fatores, incluindo a ação do sistema imune no tecido lesado (MALESKI *et al.*, 2022). O estresse oxidativo gerado em RPE também é um dos fatores que podem contribuir com a degeneração da retina (CHENG *et al.*, 2019). A exposição demasiada à luz, por exemplo, funciona como um agente indutor de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) e a formação desses compostos já foi observado devido à hipóxia gerada pelo tratamento com Cloreto de cobalto (PLAFKER; O'MEALEY; SZWEDA, 2012; CHENG *et al.*, 2019). Com isso, a produção de EROs nas células epiteliais retinianas ativa vias de sinalização que são capazes de desencadear a divisão celular a fim de restaurar o tecido lesado (CARGNELLO; ROUX, 2011; GLOTIN *et al.*, 2006).

Eventos como mutação genética no RPE e modificações metabólicas são os principais responsáveis pelas lesões que ocorrem na retina (YU; CRINGLE, 2005). O epitélio pigmentado da retina, entre muitas funções, possui o papel de suporte metabólico das células fotorreceptoras e promoção de atividade anti-fototóxica (SIMÓ *et al.*, 2010). A exposição excessiva à luz, no entanto, é capaz de modular mutações gênicas, comprometendo a relação RPE-PRL (GUZIEWICZ *et al.*, 2018). Com isso, é de se esperar uma perda considerável de células receptoras (YU; CRINGLE, 2005), como observado pela diminuição de PRL no grupo

LIRD.

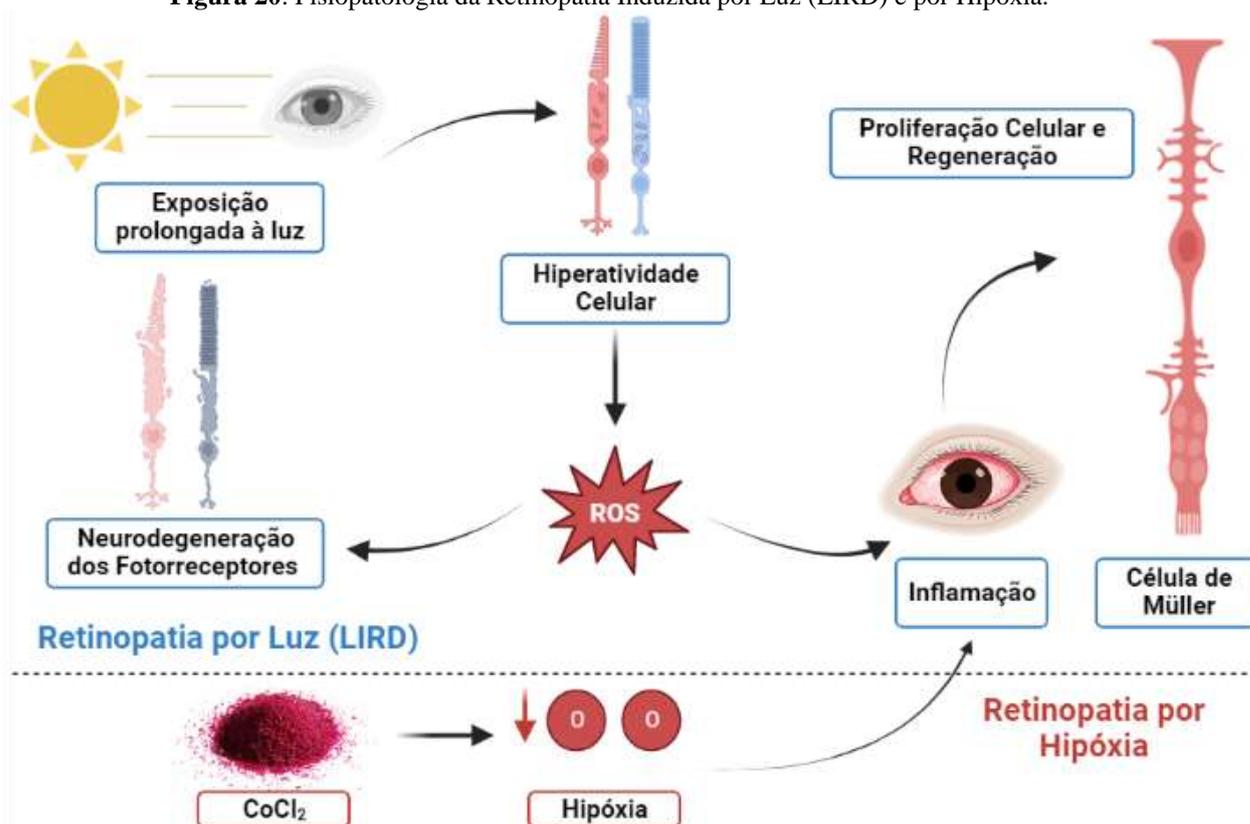
No estado de homeostasia ocular, a retina de zebrafish desenvolve-se continuamente, sendo as Glias de Müller a fonte de progenitores multipotentes da maioria dos tipos celulares retinianos (WAN; GOLDMAN, 2016). Todavia, em situações de injúria retiniana, os progenitores uni e multipotentes formados a partir das células da Müller têm o processo de divisão celular estimulado, resultando no aumento da zona germinativa circunferencial da retina (WAN; GOLDMAN, 2016; OTTESON; HITCHCOCK, 2003).

Durante as lesões geradas na retina de zebrafish, a resposta desencadeada nas células de Müller faz com que elas atuem semelhante às células-tronco, promovendo a regeneração das camadas retinianas (MALESKI *et al.*, 2022). Entre os mecanismos de resposta ao dano, destaca-se a hipertrofia da INL, onde as células de Müller estão localizadas (BRINGMANN; WIEDEMANN, 2012; THOMAS *et al.*, 2016). Com isso, a hipótese de que o fenômeno de aumento de espessura em algumas das camadas das larvas de zebrafish que foram tratadas (tanto no grupo LIRD quanto no grupo exposto ao CoCl_2) seja uma consequência de regeneração e outros eventos teciduais citados anteriormente parece ser apoiado pela literatura.

A redução significativa de fotorreceptores em larvas de zebrafish expostas à luz intensa é esperada uma vez que estas células são as principais atingidas durante essa forma de lesão (RAJARAM; SUMMERBELL; PATTON, 2014). No tratamento com cobalto, entretanto, apesar dos danos nos fotorreceptores, uma atividade proliferativa de progenitores pode ser observada, o que permite a reconstituição dessa camada retiniana (MEDRANO *et al.*, 2018). Em um trabalho em que a administração de CoCl_2 foi feita através de injeção deste composto no vítreo de zebrafish adulto, foi observada a atividade proliferativa de células de Müller e progenitores, redução de células bipolares, dano vascular e regeneração (MEDRANO *et al.*, 2018).

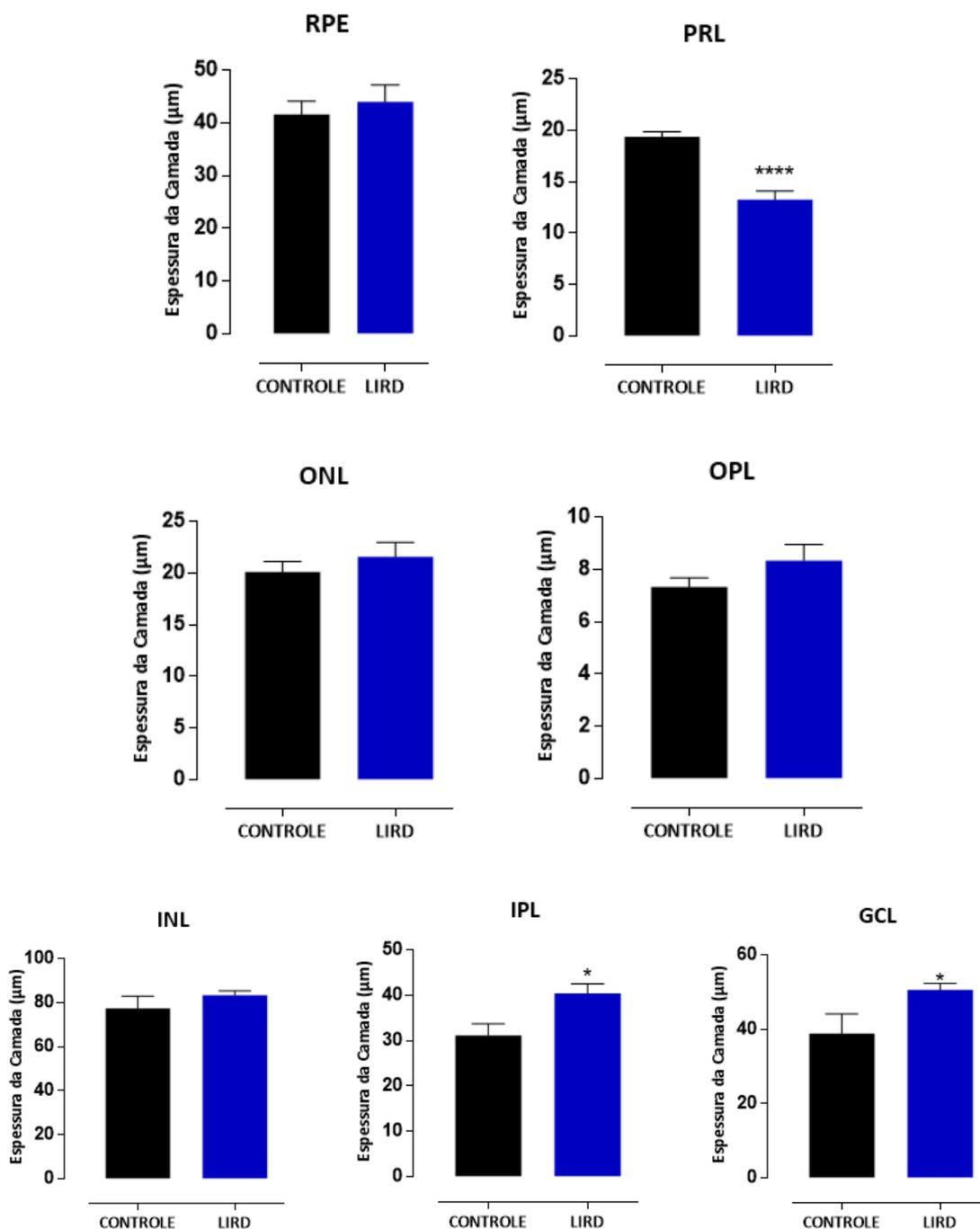
As células de Müller também são capazes de, a curto prazo, impedir a ação citotóxica da luz sobre os fotorreceptores (THOMAS *et al.*, 2016). Entretanto, sem estímulos como a proliferação celular, a ação regenerativa da retina é inibida (THOMAS *et al.*, 2016). Como a retinopatia induzida por luz é caracterizada por uma sobrecarga funcional sobre os fotorreceptores (EDWARD *et al.*, 1991), é esperado uma redução na camada PRL como foi destacado nos resultados deste trabalho. Os mecanismos fisiopatológicos das retinopatias induzidas por luz e hipóxia que resultam no aumento ou diminuição da espessura das camadas retinianas estão ilustrados na **Figura 20**.

Figura 20. Fisiopatologia da Retinopatia Induzida por Luz (LIRD) e por Hipóxia.



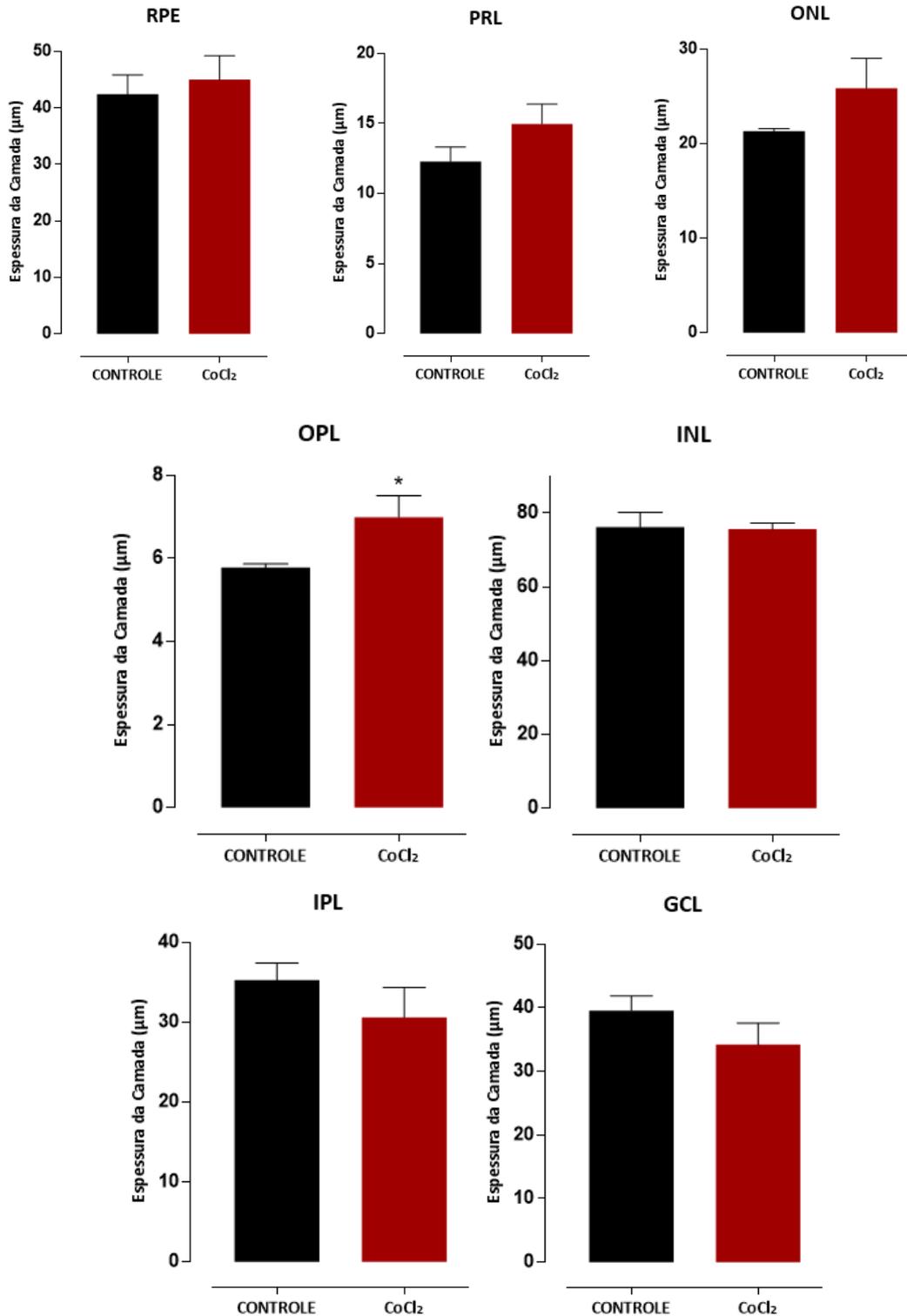
A exposição prolongada da retina ao espectro luminoso visível desencadeia nos fotorreceptores uma hiperatividade celular. A exaustão gerada na célula acaba por formar Espécies Reativas de Oxigênio (EROs/ROS) que sinalizam morte celular, induzindo a neurodegeneração dos cones e bastonetes e redução da camada retiniana em que eles se encontram. Os EROs, no entanto, também podem funcionar como sinalizadores para a cascata de inflamação, que desencadeia nas células de Müller uma resposta regenerativa na retina de zebrafish através da proliferação celular e reconstituição das camadas retinianas, aumentando-as. Já a condição de hipóxia, que pode ser mimetizada pela exposição do zebrafish à CoCl_2 , também é capaz de induzir a formação de Fatores de Transcrição como VEGF e HIF que ativam o processo inflamatório e, conseqüentemente, o processo regenerativo na retina de *D. rerio* mediante a ação das Células de Müller. **Fonte:** João Mateus (2022).

Painel 07. Gráficos da espessura das camadas da retina das larvas expostas à luz.



Lâminas histológicas de larvas de zebrafish incubadas em meio E2A 0,5x de fotoperíodo normal (controle) e reclusas no escuro/expostas à luz por 24h (tratado) foram preparadas para registro fotográfico e medição das camadas da retina no programa ImageJ. As camadas do grupo tratado RPE, ONL, OPL, INL, IPL (* $p < 0,0128$) e GCL (* $p < 0,035$) apresentaram uma maior espessura e PRL uma menor espessura (**** $p < 0,0001$), quando comparadas ao grupo controle. **Fonte:** João Mateus (2022).

Painel 08. Gráficos da espessura das camadas da retina das larvas expostas à solução de CoCl_2 0,5 mM.



Lâminas histológicas de larvas de zebrafish incubadas em meio E2A 0,5x (controle) e expostas à solução de CoCl_2 por 72h foram preparadas para registro fotográfico e medição das camadas da retina no programa ImageJ. As camadas do grupo tratado RPE, PRL, ONL e OPL (* $p < 0,0207$) apresentaram uma maior espessura e INL, IPL e GCL uma menor espessura, quando comparadas ao grupo controle. **Fonte:** João Mateus (2022).

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho buscou avaliar a viabilidade do uso de larvas como método alternativo para o estudo de retinopatias. Ademais, o nosso objetivo principal consistiu em padronizar diferentes métodos de indução de retinopatia em larvas de zebrafish para o laboratório a fim de realizar estudos terapêuticos futuros para esta doença. Com isso, os protocolos testados mostraram alterações aparentes no comportamento visual das larvas e as modificações nas camadas retinianas foram estatisticamente aparentes, o que indica que os métodos aqui empregados parecem ser eficazes para a indução de retinopatia. Por fim, a utilização de larvas dentro do estágio de 72-144 hpf mostrou-se ideal para a indução de retinopatias, representando uma alternativa para a substituição animal, o desenvolvimento de novas terapias e estabelecimento como modelo de estudo para doenças oculares.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, Fariba; SAMAEI, Mohammad Reza. The effect of temperature on airborne filamentous fungi in the indoor and outdoor space of a hospital. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 17, p. 16868-16876, 2019.
- ABDOLLAHPOUR, Hamed; FALAHATKAR, Bahram; LAWRENCE, Christian. The effect of photoperiod on growth and spawning performance of zebrafish, *Danio rerio*. **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100295, 2020.
- ARUNACHALAM, M. et al. Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish* 2013, 10, 1–14.
- AVDESH, Avdesh et al. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 69, p. e4196, 2012.
- BAILEY, Jordan; OLIVERI, Anthony; LEVIN, Edward D. Zebrafish model systems for developmental neurobehavioral toxicology. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 99, n. 1, p. 14-23, 2013.
- BABICH, Remy; VAN BENEDEN, Rebecca J. Effect of arsenic exposure on early eye development in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Applied Toxicology**, v. 39, n. 6, p. 824-831, 2019.
- BEEKHUIJZEN, Manon et al. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. **Reproductive Toxicology**, v. 56, p. 64-76, 2015.
- BELANGER, Scott E.; RAWLINGS, Jane M.; CARR, Gregory J. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 8, p. 1768-1783, 2013.
- BILOTTA, Joseph et al. Establishing and maintaining a low-cost zebrafish breeding and behavioral research facility. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**, v. 31, n. 1, p. 178-184, 1999.
- BLANCO-VIVES, B.; SANCHEZ-VAZQUEZ, F. J. Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. **Physiology & Behavior**, v. 98, n. 3, p. 268-275, 2009.
- BRINGMANN, Andreas; REICHENBACH, Andreas. Role of Müller cells in retinal degenerations. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 6, n. 4, p. 72-92, 2001.
- BRINGMANN, Andreas; WIEDEMANN, Peter. Müller glial cells in retinal disease. **Ophthalmologica**, v. 227, n. 1, p. 1-19, 2012.
- BROWN, Daniel R. et al. Advances in the study of heart development and disease using zebrafish. **Journal of cardiovascular development and disease**, v. 3, n. 2, p. 13, 2016.

BURGER, L. L. et al. Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. **Journal of molecular endocrinology**, v. 33, n. 3, p. 559-584, 2004.

BURGESS, Harold A.; GRANATO, Michael. Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 14, p. 2526-2539, 2007.

CARDOSO, Ariane Silva et al. Análise ecotoxicológica de fármacos utilizados em cultivo de alevinos. **Gestão da Piscicultura & Sustentabilidade**, p. 121.

CARGNELLO, Marie; ROUX, Philippe P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 75, n. 1, p. 50-83, 2011.

CARTNER, Samuel et al. (Ed.). *The Zebrafish in Biomedical Research: Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications*. 2019.

CARVALHO, António Paulo; ARAÚJO, Leonor; SANTOS, Miguel M. Rearing zebrafish (*Danio rerio*) larvae without live food: evaluation of a commercial, a practical and a purified starter diet on larval performance. **Aquaculture Research**, v. 37, n. 11, p. 1107-1111, 2006.

CASSAR, Steven et al. Use of zebrafish in drug discovery toxicology. **Chemical research in toxicology**, v. 33, n. 1, p. 95-118, 2019.

CHENG, Zhengqi et al. A derivative of betulinic acid protects human Retinal Pigment Epithelial (RPE) cells from cobalt chloride-induced acute hypoxic stress. **Experimental eye research**, v. 180, p. 92-101, 2019.

CHHETRI, J.; JACOBSON, G.; GUEVEN, N. Zebrafish—on the move towards ophthalmological research. **Eye**, v. 28, n. 4, p. 367-380, 2014.

CHRZANOWSKA, Martyna; MODRZEJEWSKA, Anna; MODRZEJEWSKA, Monika. New insight into the role of the complement in the most common types of retinopathy-current literature review. **International Journal of Ophthalmology**, v. 11, n. 11, p. 1856, 2018.

CLELLAND, Eric; PENG, Chun. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 312, n. 1-2, p. 42-52, 2009.

CORRÊA, Zélia Maria da Silva; EAGLE JR, Ralph. Aspectos patológicos da retinopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 68, p. 410-414, 2005.

COUNTRY, Michael W. Retinal metabolism: a comparative look at energetics in the retina. **Brain Research**, v. 1672, p. 50-57, 2017.

COWARD, K. et al. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 12, n. 1, p. 33-58, 2002.

DAHM, Ralf et al. Development and adult morphology of the eye lens in the zebrafish. **Experimental eye research**, v. 85, n. 1, p. 74-89, 2007.

DAMMSKI, Ana Paula; MÜLLER, Bruno Roberto; GAYA, Carolina. **Manual de Criação em Biotério**. 2011.

DANG, ZhiChao; VAN DER VEN, Leo TM; KIENHUIS, Anne S. Fish embryo toxicity test, threshold approach, and moribund as approaches to implement 3R principles to the acute fish toxicity test. *Chemosphere*, v. 186, p. 677-685, 2017.

D'COSTA, Allison; SHEPHERD, Iain T. Zebrafish development and genetics: introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. **Zebrafish**, v. 6, n. 2, p. 169-177, 2009.

EASTLAKE, K. et al. Phenotypic and functional characterization of müller glia isolated from induced pluripotent stem cell-derived retinal organoids: improvement of retinal ganglion cell function upon transplantation. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 8, n. 8, p. 775-784, 2019.

EASTLAKE, K. et al. Prospects for the application of Müller glia and their derivatives in retinal regenerative therapies. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 85, p. 100970, 2021.

EDWARD, Deepak P. et al. Amelioration of light-induced retinal degeneration by a calcium overload blocker: flunarizine. **Archives of ophthalmology**, v. 109, n. 4, p. 554-562, 1991.

EGGE, Elianne Sirnæs. **Population-level ecotoxicology: combined effects of POPs exposure and density stress on zebrafish populations**. 2008. Dissertação de Mestrado.

FEKANY-LEE, Kimberly et al. The homeobox gene *bozozok* promotes anterior neuroectoderm formation in zebrafish through negative regulation of BMP2/4 and Wnt pathways. **Development**, v. 127, n. 11, p. 2333-2345, 2000.

FITZGERALD, Jennifer A. et al. Approaches to test the neurotoxicity of environmental contaminants in the zebrafish model: From behavior to molecular mechanisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 989-1006, 2021.

FONTAINE, Romain et al. Dopamine inhibits reproduction in female zebrafish (*Danio rerio*) via three pituitary D2 receptor subtypes. **Endocrinology**, v. 154, n. 2, p. 807-818, 2013.

GAO, Hui et al. Müller glia-mediated retinal regeneration. **Molecular Neurobiology**, v. 58, n. 5, p. 2342-2361, 2021.

GAO, Yuan et al. A high-throughput zebrafish screening method for visual mutants by light-induced locomotor response. **IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics**, v. 11, n. 4, p. 693-701, 2014.

GAO, Yuan et al. Computational classification of different wild-type zebrafish strains based on their variation in light-induced locomotor response. **Computers in biology and medicine**, v. 69, p. 1-9, 2016.

GANZEN, Logan et al. Utilizing zebrafish visual behaviors in drug screening for retinal degeneration. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1185, 2017.

GLOTIN, Anne-Lise et al. Sustained versus transient ERK1/2 signaling underlies the anti- and proapoptotic effects of oxidative stress in human RPE cells. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 47, n. 10, p. 4614-4623, 2006.

GUZIEWICZ, Karina E. et al. BEST1 gene therapy corrects a diffuse retina-wide microdetachment modulated by light exposure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 12, p. E2839-E2848, 2018.

HENN, Kirsten; BRAUNBECK, Thomas. Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 91-98, 2011.

HOO, Jing Ying et al. Zebrafish: a versatile animal model for fertility research. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

HONG, Yiwen; LUO, Yan. Zebrafish Model in Ophthalmology to Study Disease Mechanism and Drug Discovery. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 8, p. 716, 2021.

HOSSEINI, Shahrbanou et al. Phenotypic plasticity induced using high ambient temperature during embryogenesis in domesticated zebrafish, *Danio rerio*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 3, p. 435-444, 2019.

HORZMANN, Katharine A.; FREEMAN, Jennifer L. Making waves: New developments in toxicology with the zebrafish. **Toxicological Sciences**, v. 163, n. 1, p. 5-12, 2018.

HSU, Chen-wei et al. Changes in the morphology and gene expression of developing zebrafish gonads. **General and comparative endocrinology**, v. 265, p. 154-159, 2018.

JAFFE, Kimberly M. et al. Imaging cilia in zebrafish. **Methods in cell biology**, v. 97, p. 415-435, 2010.

JAROSZYNSKA, Natalia; HARDING, Philippa; MOOSAJEE, Mariya. Metabolism in the zebrafish retina. **Journal of Developmental Biology**, v. 9, n. 1, p. 10, 2021.

JAYARAM, Hari et al. Transplantation of photoreceptors derived from human Müller glia restore rod function in the P23H rat. **Stem cells translational medicine**, v. 3, n. 3, p. 323-333, 2014.

JIANG, Jingbo et al. Effect of Probenecid on Endothelial Cell Growth Rate and Retinal Angiogenesis in an Oxygen-Induced Retinopathy Model. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 2021.

KÄMMER, Nadine; ERDINGER, Lothar; BRAUNBECK, Thomas. The onset of active gill respiration in post-embryonic zebrafish (*Danio rerio*) larvae triggers an increased sensitivity to neurotoxic compounds. **Aquatic Toxicology**, v. 249, p. 106240, 2022.

KAWASE, Reiko et al. EP300 protects from light-induced retinopathy in zebrafish. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 126, 2016.

KIMMEL, Charles B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

KOSSACK, Michelle E.; DRAPER, Bruce W. Genetic regulation of sex determination and maintenance in zebrafish (*Danio rerio*). **Current topics in developmental biology**, v. 134, p. 119-149, 2019.

LAALE, Hans W. The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. **Journal of Fish Biology**, v. 10, n. 2, p. 121-173, 1977.

LANGELAND, J. A.; KIMMEL, C. B. Fishes In: GILBERT, S. F.; RAUNIO, A. M.(ed.) *Embryology: construting the organism*. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. cap. 19, p. 383-407.

LAWRENCE, C. New frontiers for zebrafish management. In: **Methods in cell biology**. Academic Press, 2016. p. 483-508.

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

LEE, Yujin; YANG, Jaewook. Development of a zebrafish screening model for diabetic retinopathy induced by hyperglycemia: Reproducibility verification in animal model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 135, p. 111201, 2021.

LEITE, Gerlânia Oliveira et al. Impact of sex and environmental conditions on the responses to pain in zebrafish. **BrJP**, v. 4, p. 9-14, 2021.

LESSMAN, Charles A. The developing zebrafish (*Danio rerio*): A vertebrate model for high- throughput screening of chemical libraries. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 93, n. 3, p. 268-280, 2011.

LEVIN, Edward D.; CERUTTI, Daniel T. *Behavioral neuroscience of zebrafish*. 2011.

LI, Suk-Yee; FU, Zhong Jie; LO, Amy CY. Hypoxia-induced oxidative stress in ischemic retinopathy. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, 2012.

LIAO, Bo-Kai; CHEN, Ruo-Dong; HWANG, Pung-Pung. Expression regulation of Na⁺-K⁺-ATPase α 1-subunit subtypes in zebrafish gill ionocytes. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 6, p. R1897-R1906, 2009.

LIU, Chunsheng et al. Effects of prochloraz or propylthiouracil on the cross-talk between the HPG, HPA, and HPT axes in zebrafish. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 2, p. 769-775, 2011.

LOPES-FERREIRA, Monica et al. O modelo Zebrafish e sua contribuição ao meio ambiente.

MAACK, G.; SEGNER, H. Morphological development of the gonads in zebrafish. **Journal of fish biology**, v. 62, n. 4, p. 895-906, 2003.

MAGALHÃES, André LB et al. Peixe ilegal ainda à venda no Brasil: o exemplo do “carismático” não-nativo paulistinha transgênico (*Danio rerio*) e os riscos de sua provável introdução. **Bol Soc Bras Ictiol**, v. 132, p. 39-52, 2020.

MALESKI, Adolfo Luis Almeida et al. Recapitulation of retinal damage in zebrafish larvae infected with Zika virus. **Cells**, v. 11, n. 9, p. 1457, 2022.

MANSUR, Bruno de Matos. Elementos paramétricos da agressão em *Danio Rerio*. 2014.

MEDRANO, Matias Pedro et al. Characterization of proliferative, glial and angiogenic responses after a CoCl₂- induced injury of photoreceptor cells in the adult zebrafish retina. **European Journal of Neuroscience**, v. 48, n. 9, p. 3019-3042, 2018.

MIDDEL, Chiara Simone; HAMMES, Hans-Peter; KROLL, Jens. Advancing diabetic retinopathy research: analysis of the neurovascular unit in zebrafish. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1313, 2021.

NASCIMENTO, Valdir Leandro. **Desenvolvimento e padronização de uma ração ideal para a criação de zebrafish (*Danio rerio*) utilizado como modelo experimental na Rede PREMIUM do Centro de Bioterismo da FMUSP**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

NASIADKA, Andrzej; CLARK, Matthew D. Zebrafish breeding in the laboratory environment. **ILAR journal**, v. 53, n. 2, p. 161-168, 2012.

NAZARIO, Luiza Reali. Estudo do papel da ecto-5'-nucleotidase no contexto da inflamação avaliando parâmetros citológicos, bioquímicos, moleculares e imagens de μ PET/CT em Zebrafish. 2016.

NELSON, JS. Fishes of the world. Wiley, New York, 1994; v3, p 181.

NUSSLEIN-VOLHARD, Christiane; DAHM, Ralf (Ed.). **Zebrafish**. Oxford University Press, 2002.

OOSTERHOF, Nynke; BODDEKE, Erik; VAN HAM, Tjakko J. Immune cell dynamics in the CNS: Learning from the zebrafish. **Glia**, v. 63, n. 5, p. 719-735, 2015.

OTTESON, Deborah C.; HITCHCOCK, Peter F. Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. **Vision research**, v. 43, n. 8, p. 927-936, 2003.

ORGANISCIAK, Daniel T.; VAUGHAN, Dana K. Retinal light damage: mechanisms and protection. **Progress in retinal and eye research**, v. 29, n. 2, p. 113-134, 2010.

ORGER, Michael B.; POLAVIEJA, Gonzalo G. Zebrafish behavior: opportunities and challenges. **Annual review of neuroscience**, v. 40, p. 125-147, 2017.

PFEFFERLI, Catherine; JAZWIŃSKA, Anna. The careg element reveals a common regulation of regeneration in the zebrafish myocardium and fin. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2017.

PADILLA, S. et al. Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables. **Neurotoxicology and teratology**, v. 33, n. 6, p. 624-630, 2011.

PERILLO, VITORIA MOREIRA LOPES et al. 432-EFEITOS TÓXICOS DA FLUOXETINA NA MEIOSE DE ZEBRAFISH (Danio. 1ª. EDIÇÃO, p. 642).

PICHLER, Franz B. et al. Chemical discovery and global gene expression analysis in zebrafish. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 8, p. 879-883, 2003.

PICKART, Michael A. et al. Functional genomics tools for the analysis of zebrafish pigment. **Pigment cell research**, v. 17, n. 5, p. 461-470, 2004.

PLAFKER, Scott M.; O'MEALEY, Gary B.; SZWEDA, Luke I. Mechanisms for countering oxidative stress and damage in retinal pigment epithelium. **International review of cell and molecular biology**, v. 298, p. 135-177, 2012.

POLOSA, Anna; BESSAKLIA, Hyba; LACHAPELLE, Pierre. Strain differences in light-induced retinopathy. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0158082, 2016.

PONTES, MARCOS; COSTA, RENATA MAZARO E. **Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal** (2017).

RAJARAM, Kamyaa; SUMMERBELL, Emily R.; PATTON, James G. Technical brief: Constant intense light exposure to lesion and initiate regeneration in normally pigmented zebrafish. **Molecular Vision**, v. 20, p. 1075, 2014.

RAWLS, John F.; MELLGREN, Eve M.; JOHNSON, Stephen L. How the zebrafish gets its stripes. **Developmental biology**, v. 240, n. 2, p. 301-314, 2001.

REZENDE, Vitor Bortolo. Desenvolvimento de modelos animais alternativos para avaliação dos efeitos comportamentais e metabólicos de antipsicóticos. 2013.

RIBAS, Laia et al. Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 6, p. E941-E950, 2017.

RIBEIRO, Ondina Martins et al. O peixe-zebra (Danio rerio) como modelo emergente na ecotoxicologia. **Revista de Ciência Elementar**, v. 10, n. 2, 2022.

ROBINSON, Judith et al. Zebrafish ultraviolet visual pigment: absorption spectrum, sequence, and localization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 13, p. 6009-6012, 1993.

RODRÍGUEZ MARÍN, Cristina. **Efecto de la temperatura en la determinación sexual durante la fase de desarrollo del Zebrafish (Danio rerio)**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. Universitat Politècnica de Catalunya.

ROSA, João Gabriel Santos; LIMA, Carla; LOPES-FERREIRA, Monica. Zebrafish larvae behavior models as a tool for drug screenings and pre-clinical trials: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6647, 2022.

RUHL, Nathan; MCROBERT, Scott P.; CURRIE, Warren JS. Shoaling preferences and the effects of sex ratio on spawning and aggression in small laboratory populations of zebrafish (*Danio rerio*). **Lab animal**, v. 38, n. 8, p. 264-269, 2009.

SALMAN, Ahmed; MCCLEMENTS, Michelle E.; MACLAREN, Robert E. Insights on the regeneration potential of Müller glia in the mammalian retina. **Cells**, v. 10, n. 8, p. 1957, 2021.

SANDERS, George E. Zebrafish in Biomedical Research: Head and Body: Anatomy. In: **The Zebrafish in Biomedical Research**. Academic Press, 2020. p. 77-79.

SANTOS, Dercia; LUZIO, Ana; COIMBRA, Ana M. Zebrafish sex differentiation and gonad development: a review on the impact of environmental factors. **Aquatic Toxicology**, v. 191, p. 141-163, 2017.

SAVERINO, Cristina; GERLAI, Robert. The social zebrafish: behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish. **Behavioural brain research**, v. 191, n. 1, p. 77-87, 2008.

SCHNEIDER, Ana Cláudia Reis et al. Implementação de um novo modelo de experimentação animal: zebrafish. **Revista HCPA**. Vol. 29, n. 2 (2009), p. 100-103, 2009.

SCHOLZ, Stefan et al. A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 506-530, 2013.

SESSA, Anna K. et al. The effect of a depth gradient on the mating behavior, oviposition site preference, and embryo production in the zebrafish, *Danio rerio*. **Zebrafish**, v. 5, n. 4, p. 335-339, 2008.

SHEN, Chao; ZUO, Zhenghong. Zebrafish (*Danio rerio*) as an excellent vertebrate model for the development, reproductive, cardiovascular, and neural and ocular development toxicity study of hazardous chemicals. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 35, p. 43599-43614, 2020.

SILVA, Hugo Santiago Francisco. Avaliação da toxicidade aguda do extrato padronizado em psoraleno e bergapteno a partir de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. usando os estágios embrionários de zebrafish (*Danio rerio*). 2020.

SILVA, Ingrid Kich. Estudo da toxicidade do Cloroquinol sobre o desenvolvimento embrionário do peixe-zebra. 2019.

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

SIMÓ, Rafael et al. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier—implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

SINGH, Ajeet Pratap; NÜSSLEIN-VOLHARD, Christiane. Zebrafish stripes as a model for vertebrate colour pattern formation. **Current Biology**, v. 25, n. 2, p. R81-R92, 2015.

SINGHAL, Shweta et al. Human Müller glia with stem cell characteristics differentiate into retinal ganglion cell (RGC) precursors in vitro and partially restore RGC function in vivo following transplantation. **Stem cells translational medicine**, v. 1, n. 3, p. 188-199, 2012.

SOARES, Jéssica Cavalheiro. Efeitos neurotóxicos da exposição ao óxido de grafeno em larvas de zebrafish (*Danio rerio*). 2017.

SPENCE, R. et al. Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. **Journal of Fish Biology**, v. 71, n. 1, p. 304-309, 2007.

SPENCE, Rowena et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological reviews**, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.

STRÄHLE, Uwe et al. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 128-132, 2012.

TAVARES, Bárbara; LOPES, Susana Santos. The importance of Zebrafish in biomedical research. **Acta medica portuguesa**, v. 26, n. 5, p. 583-592, 2013.

TEAME, Tsegay et al. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 3, p. 68-77, 2019.

TELIAS, Michael et al. Retinoic acid induces hyperactivity, and blocking its receptor unmasks light responses and augments vision in retinal degeneration. **Neuron**, v. 102, n. 3, p. 574-586. e5, 2019.

THOMAS, Jennifer L. et al. Reactive gliosis in the adult zebrafish retina. **Experimental Eye Research**, v. 143, p. 98-109, 2016.

THOMPSON, Iain R.; KAISER, Ursula B. GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 385, n. 1-2, p. 28-35, 2014.

ULLOA, Pilar E. et al. Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 21, n. 4, p. 649-666, 2011.

VAN SLYKE, Ceri E. et al. Using ZFIN: data types, organization, and retrieval. In: **Eukaryotic Genomic Databases**. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 307-347.

VIGNET, Caroline et al. Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. **Zebrafish**, v. 10, n. 3, p. 365-375, 2013.

WALLACE, Robin A. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. **Oogenesis**, p. 127-177, 1985.

WAN, Jin; GOLDMAN, Daniel. Retina regeneration in zebrafish. **Current opinion in genetics & development**, v. 40, p. 41-47, 2016.

WANG, Hai et al. Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. **Gene**, v. 356, p. 91-100, 2005.

WANG, Ya-jie et al. Correlation between photoreceptor injury-regeneration and behavior in a zebrafish model. **Neural Regeneration Research**, v. 12, n. 5, p. 795-803, 2017.

WARGA, Rachel M.; NUSSLEIN-VOLHARD, C. Origin and development of the zebrafish endoderm. **Development**, v. 126, n. 4, p. 827-838, 1999.

WATTS, Stephen A.; POWELL, Mickie; D'ABRAMO, Louis R. Fundamental approaches to the study of zebrafish nutrition. **ILAR journal**, v. 53, n. 2, p. 144-160, 2012.

YAO, Yuxiao; WANG, Lei; WANG, Xu. Modeling of solid-tumor microenvironment in zebrafish (*danio rerio*) larvae. **Tumor Microenvironment**, p. 413-428, 2020.

YU, Dao-Yi; CRINGLE, Stephen J. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. **Experimental eye research**, v. 80, n. 6, p. 745-751, 2005.

ZHDANOVA, Irina V. Sleep and its regulation in zebrafish. 2011.

ZIMMERMANN, Maxime JY et al. Zebrafish differentially process color across visual space to match natural scenes. **Current Biology**, v. 28, n. 13, 2018.