

Boas práticas na criação e manutenção de zebrafish (*Danio rerio*) em laboratório no Brasil

Good practices in the rearing and maintenance of zebrafish (*Danio rerio*) in Brazilian laboratories

Mateus Tavares Kütter^{1*} , Leonardo José Gil Barcellos² , Robert Tew Boyle³ , Luis Fernando Marins³ , Tony Silveira³ 

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

³Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Autor correspondente: kutter.m.t@gmail.com

Resumo

As Boas Práticas de Laboratório (BPL) são um sistema de controle de qualidade gerencial que abrange o processo organizacional e as condições sob as quais os estudos não clínicos de saúde e meio ambiente são desenvolvidos. Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS) as BPL devem conter cinco tópicos: recursos, caracterização, regras, resultados e controle de qualidade. O objetivo deste trabalho foi apresentar uma revisão conforme o padrão da OMS para a implementação das BPL em biotério de *zebrafish*. Considerando que a promoção da saúde única (animal, humana e ambiental) associada a um plano de educação, protocolos e registros são fundamentais para garantir a segurança e a integridade dos trabalhadores/pesquisadores, animais e meio ambiente assim como confiabilidade nos resultados gerados. De certa forma o Brasil ainda necessita de melhorias relacionadas ao bem-estar de organismos aquáticos (leis nacionais, acordos internacionais, programas corporativos e outros); especialmente em relação à utilização destes na pesquisa e desenvolvimento tecnológico. Desta forma, a implementação de BPL fornece uma orientação valiosa para a melhoria do bem-estar animal, e segurança do trabalhador vindo a facilitar a padronização da pesquisa.

Palavras-chave: *Danio rerio*; padronização; bem-estar; diretrizes reguladoras; legislação.

Abstract

Good Laboratory Practice (GLP) is a management quality control system that encompasses the organizational process and conditions under which non-clinical health and environmental studies are carried out. According to the World Health Organization, GLP must contain five topics: resources, characterization, rules, results, and quality control. The aim of this work is to address a review according to WHO standard to the implementation of Good Laboratory Practices in *zebrafish* (*Danio rerio*) facility. Considering that the promotion of one health (animal, human, and environmental) associated with an education plan, protocols, and records are fundamental to guarantee the safety and integrity of employees, animals and the environment as well as reliability in the results generated. In a way, Brazil still needs improvements related to the welfare of aquatic organisms (national laws, international agreements, corporate programs, and others); especially in relation to its use in research and technological development. In this way, the implementation of GLPs provide valuable guidance for improving animal welfare and worker safety, facilitating the standardization of research.

Keywords: *Danio rerio*; standardization; welfare; regulatory guidelines; legislation.



Resumo gráfico - Boas práticas na criação e manutenção de zebrafish (*Danio rerio*) em laboratório no Brasil.

Recebido: 23 de setembro de 2022. Aceito: 8 de novembro de 2022. Publicado: 9 de janeiro de 2023.



Este é um artigo de Acesso Aberto distribuído sob os termos da Creative Commons Attribution License, que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o trabalho original seja devidamente citado.

<https://revistas.ufg.br/vet/index>

1. Introdução

A utilização de peixes como modelos de estudo biológico teve sua disseminação durante o século XIX. Uma das espécies precursoras foi o peixe-dourado, *Carassius auratus*, sobre a qual se realizaram estudos de toxicologia e fisiologia⁽¹⁻⁴⁾. Atualmente, além de *C. auratus*, outras espécies também se destacaram como modelos para estudos científicos como *Oryzias latipes*, *Rutilus rutilus*, *Gasterosteus aculeatus*, *Takifugu rubripes*, *Xiphophorus hellerii* e *Danio rerio*. Essa última a mais estudada⁽⁵⁾.

Embora o *D. rerio* (*zebrafish*) tenha sido proposto como uma espécie para uso em ciências pela primeira vez no ano de 1934⁽⁶⁾, o modelo começou a se popularizar após a publicação do trabalho da equipe de George Streisinger em 1981 onde são descritos métodos para geração de mutações por meio de gimnogênese⁽⁷⁾. No entanto, a grande consolidação de *zebrafish* como “modelo biomédico mundial” ocorreu a partir de 1996 quando foi publicado um volume no *Journal of Development* (Dezembro de 1996, Vol. 123) contendo 37 artigos sobre o *screening* genético de mais de 4.000 mutações. No Brasil, o primeiro trabalho publicado com *zebrafish* como modelo foi no ano de 1999⁽⁸⁾. Além disso, o primeiro peixe transgênico desenvolvido no Brasil foi também uma linhagem de *zebrafish*⁽⁹⁾. Atualmente no país diversas instituições de pesquisa utilizam essa espécie como biomodelo, tendo como principais áreas de estudo: (1) Neurociência e Comportamento; (2) Farmacologia e Toxicologia e (3) Meio Ambiente e Ecologia⁽¹⁰⁾.

A utilização de vertebrados em pesquisas científicas no Brasil é regida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) criado pela Lei nº 11.794/2008 e normatizado pelo decreto nº 6.899/2009⁽¹¹⁻¹²⁾. Regularmente o CONCEA edita Resoluções Normativas (RNs), que têm força de lei no Brasil, que tratam sobre orientações e procedimentos para o uso científico de animais em instituições de ensino ou pesquisa científica. A RN nº 34/2017 do CONCEA⁽¹³⁾, por exemplo, apresenta normativas diretamente relacionadas à criação e manutenção de *zebrafish* em atividades de ensino ou pesquisa científica. Diversas revisões e livros têm abordado os métodos para a criação de *zebrafish* em laboratório⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Recentemente Canedo et al.⁽¹⁷⁾ apresentaram um trabalho descrevendo o princípio dos 10 Rs e a importância da sua implementação na pesquisa com *zebrafish*. No entanto, a abordagem de saúde única (animal, humana e ambiental), junto de uma padronização de criação, manejo e procedimentos experimentais em *zebrafish* no Brasil considerando os princípios éticos e legais ainda é limitada.

As Boas Práticas de Laboratório (BPL) foram regulamentadas por diversas instituições e agências no mundo como Agência de Administração de Alimentos e

Medicamentos dos Estados Unidos (USFDA), Agência de proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) e Organização para Cooperação de Desenvolvimento Econômico (OCDE), por exemplo. Essa regulamentação promoveu um sistema de monitoramento dos estudos realizados com animais para garantir a segurança dos produtos desenvolvidos. Embora as BPL sejam amplamente empregadas em estudos envolvendo mamíferos terrestres, elas têm sido comparativamente subutilizadas na pesquisa com organismos aquáticos⁽¹⁸⁾. No Brasil, as diretrizes de Integridade e de Boas Práticas para Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica, estão descritas na RN nº 32/2016 do CONCEA⁽¹⁹⁾. No entanto, o documento apresenta apenas os valores e princípios da condução da pesquisa científica sem uma explanação mais detalhada das recomendações particulares para cada grupo de organismos utilizados.

O objetivo deste trabalho é apresentar um padrão em conformidade com a Organização Mundial da Saúde (OMS) para a implementação das Boas Práticas de Laboratório em biotérios de *zebrafish*.

2. Boas Práticas de Laboratório (BPL)

As atividades realizadas em laboratório requerem do profissional uma série de cuidados, justificada pelo risco à saúde do trabalhador, bem como ao bem-estar animal e meio ambiente. A prevenção desses riscos requer a aplicação de modernos avanços tecnológicos no desenho de biotérios e nas rotinas de trabalho. Dentre estes avanços destacamos o padrão sanitário e caracterização genética dos animais e a utilização de técnicas menos invasivas. Infelizmente poucos estabelecimentos do país apresentam recursos humanos com formação apropriada e infraestrutura básica de pesquisa que inclua os centros de criação de animais de laboratório, equivalentes àqueles existentes nos Estados Unidos e na Europa⁽²⁰⁾.

As BPL são um sistema de controle de qualidade gerencial que abrange o processo organizacional e as condições sob as quais os estudos não clínicos de saúde e meio ambiente são planejados, realizados, monitorados, registrados, relatados e retidos (ou arquivados)⁽²¹⁾. Apesar dos avanços consideráveis no controle de qualidade, os erros originados nas investigações laboratoriais continuam a ocorrer em grandes números anualmente. Desta forma, uma estratégia adotada é a busca contínua da melhoria da qualidade por meio de diretrizes regulatórias como as BPL e que podem servir como chave para a redução de erros.

As doenças tropicais são um importante problema de saúde pública nos países em desenvolvimento. Para muitas dessas doenças não existem medicamentos novos, eficazes e acessíveis,

enquanto as terapias mais antigas começam a perder terreno por conta do surgimento de resistência contra os medicamentos tradicionais. As empresas farmacêuticas multinacionais não têm tradicionalmente investido em novas formulações em seus programas de desenvolvimento, razão pela qual a OMS criou programas de pesquisa e desenvolvimento em várias áreas prioritárias, como a malária ⁽²¹⁾. Desta forma a OMS publicou documentos sobre boas práticas de fabricação (BPF) e boas práticas clínicas (BPC), no entanto esses documentos não definem qualquer padrão de qualidade que rege as fases não clínicas do desenvolvimento de medicamento.

Na experimentação animal, as BPL abrangem a adesão aos aspectos éticos de métodos usados em experimentos com animais de laboratório, incluindo o desenho experimental, aderência às diretrizes emitidas pelos órgãos de ética animal, dosagem, número de animais utilizados em cada grupo de estudo, análise estatística significativa dos dados obtidos, medição de dados e garantia de qualidade. Para fins didáticos, as BPL foram divididas em cinco grandes tópicos conforme recomendação da OMS ⁽²²⁾ descritos a seguir.

3. Recursos

3.1. Gestão de Pessoal

De forma geral, todas as normativas referentes à gestão de pessoal descrevem a equipe e os requisitos integrantes de todos os estudos de BPL, incluindo o fornecimento para gerenciamento de instalações de teste, um diretor de estudo, uma unidade de garantia de qualidade e acesso à assistência profissional ^(21,22). Neste contexto, as exigências para o desenvolvimento de estudos com *zebrafish* são as mesmas empregadas para experimentos com mamíferos, por exemplo, roedores. Ou seja, devem seguir a prerrogativa de que todo o pessoal envolvido no cuidado e uso de animais deve possuir qualificação e treinamento baseados nos princípios do cuidado de animais de laboratório de forma a subsidiar o bem-estar animal e, conseqüentemente, a qualidade da pesquisa ⁽¹⁷⁻²³⁾.

Além disso, a necessidade de cuidados veterinários é parte essencial do uso de animais para experimentação. O foco principal do médico veterinário é supervisionar o bem-estar e os cuidados clínicos de animais usados em pesquisa, testes, ensino e produção. Essa responsabilidade se estende ao monitoramento e promoção do bem-estar animal em todos os momentos durante o uso do animal e durante todas as fases da vida do animal ⁽²⁴⁾. De acordo com Kuzel et al. ⁽²⁵⁾ a orientação do médico veterinário aos técnicos e usuários reduz os riscos a que são expostos os animais e profissionais durante a experimentação.

3.2. Instalações e equipamentos

As instalações de um biotério de peixes devem apresentar um cuidado crítico com o *layout* a fim de maximizar a utilização do espaço disponível, facilitar o acesso e tráfego, garantir a segurança dos trabalhadores, manter as condições ambientais e estar adequada para futuras ampliações. Estes princípios gerais independem do tamanho da instalação e devem estar de acordo com o objetivo da pesquisa e o espaço disponível. Neste sentido, a instalação para manutenção de *zebrafish* pode variar de uma sala com alguns aquários até um centro composto por diversas salas contendo sistemas de *racks* com dezenas de tanques.

A criação e manutenção de *zebrafish* é mais exigente do que manter invertebrados, mas menos do que manter estoques de mamíferos ⁽¹⁴⁾. Para um funcionamento eficiente, a prevenção de falhas é uma das preocupações primárias. Quanto maior o controle sobre influências externas como suprimento de água, suprimento de ar, comida e novos peixes, melhor a estabilidade e segurança. Isso deve ser equilibrado com considerações de espaço, custo de equipamento, mão de obra, custo de manutenção, habilidades técnicas da equipe, utilidade de pesquisa, bem como esforços investidos em uma linhagem específica de peixe ⁽²⁶⁾. Neste contexto, a maior demanda ocorre para manter a água em boas condições. Dessa forma, podemos ter dois tipos de sistemas: (1) sem filtragem e (2) com filtragem de água ⁽¹⁴⁾. No primeiro não há custos de instalação e manutenção de filtros tornando-os relativamente baratos de configurar. Por outro lado, são muito exigentes em termos de espaço, porque os peixes têm de ser mantidos em baixas densidades. Além disso, exigem alta manutenção e, na prática, funcionam apenas em áreas onde a água limpa pode ser produzida ou captada com baixo custo. Já o sistema com filtros possui elementos filtrantes e meios para a agregação de bactérias que degradam compostos tóxicos na água, permitindo a reutilização do meio de criação através da recirculação da água, da passagem contínua da água pelos diversos filtros e da constante disponibilização da água tratada para os animais.

Uma das principais vantagens dos sistemas de recirculação é que eles fornecem água de alta qualidade sem a necessidade de troca de água. Além disso, este sistema permite a criação e manutenção de um número maior de peixes em um espaço comparativamente menor. Independentemente do tipo de sistema adotado, o tipo de tanque deve permitir as necessidades fisiológicas e comportamentais normais dos animais, incluindo função excretora, controle e manutenção da temperatura corporal, movimentos típicos e ajustes posturais e, quando indicado, reprodução ⁽²⁴⁾. Os sistemas de criação de *zebrafish* evoluíram consideravelmente nas últimas décadas devido à popularização e diversificação das

pesquisas utilizando-o como modelo. Dados esses níveis crescentes de complexidade, tanto em sistemas de habitação e os usos experimentais do *zebrafish*, a tarefa de escolher, projetar e planejar um novo sistema ou atualizar um existente é extremamente importante para o sucesso da pesquisa. De acordo com Lawrence e Mason⁽²⁷⁾ acima de tudo, os sistemas de habitação dos peixes selecionados devem funcionar para (1) proporcionar um ambiente estável e favorável que produz e mantém peixes saudáveis e produtivos e (2) apoiar os objetivos de pesquisa específicos da equipe de investigação.

4. Caracterização

Considerando que a água é o “ambiente” em que o peixe está e que é o meio de suporte à sua vida, a manutenção das condições adequadas é fundamental para qualidade da pesquisa e bem-estar dos peixes⁽²⁸⁾. Por isso, serão apresentados a seguir os principais parâmetros a serem avaliados e monitorados regularmente em um biotério que se propõe a abrigar *zebrafish*.

4.1. Parâmetros Abióticos

4.1.1. Temperatura

Nos peixes a temperatura afeta praticamente todos os aspectos do comportamento e da fisiologia⁽²⁹⁾. O *zebrafish* está classificado como um peixe euritérmico que suporta um amplo gradiente de temperaturas. No ambiente natural ele habita locais com temperatura de ~6 °C no inverno até ~38 °C no verão⁽³⁰⁾. Em laboratório a temperatura da sala ou água é normalmente mantida entre 26-28,5 °C⁽⁴¹⁾. No entanto, a temperatura ótima recomendada tanto para reprodução como para o desenvolvimento embrionário no laboratório é de 28,5 °C^(15, 31). Estudos com embriões de *zebrafish* demonstraram que o consumo de oxigênio, taxa de batimento cardíaco e toxicidade de compostos são modificados pela temperatura^(32,33). Além disso, a temperatura apresenta uma forte influência sobre a diferenciação sexual durante o desenvolvimento embrionário⁽²⁹⁾. Scott e Jhonston⁽³⁴⁾ demonstraram que a temperatura de incubação do embrião pode ter efeitos dramáticos e persistentes na capacidade de aclimação térmica em vários níveis de organização biológica, desde o nível molecular até o morfológico. De acordo com Zhang et al.⁽³⁵⁾, larvas incubadas a temperaturas mais baixas (24 °C) durante o desenvolvimento inicial têm uma piora na taxa de sobrevivência e em processos da imunidade inata.

4.1.2. Fotoperíodo

Embora *zebrafish* tenha sido descrito como uma espécie diurna⁽³⁶⁾, estudos posteriores revelaram que a espécie é capaz de exibir ritmos comportamentais diurnos ou noturnos dependendo das condições de criação (como

alimentação e ciclos de temperatura)^(37,38). No entanto, o fotoperíodo apresenta uma forte influência sobre o comportamento reprodutivo de *zebrafish*⁽⁴⁰⁾. Em laboratório, o *zebrafish* geralmente desova nas primeiras horas de luz do dia. De acordo com Francis⁽³⁹⁾, uma das maneiras mais rápidas de garantir que os peixes não realizem oviposição é manter as luzes acesas por tempo integral. Assim, o ciclo circadiano ideal de luz no laboratório para o *zebrafish* é geralmente definido em 14 horas de luz e 10 horas de escuridão completa⁽¹⁵⁾. Este ciclo de claro-escuro imita o ambiente natural sendo o ideal para manutenção do relógio circadiano do *zebrafish*.

4.1.3. Qualidade da água

Os parâmetros de qualidade da água afetam diretamente os organismos sendo necessário mantê-los dentro dos níveis adequados para a espécie de cultivo. A manutenção dos animais em condições de água inadequada faz com que os organismos alterem sua condição fisiológica podendo levar ao surgimento de doenças, surtos epizooticos, baixo crescimento, falhas reprodutivas e mortalidade⁽²⁸⁾.

Independentemente do tipo de sistema de criação adotado, os parâmetros de qualidade da água devem seguir um controle rígido conforme descritos a seguir.

4.1.4. pH

O pH da água nos sistemas aquáticos exerce um profundo efeito nos processos fisiológicos dos peixes assim como no funcionamento da comunidade microbiana que os suporta. Além disso, a toxicidade de alguns compostos como amônia, nitrito, metais e medicamentos são fortemente influenciados pelo pH da água⁽⁴²⁻⁴⁴⁾. Na maioria dos laboratórios o nível do pH é mantido entre 7.0 e 8.0⁽⁴⁰⁾. Brand et al.⁽¹⁸⁾ sugerem um nível mais restrito entre 6.8 e 7.5 (nunca abaixo de 6.0 ou maior que 8.0).

4.1.5. Alcalinidade

A alcalinidade representa a medida de todas as bases tituláveis presentes na água. Ela descreve a capacidade da água de neutralizar ácidos fortes, o que ajuda a manter a estabilidade do pH. Em geral, é recomendável manter os valores de alcalinidade dentro de uma faixa de 50-150 mg de CaCO₃/L⁽⁴¹⁾.

4.1.6 Dureza

A dureza da água é uma medida da quantidade de íons divalentes principalmente cálcio e magnésio, e em menor grau, ferro e selênio⁽⁴⁵⁾. Os peixes requerem esses íons para as funções fisiológicas, e eles devem ser fornecidos na água e/ou na dieta aos peixes em cativeiro. O *zebrafish* é considerado um peixe de “água dura” preferindo água com concentrações acima de 100 mg de CaCO₃/L. De acordo com Lawrence⁽⁴⁰⁾ é recomendável manter os valores de dureza dentro de uma faixa de 75-

200 mg de CaCO_3/L sendo a mesma faixa geralmente recomenda para uma gama de peixes de água doce.

4.1.7. Compostos nitrogenados

O nitrogênio amoniacal total consiste em dois compostos, a amônia ionizada (NH_4^+), denominada íon amônio, e a não ionizada (NH_3), amplamente conhecida como amônia. A razão relativa à proporção de cada uma das formas de amônia depende do pH, temperatura e salinidade⁽⁴⁶⁾. O principal produto metabólico excretado pelos peixes é a amônia que é eliminada através do epitélio branquial por difusão e em menor quantidade pelas fezes. A produção de amônia também ocorre durante a decomposição da matéria orgânica (principalmente fezes, alimentos não consumidos e peixes mortos) por bactérias⁽²⁷⁾. A amônia não ionizada é altamente tóxica para os peixes devendo ser retirada do sistema. Níveis de amônia acima de 0,02 ppm devem ser evitados⁽⁴¹⁾. Em sistemas de recirculação, esses níveis são atingidos através da oxidação da amônia a nitrito e em seguida a nitrato por devido a ação de bactérias nitrificantes em um processo conhecido por nitrificação. O produto intermediário desta conversão, o nitrito também é tóxico para os peixes e pode ser problemático em concentrações superiores a 0,1 ppm⁽⁴¹⁾. A toxicidade pelo nitrato ocorre apenas em concentrações muito altas. Dessa forma, recomendam-se trocas parciais de água como rotina de manutenção a fim de manter o nível de nitrato menor que 50 mg/L⁽⁴¹⁾.

4.1.8. Oxigênio

Baixos níveis de oxigênio dissolvido são os maiores responsáveis por mortalidade de peixes em cultivo do que qualquer outro parâmetro⁽⁴⁶⁾. A solubilidade do oxigênio varia de acordo com a pressão atmosférica, sais e temperatura. Temperaturas elevadas reduzem a solubilidade de oxigênio na água. Em cultivo de *zebrafish*, a temperatura relativamente alta de manutenção, a densidade de animais nos aquários e a alta frequência de alimentação típica de instalações de alta atividade criam a necessidade de níveis de oxigênio dissolvido próximos da saturação (~7,8 mg/L em 28 °C)⁽⁴⁰⁾.

4.1.9. Salinidade e condutividade

A salinidade é medida em partes por mil ou da capacidade da água em conduzir eletricidade (condutividade) expressa em microSiemens por centímetro ($\mu\text{S}/\text{cm}$). Os níveis de salinidade devem ser estáveis e mantidos < 5 g/L⁽²⁷⁾. A maioria dos sistemas de *zebrafish* usa água do sistema de abastecimento urbano sem cloro; no entanto, alguns sistemas utilizam água deionizada. A condutividade deve ser de 150-1700 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ⁽⁴⁷⁾, embora seja recomendado um intervalo mais estreito de 300-1.500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, de acordo com o recomendado por Avdesh et al.⁽⁴¹⁾.

4.1.10. Fonte da água

Especial cuidado deve ser tomado com as fontes da água de abastecimento dos biotérios de criação e manutenção do *zebrafish*. Apesar dos sistemas de filtração serem uma opção para o tratamento da água captada, muitos contaminantes não são removidos por esses sistemas. Existem muitos relatos dos impactos sobre o comportamento, a fisiologia, a reprodução e o desenvolvimento do *zebrafish* tanto para resíduos de medicamentos^(48,49), quanto para agroquímicos⁽⁵⁰⁾.

4.2. Manuseio e contenção

Quase todos os peixes mantidos em laboratório precisam ser manuseados fisicamente em algum momento devendo-se considerar que esse é um evento estressante para os peixes. Atividades como exposição ao ar, transferência de tanques, isolamento social, manejo reprodutivo, anestesia, coleta de sangue e sêmen entre outras são episódios causadores de estresse. Cada atividade de manuseio se caracteriza por uma intensidade e frequência, desta forma a sua influência nos resultados experimentais deve ser considerada ao se planejar um experimento. Mesmo em episódios de estresse agudo os peixes podem demorar algumas horas até retomarem o seu estado inicial. De fato, muitas das atividades rotineiras de um biotério de manutenção de peixes, como a perseguição e captura com rede, a transferência de aquários e a exposição ao ar são estressantes para o *zebrafish*, sendo, inclusive, usadas em protocolos de estresse padrão⁽⁵¹⁻⁵⁵⁾.

Zebrafish submetidos a diferentes tipos de estressores crônicos apresentam mudanças fisiológicas e de comportamento⁽⁵⁴⁾. Além disso, Kirsten et al.⁽⁵⁵⁾ demonstraram que o estresse crônico ativa alguns genes relacionados a resposta pró-inflamatória em *zebrafish*. Desta forma, a exposição ao estresse crônico pode ser minimizada por meio de treinamento de pessoal, padronização na rotina de manejo e aclimação. De acordo com a recomendação da *Canadian Council on Animal Care (CCAC)*⁽²⁸⁾ “os peixes devem ser manuseados somente quando necessário e o número de episódios envolvendo o manuseio deve ser minimizado.”

4.3. Densidade populacional

A densidade de estocagem dos peixes é influenciada por fatores como qualidade da água, alimento, taxa de alimentação, tamanho e idade dos peixes. A otimização destes fatores varia de um biotério para outro. Os adultos podem ser mantidos a uma densidade de 5-8 peixes/L. Os juvenis (< 45 dias) podem ser alojados em uma densidade mais alta. A Tabela 1 apresenta as recomendações de densidade de acordo com alguns estudos. Contudo, no momento, não há informações suficientes sobre a densidade adequada para peixes jovens em desenvolvimento. Se o crescimento ou a saúde dos peixes não são os esperados, a densidade deve ser modificada.

Tabela 1. Principais recomendações sobre densidade de manutenção de *zebrafish* (*Danio rerio*). Adaptado do Conselho Canadense para Proteção Animal ⁽²⁸⁾

| Densidade populacional | Referência |
|--|------------|
| Adultos | |
| Em sistemas de recirculação de larga escala as famílias de irmãos adultos podem ser mantidas na densidade de até 5 peixes/L | 14 |
| Manutenção de adultos: 5 peixes/L | 15 |
| Para reprodução, um casal pode ser mantido durante a noite em 1,5 L, ou 6 peixes em 2,3 L de água | 15 |
| Em sistemas com filtros e biofiltro, desde que haja troca regular de água, um bom regime alimentar e boa qualidade da água: 5 peixes/L | 56 |
| Para fins de reprodução, é melhor ter menos peixes por tanque: 2-3 peixes/L | 56 |
| Em um tanque que não possui filtros ou biofiltro: 1 ou 2 peixes/L | 56 |
| 25 peixes em tanques de 45 L | 57 |
| Sistema estático para a reprodução: 2-8 peixes em tanque de 2 L | 58 |
| 6-7 peixes adultos/L | 41 |
| 5 peixes por litro em tanques de 10 L | 59 |
| 4-10 adultos/L | 47 |
| Juvenis | |
| Crescimento de peixes juvenis: 5 peixes/L | 15 |
| Larvas | |
| 250 larvas de 5-10 dpf/L | 47 |
| 20 larvas jovens por 400 ml até a fase juvenil | 15 |
| Ovos e embriões | |
| 20 ovos/embriões por 100 ml de água | 15 |
| 100 embriões em 35 mL em placa de Petri de 9 cm de diâmetro | 47 |

4.4. Alimentação

De todos os aspectos da criação e manejo de *zebrafish*, a nutrição foi a que apresentou menor desenvolvimento apesar da grande popularização de *zebrafish* como modelo biomédico. Os protocolos “padrão” de nutrição para o *zebrafish*, citados em várias publicações, geralmente descrevem a administração de uma dieta composta por náuplios de *Artemia* spp. e ração processada, geralmente floculada desenvolvida para peixes tropicais ^(27,57). Devido à escassez de informações específicas sobre os requisitos nutricionais de *zebrafish* pode ser imprudente alimentar exclusivamente com dieta artificial. Na natureza, os *zebrafish* alimentam-se de pequenos crustáceos e larvas de insetos. Dessa forma, a oferta de alimento vivo permite que os peixes expressem o comportamento natural da espécie e supre a necessidade de busca ativa e captura do alimento, enquadrando-se como uma medida de incremento ao enriquecimento ambiental. Em laboratório, os alimentos vivos mais comumente utilizados são paramécio, rotíferos e náuplios de *Artemia* spp.

A quantidade de ração oferecida em cada alimentação e a frequência são importantes componentes dos protocolos de alimentação, e muitas vezes são específicas de acordo com o objetivo a ser atingido, como, por exemplo, crescimento, reprodução ou manutenção. Em termos de taxa de alimentação, existem

duas abordagens gerais utilizadas nos cuidados de *zebrafish*: (1) alimentação até a saciedade (*ad libitum*) e (2) alimentação proporcional ao peso corporal. Nos guias de cuidado com *zebrafish*, a taxa de alimentação que é recomendada varia de 3-8% do peso corporal/ de ração/dia ⁽⁵⁹⁾. De acordo com Lawrence ⁽²⁶⁾, a frequência de alimentação deve ser contínua desde de 5 a 14 dpf (dias pós-fertilização) passando para 3-5 vezes ao dia de 15 até 60 dpf e, finalmente, 1-3 vezes ao dia após 60 dpf. Outro fator importante na criação de *zebrafish* é o tamanho do alimento. A alimentação das larvas deve começar a partir de 5 dpf, pois nesse período do desenvolvimento o sistema digestório já está aberto nas duas extremidades e o vitelo está quase ou totalmente consumido ⁽¹⁶⁾. A transição de alimentação endógena para exógena e de alimento vivo para ração são períodos críticos para a larvicultura. Durante esse período é importante o oferecimento de invertebrados como *Paramecium* spp., *Brachionus plicatilis* e náuplios de *Artemia* spp. Já as larvas jovens podem ser alimentadas com alimentos secos de ~100 µm de tamanho (por exemplo, ZM-100, ZM systems, Reino Unido) e alimentos vivos como paramécios e rotíferos (que estimulam o crescimento). O tamanho do alimento pode ser aumentado lentamente para 200 µm (por exemplo, ZM-200, ZM systems, Reino Unido) ou 300/400 µm (por exemplo, ZM-300, ZM systems, Reino Unido) ⁽⁴⁰⁾.

Além dos aspectos nutricionais relativos à

composição das dietas utilizadas para o *zebrafish*, tão ou mais relevante é o manejo alimentar dos estoques de peixes, pois sabe-se que tanto a frequência alimentar utilizada quanto o intervalo de tempo entre os testes comportamentais e a última alimentação, podem interferir fortemente no comportamento do *zebrafish* ⁽⁶⁰⁾. Assim, é muito importante padronizar e relatar fielmente o protocolo utilizado para evitar vieses, especialmente nos experimentos que avaliam as respostas comportamentais dos peixes a estímulos de diferentes naturezas.

4.5. Reprodução

A reprodução é um processo complexo influenciado por vários fatores, comportamentais e abióticos. Os fatores comportamentais, como a escolha do companheiro, são determinados pelo comportamento de coorte e estão relacionados à interação e percepção de uma variedade de elementos, incluindo percepção visual, tátil/auditiva (pela linha lateral) e olfativa. Os fatores abióticos do meio ambiente, incluem a qualidade da água, temperatura, fotoperíodo, alimentação, enriquecimento ambiental e tamanho do tanque ⁽⁶¹⁾. O primeiro passo para a reprodução é a sexagem dos indivíduos. Em condições ideais *zebrafish* atinge a maturidade sexual por volta de 3 a 4 meses ⁽⁶²⁾. *Zebrafish* adultos não possuem um dimorfismo sexual bem visível. Em geral, o dimorfismo só pode ser observado em indivíduos no estágio adulto já bem desenvolvido. Nesse estágio pode-se distinguir as seguintes características: machos possuem o corpo mais delgado e curto; nadadeira anal com coloração mais vibrante (amarelo alaranjada); raios da nadadeira peitoral com a coloração amarelada. Já as fêmeas têm o corpo

mais roliço e comprido com ventre mais claro e distendido; presença de uma pequena papila genital e nadadeiras peitorais com raios mais tênues; ausência de coloração vibrante na nadadeira anal; raios da nadadeira peitoral de cor pálida ⁽⁶³⁾. De acordo com McMillan et al. ⁽⁶⁴⁾ um método prático de diferenciação sexual é a presença de tubérculos nos raios da nadadeira peitoral dos machos. De acordo com estes autores estes tubérculos se desenvolvem após a maturação sexual.

De acordo com Hutter et al. ⁽⁶⁵⁾ em tanques grandes os peixes geralmente formam pares em vez de grupos, demonstrando uma seleção sexual enquanto em aquários convencionais com altas densidades, a desova em grupo é mais comum. Um fator importante a ser considerado no manejo reprodutivo de colônias de *zebrafish* é a consanguinidade e deriva genética devendo-se sempre primar pelo aumento da diversidade genética.

Para o acasalamento, geralmente os peixes são alojados à tarde ou no começo da noite no tanque de desova e mantidos até a manhã seguinte. Se os embriões coletados precisam ser sincronizados com precisão no mesmo estágio de desenvolvimento, um casal pode ser separado por um divisor plástico no tanque. Este divisor é removido na primeira hora de luz para que ocorra a desova e fertilização dos ovos. A utilização de grupo ou par para o acasalamento deve considerar o *design* do tanque como tamanho e forma. Outra consideração importante é a densidade de peixes utilizada pois influencia a qualidade da água. As recomendações de manutenção e reprodução de *zebrafish* estão sumarizadas a seguir (Quadro 1).

Quadro 1. Principais recomendações sobre a reprodução de *zebrafish* (*Danio rerio*)

| |
|--|
| <p>Sobre o ambiente Parâmetros de qualidade da água devem estar em conformidade com as exigências da espécie Luminosidade deve estar ajustada pois os peixes costumam desovar na primeira hora de luz Distúrbios ambientais como trânsito de pessoas e ruídos devem ser minimizados na sala em que os animais estão durante o período de reprodução Reprodutores devem receber uma dieta balanceada Durante o período em que os peixes estiverem no tanque de reprodução não devem ser alimentados</p> |
| <p>Sobre biologia/comportamento Peixes são separados por sexo no dia anterior Deve-se escolher animais sadios que preferencialmente apresentem características sexuais secundárias: ex. machos com coloração viva, fêmeas com abdômen distendido Maturidade sexual ocorre a partir dos 3 meses Pico reprodutivo dos machos ocorre aos 10 meses Frequência ideal de desova é de uma vez na semana Intervalo de desova para fêmea deve ser de no mínimo uma semana Desova em grupo (> 1 casal) apresenta maior produção de ovos fertilizados e maior variabilidade genética Tanques > 10 L: densidade de 2-3 peixes/L Pequeno grupo: 2-8 peixes em 2 L Casal em 1 L</p> |

4.6. Higiene e profilaxia

Um ambiente limpo é essencial para manter um elevado padrão de saúde e bem-estar animal. Para alcançar esse objetivo, cuidados especiais devem ser tomados para evitar infecções cruzadas durante os procedimentos de criação e rotina, uma vez que muitas doenças podem ser transmitidas através do contato físico entre peixes individuais, tanques e sistemas de água.

Qualquer fômite ou equipamento em contato físico com os peixes (como redes, caixas de acasalamento, aquecedores etc.) deve ser utilizado em apenas um sistema e higienizados/desinfetados periodicamente ⁽⁴⁶⁾.

O acúmulo de resíduos pode estimular o crescimento de algas e cianobactérias, bem como de outros organismos que podem ser patogênicos para os peixes. Alguns projetos são mais eficientes que outros na remoção de resíduos, em qualquer caso, alguns resíduos

sólidos serão acumulados e exigindo a limpeza ou substituição do tanque ⁽²⁶⁾. A limpeza dos aquários e dos filtros é uma das características mais importantes para manter os peixes saudáveis e em condições de reprodução. Para evitar a propagação de doenças, todos os recipientes e ferramentas com que o peixe possa entrar em contato devem ser mantidos limpos ⁽¹⁴⁾. Todas as recomendações para práticas de limpeza serão influenciadas não apenas pelo tipo de tanque ou sistema, mas também pelo regime de alimentação e qualidade da água que entra no sistema.

Especificamente sobre a higienização dos utensílios, é imperativo que todos os fômites usados na criação de *zebrafish* se mantenham livres de detergentes, visto que esses produtos são complexos, contendo muitos compostos distintos e apresentam toxicidade elevada para *zebrafish* ^(66,67). Ao invés de detergentes, soluções de cloro podem ser utilizadas para a lavagem de artigos feitos de plástico e de vidro, por exemplo ⁽⁶⁶⁾. É importante salientar que o hipoclorito de sódio é o composto a base de cloro mais utilizado para desinfecção ao redor do mundo, porém esse composto pode liberar gás cloro como resultado da exposição em algum grau à matéria orgânica, à luz ultravioleta (UV) ou do contato com algumas superfícies metálicas. O gás cloro é extremamente irritante para os olhos e para o trato respiratório, se tornando um risco para quem frequenta o biotério ⁽⁶⁸⁾. Além disso, é sabido que o hipoclorito de sódio é corrosivo para metais ⁽⁶⁹⁾, o que pode ser danoso para certos utensílios e equipamentos sanitizados através do uso prolongado desse composto. Recentemente o ácido peracético vem sendo cogitado como um substituto eficiente e mais seguro ao hipoclorito de sódio, inclusive aplicado à aquicultura, sendo a dose dependente da alcalinidade e dureza da água utilizada ⁽⁷⁰⁾. Ainda, a desinfecção com etanol 70%, a autoclavagem e a irradiação por luz UV continuam sendo boas opções para o uso em materiais que suportam esses processos.

Vários métodos de limpeza e desinfecção de fômites já foram propostos especificamente para instalações que mantêm *zebrafish*. Garcia e Sanders ⁽⁷¹⁾ propõem dois protocolos para limpeza e desinfecção de fômites usados na criação de *zebrafish*. O primeiro deles é direcionado para materiais que não absorvem e não se deterioram com o cloro e são fáceis de secar, como tanques e suas tampas, aparatos usados para alimentação dos animais e outros materiais diversos. Esse protocolo estabelece uma lavagem inicial com água deionizada por osmose reversa sob pressão, imersão por 30 minutos em solução desinfetante de cloro a 1,98% (Clorox® 5,25% diluído em água deionizada), novo enxague com água deionizada e secagem natural. O Outro protocolo é direcionado para redes e puçás usados rotineiramente para a manipulação dos peixes, as quais são difíceis de secar (devido à alta demanda e rotatividade) e absorvem o

cloro, que é tóxico mesmo em baixas quantidades para os peixes. Além disso, esses utensílios são feitos de finos filamentos de *nylon*, que se deteriora ao entrar em contato com o cloro. Esse protocolo estabelece uma lavagem inicial com água deionizada sob pressão, imersão por 1 hora em solução desinfetante comercial para aquarismo (Net Soak, Jungle Labs, USA, 4,93 mL/3,8 L de água deionizada, ingredientes ativos: cloreto de benzalcônio e azul de metileno) e novo enxague com água deionizada. O banho de solução desinfetante para puçás é mantido em baldes opacos e tampados quando não estão em uso para evitar a incidência de luz e evaporação. O banho desinfetante é substituído uma vez por semana.

Chang et al. ⁽⁷²⁾ testaram a efetividade de soluções de cloro (Clorox®); peróxido de hidrogênio e iodo povidona (PVPI) contra *Mycobacterium* spp., um grupo de bactérias muito prevalente em colônias de *zebrafish* (ver adiante). Dos tratamentos testados, a desinfecção com 25 ppm de PVPI por 5 minutos foi a mais efetiva (< 1% de sobrevivência) contra *M. abscessus*. Já a desinfecção com solução de cloro a 100 ppm por 10 minutos foi a menos efetiva. Contra *M. chelonae*, a desinfecção mais efetiva (< 1% de sobrevivência) usou solução de cloro a 150 ppm e PVPI a 100 ppm, ambas por 5 minutos. Ainda para *M. chelonae* o protocolo menos efetivo usou PVPI a 12,5 ppm por 5 minutos. Por fim, os autores avaliaram a efetividade desses 3 agentes desinfetantes para *M. gordonae*, sendo o desinfetante mais efetivo o cloro a 150 ppm por 10 minutos e o PVPI a 25 ppm por 5 minutos. Já o protocolo menos efetivo usou peróxido de hidrogênio a 1,5% por 5 minutos.

Outro agente infeccioso muito prevalente, o microsporídio *Pseudoloma neurophilia*, tem > 95% dos seus esporos inativados após o tratamento com cloro a 100 ppm por 10 minutos. Quando o pH da solução é ajustado para 7 com ácido acético glacial a efetividade da desinfecção aumenta e > 99% dos esporos são inativados ⁽⁷³⁾.

Com base no exposto se pode perceber que vários princípios ativos podem ser usados para impedir a proliferação de microrganismos indesejáveis em um biotério de *zebrafish*. Contudo, a efetividade do método utilizado dependerá de fatores como os parâmetros da solução, como a concentração utilizada e o pH, microrganismo a que se destina o tratamento, tempo de exposição dos fômites ao agente desinfetante, composição material do fômite e armazenamento e substituição adequados da solução desinfetante. Além disso, quando mais de um microrganismo for alvo específico do tratamento, uma associação de protocolos pode ser adotada. Por exemplo, como já demonstrado, a desinfecção de utensílios com 100 ppm de cloro por 10 minutos é extremamente efetiva contra *P. neurophilia*, mas deixa bastante a desejar em se tratando de *M.*

abscessus. Neste sentido, cada laboratório deve desenvolver seu protocolo de limpeza e manutenção contendo os procedimentos de operação padrão para essas rotinas.

4.7. Origem dos animais

Todo e qualquer fornecedor de *zebrafish* no território brasileiro, seja para fins científicos ou apenas para aquarofilia doméstica, deve contar com médico veterinário como responsável técnico pelos animais ⁽⁶⁶⁾. Ainda, é importante que o fornecedor seja consultado sobre a prática de *bleaching* antes do envio de ovos de determinada linhagem ⁽⁷⁶⁾. Originalmente o *bleaching* foi proposto como um método de desinfecção de ovos usando cloro como princípio ativo. Westerfield et al. ⁽⁵⁷⁾ recomendam uma solução de *bleaching* contendo cerca de 0,003% de cloro. No protocolo desses autores 4 recipientes são preparados, 2 com a solução de *bleaching* e 2 com água do sistema de criação do biotério. Os embriões são coletados e dispostos em uma peneira, que passará pela sequência de banhos de forma a submergir e emergir todos os embriões com celeridade e ao mesmo tempo. Os embriões são submersos no primeiro banho, que contém a solução de *bleaching*, por 5 minutos. Logo em seguida os embriões são postos em um banho com água do sistema. O processo é repetido uma vez mais, de forma a utilizar todos os 4 recipientes preparados. O protocolo proposto por Brand et al. ⁽¹⁸⁾ apresenta pequenas variações no procedimento descrito. Esse protocolo usa solução de *bleaching* contendo entre 0,0038 e 0,0049% de hipoclorito de sódio. Ao invés de 4 banhos, esse protocolo utiliza 5 banhos na seguinte sequência: banho de *bleaching*; banho de água da torneira; novo banho de *bleaching*; novo banho de água da torneira e, por fim, mais um banho de água da torneira. Cada banho é aplicado por 5 minutos. Após os banhos, os embriões devem ser lavados com meio E3 (que será utilizado como meio de incubação dos embriões). Os embriões devem passar pelo procedimento de *bleaching* com idade entre 10 e 28 hpf. Após 28 hpf o cório começa a ser degradado por enzimas que preparam o embrião para a eclosão, por isso, essa membrana protetora já está permeável ao cloro. A penetração de cloro pelo cório mata o embrião. É importante salientar que o processo de *bleaching*, quando realizado entre 10 e 28 hpf, atrapalha a eclosão, tornando o cório mais rígido. Por isso, 30 mg/ml de pronase deve ser utilizada para facilitar a eclosão. Após o processo de *bleaching* os embriões já podem ser encubados à temperatura de 28,5 °C. Se no outro dia após a realização do processo de *bleaching* os embriões não tiverem eclodido, a eclosão deve ser realizada manualmente através da retirada do cório com ajuda de uma pinça.

Uma alternativa ao uso de soluções contendo cloro é o *bleaching* com PVPI como princípio ativo ⁽⁷⁴⁾. Nesse protocolo, 4 banhos são preparados na seguinte sequência: banho de PVPI tamponado na concentração de

12,5 ou 25 ppm e 3 banhos de água Milli-Q estéril. Os embriões são transferidos através dos banhos em peneira, conforme já exposto anteriormente e permanecem no banho de PVPI por 2 minutos, as passagens em água, por sua vez, são banhos rápidos de cerca de 5 segundos. Antes e depois dos banhos descritos, os embriões são mantidos em meio de cultivo de embriões e esse protocolo não requer o uso da pronase. O *bleaching* é uma importante barreira sanitária na criação de *zebrafish*, podendo ser usada não só como requisito para o envio de ovos de fornecedores externos, mas também para realizar a desinfecção externa de qualquer desova obtida em um biotério aquático. Além da responsabilidade técnica e da prática de *bleaching*, animais adquiridos de fornecedores externos devem possuir atestado sanitário sobre o seu estado ou condições de saúde ⁽²²⁾. No Brasil, a emissão desse tipo de atestado é atividade privativa do profissional médico veterinário ⁽⁷⁷⁾.

Em vista disso, uma criação saudável depende também de fornecedores idôneos e comprometidos com a saúde e bem-estar de seus animais. O conhecimento tanto sobre a origem dos peixes quanto sobre sua vida até o momento da chegada ao laboratório é extremamente relevante. Alguns fatores durante a criação, podem influenciar os peixes para toda a vida e justificam a busca de fornecedores idôneos e com a história prévia dos peixes bem controlada. A manutenção do *zebrafish* em instalações onde os peixes possam visualizar possíveis predadores, tem forte impacto em seu comportamento e sua reatividade para toda a vida ^(78,79). Da mesma forma, o tipo de instalações, a forma de manutenção dos peixes (sexos misturados ou separados) e de eventuais enriquecimentos ambientais também podem impactar no comportamento e na reatividade à estímulos dos animais ⁽⁸⁰⁻⁸²⁾. Ainda, mesmo que os peixes sejam criados em água de alta qualidade, livre de contaminantes, se seus pais (geração parental) sofrerem alguma contaminação com resíduos de medicamentos ou agrotóxicos, os efeitos podem passar para a próxima geração ^(48,83).

4.8. Transporte

De acordo com Aleström et al. ⁽⁴⁷⁾ a troca de peixes entre laboratórios apresenta três principais desafios: (1) organizar o envio seguro de peixes, (2) garantir o atendimento ao bem-estar dos peixes, bem como às legislações nacionais e internacionais e, finalmente, (3) evitar a propagação de patógenos entre laboratórios.

Durante o transporte, o desafio é manter a temperatura e os parâmetros de qualidade da água dentro das exigências de *zebrafish*, em particular no que diz respeito ao oxigênio dissolvido, dióxido de carbono e nitrogênio. O tempo de envio deve ser o mais curto possível, e geralmente é mais fácil enviar e receber embriões do que peixes adultos. Os embriões preparados para embarque devem ser desinfetados por *bleaching* antes do embarque. O transporte de peixes adultos requer uma densidade relativamente baixa de peixes (dois peixes adultos/0,5 L) e uma proporção de 1:3 ou superior de

volume de ar ou oxigênio para água em cada recipiente⁽⁸⁴⁾. Peixes juvenis e adultos devem ser mantidos em jejum por 24 horas antes da embalagem para reduzir excreção e evitar a degradação da água do recipiente⁽⁴⁷⁾. Para tempos de transporte superiores a um dia, recomenda-se adicionar quelantes de amônia à água de transporte, visando reduzir os riscos para a saúde dos peixes. Ao chegar no destino final, os animais devem ser inspecionados quanto ao número, sexo, estado geral de saúde e estresse.⁽⁷⁶⁾

4.9. Quarentena

Após a recepção segura de embriões ou peixes, o próximo desafio é evitar a propagação de patógenos no plantel do laboratório. A desinfecção de ovos por *bleaching*, apesar de altamente recomendada para uma inserção segura de novas linhagens em um biotério, é ineficiente para eliminação de patógenos intracelulares, como *P. neurophilia*, por exemplo⁽⁴⁷⁾. Peixes recém-chegados podem trazer organismos patogênicos com eles, mesmo que inicialmente os hospedeiros apresentem quadros subclínicos. Nesse caso, o estresse de manuseio e aglomeração durante o transporte, podem causar uma depressão da imunidade do peixe levando à ocorrência de um surto de doença. Uma abordagem combinada para aclimatação e quarentena devem ser utilizados, na medida do possível, para que ambos sejam realizados simultaneamente. Novos estoques devem passar por triagem geral de saúde, sendo que os protocolos de avaliação da saúde utilizados podem ser influenciados pelos objetivos da pesquisa⁽³³⁾. É fortemente recomendado manter os animais recém-importados em quarentena para limitar o risco de disseminação de patógenos na instalação principal⁽⁴⁷⁾ e, de acordo com Matthews et al.⁽¹⁵⁾, uma vez introduzidos em seu novo tanque, os peixes em quarentena devem permanecer no mesmo por três a quatro semanas. Para laboratórios com apenas alguns tanques em que são empregados menores níveis de biossegurança os animais são mantidos em observação na quarentena durante um período esperando a constatação de sinais clínicos ou mortalidade. Nesse caso é apropriado dedicar um tanque com circulação de água própria como unidade de quarentena, para reduzir o risco de disseminação de patógenos durante a introdução de novos indivíduos. A unidade de quarentena deve ser mantida o mais separado possível de outras unidades, de preferência em uma sala diferente da criação principal. Todos os equipamentos utilizados devem ser de uso exclusivo da unidade de quarentena, recomenda-se que sejam claramente identificados e que nunca entrem em contato com fômites usados na instalação principal.

Já biotérios mais exigentes quanto à biossegurança aplicam quarentenas entre 3 a 4 semanas^(85,86) e, além disso, realizam alguns testes por amostragem nos animais recebidos, como análises moleculares, histológicas, bacteriológicas e de fezes, por exemplo⁽⁸⁷⁾. No entanto, talvez a recomendação mais importante para

entrada de novos animais no biotério seja não integrar novos animais exógenos a experimentos ou à criação principal. Uma alternativa mais segura é criar e reproduzir esses novos animais em quarentena/isolamento e integrar apenas a prole desses animais^(76,84,88,89), ou mesmo a prole da prole (geração F2)⁽⁸⁴⁾ após constatado o estado sanitário satisfatório dos peixes.

4.10. Monitoramento sanitário dos animais

Outra recomendação para avaliar a saúde da colônia criada em um biotério aquático é a prática, já tradicional em biotérios de roedores, de criação e manutenção de sentinelas⁽⁹⁰⁾. Animais sentinelas são indivíduos indicadores do estado sanitário da colônia inteira. Em biotérios de *zebrafish*, os sentinelas são mantidos de forma que as principais fontes de riscos à saúde da colônia sejam apresentadas a eles de maneira mais intensificada para que sejam avaliados frequentemente sem a necessidade de se desfazer de animais da colônia principal. Geralmente *zebrafish* sentinelas são expostos em aquários isolados ao efluente do sistema de criação inteiro com as trocas parciais de água que permitam o bem-estar ideal, mas sempre usando o efluente como meio de criação^(85,86). Idealmente, os indivíduos devem ser selecionados como sentinelas já a partir da eclosão. Isso reduz o risco de estarem indicando problemas externos ao biotério, no caso de animais exógenos e introduzidos em estágios posteriores. O período mínimo de manutenção desses animais é de 3 meses^(86,91). Porém, animais mais velhos podem ser mantidos para que indiquem também afecções que possam estar relacionadas à idade ou a problemas originados de exposições crônicas. Os sentinelas já têm o destino traçado desde a eclosão e esse destino não deve ser desviado. Sendo assim, recomenda-se que os sentinelas não sejam usados com finalidades alheias à detecção de problemas de saúde e bem-estar no ambiente do biotério, como para reprodução ou para experimentação, por exemplo.

Por outro lado, há autores que defendem que, para algumas doenças, o melhor método para detecção de um agente etiológico que está causando um quadro subclínico é a testagem por amostragem representativa ao invés de usar animais sentinelas ou animais resgatados do *sump* de sistemas de recirculação, por exemplo. Outra promissora fonte de material a ser usado para vigilância sanitária da colônia são os indivíduos moribundos ou recém mortos⁽⁹²⁾. O monitoramento sanitário periódico não requer obrigatoriamente que sinais clínicos sejam observados, porém, é imprescindível que o bioterista monitore as características gerais dos animais da colônia para perceber quando alguma anormalidade se instalar sobre a criação.

Além do aspecto sanitário comentado acima, justifica-se a vital importância estabelecer uma rotina de

monitoramento e recolhimento de peixes moribundos e mortos, pelo fato de que odores liberados de peixes mortos podem causar respostas comportamentais nos peixes vivos desse aquário. De fato, os odores provenientes dos *zebrafish* mortos induzem comportamento defensivo nos vivos. Essas respostas coincidem com a destruição das células epidérmicas, indicando que as respostas defensivas e de estresse podem ocorrer como um efeito de substâncias que emanam da carne em decomposição, bem como substância de alarme liberada devido à ruptura das células epidérmicas. Assim, caso o monitoramento e o recolhimento dos peixes mortos não sejam padronizados, pode haver alterações comportamentais que irão enviesar experimentos com esses animais ⁽⁹³⁾.

4.11. Características biológicas normais de zebrafish mantidos em biotério

Para identificar sinais de estresse, sinais clínicos e anormalidades anatômicas e de comportamento é de fundamental importância que o bioterista conheça os animais mantidos na colônia. *Zebrafish* adultos preferem nadar em cardume, são bastante curiosos e exploram todo o aquário ⁽⁹⁴⁾. A espécie é altamente social e apresenta o comportamento de “*shoaling*”, que é a simples agregação de vários animais em uma mesma área. A espécie ainda apresenta o comportamento de “*schooling*”, que é o nado sincronizado e com movimentos coordenados, no entanto não está claro se esse comportamento é normal ou decorrente de excitação ⁽⁹⁵⁾. Quando transferidos para um novo aquário, os animais logo ocupam o fundo e aos poucos passam a explorar os níveis superiores da coluna d’água.

Hierarquias bem definidas se formam no grupo e espaço (tanque), além disso, outros recursos podem ser disputados e defendidos gerando agressão e ferimentos ⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾. Grupos de machos e fêmeas preferem ambientes com plantas flutuantes a ambientes estéreis, apesar de as fêmeas também mostrarem preferência por plantas submersas ⁽⁹⁵⁾. *Zebrafish* possuem escototaxia, ou seja, preferem ambientes escuros àqueles muito iluminados. Além disso, apresentam tigmotaxia, ou seja, preferem nadar próximos a paredes como as paredes do aquário, por exemplo. Na natureza esses comportamentos são essenciais para evitar predadores. No entanto, quando os animais já estão aclimatados ao ambiente de criação o cardume explora toda a coluna d’água. Além disso, *zebrafish* possuem células chamadas melanóforos, contendo grânulos do pigmento melanina, os melanossomos. Dependendo da condição ambiental os *zebrafish* podem mudar de cor. Esse fenômeno também auxilia na fuga de predadores. Quando em ambiente estressante, os melanossomos se agregam e a coloração dos peixes fica mais clara e sem brilho. Quando em ambiente tranquilo, os melanossomos se dispersam e os animais ficam com coloração mais viva e brilhante ⁽⁹⁶⁾.

Por isso, a cor pode ser usada como um indicador em tempo real de estresse, medo ou ansiedade. Apesar de geralmente a coloração dos machos ser mais brilhante e mais dourada e a das fêmeas ser menos brilhante e mais prateada, isso não é uma regra para todos os animais e as diferenças entre machos e fêmeas são maiores durante a manhã. Ou seja, a coloração dos animais muda ao longo do dia. Além disso, em testes cegos, machos mais coloridos apresentam comportamento reprodutivo mais intenso ⁽⁹⁸⁾. Por isso, o conhecimento do padrão de coloração também pode ser usado para inferir a saúde reprodutiva de alguns animais.

Muitos biotérios ao redor do mundo optam por aquários sem enriquecimento ambiental em favor da higiene no sistema de manutenção dos peixes. Cascalho no fundo e “plantas de plástico”, mesmo que artificiais, podem facilitar a acumulação de matéria orgânica na água, o que dificulta a limpeza dos aquários. Essa preferência por ambientes estéreis interfere no bem-estar da criação, visto que é bem documentado que o *zebrafish* têm preferência por ambientes enriquecidos ^(95,99,100). Uma alternativa para melhorar o bem-estar dos animais sem abrir mão da higiene controlada dos aquários é usar imagens impressas de cascalho no fundo do aquário e de plantas nas paredes do aquário ⁽¹⁰⁰⁾. Outra opção de enriquecimento ambiental, que tem como vantagem não impactar nas rotinas de limpeza das instalações é o enriquecimento auditivo ou musical que tem se mostrado eficaz para deixar os peixes mais calmos e menos ansiosos, inclusive reduzindo o estresse causado pelo isolamento, comum nos testes comportamentais como o teste do Tanque Novo, por exemplo ^(101,102).

As características apresentadas são uma generalização para a espécie. Porém, é importante salientar que existem variações e particularidades individuais de cada espécime de uma colônia. Em vista do exposto, recomenda-se que o bioterista conheça os animais sob sua supervisão e saiba identificar as principais variações anatômicas e comportamentais a nível de grupo e de indivíduo. Isso possibilitará que o bioterista seja capaz de proceder o diagnóstico de cenários patológicos, ou não, e a tomada de decisão em direção da solução das intercorrências impostas pela rotina da criação no biotério.

4.12. Doenças e sinais clínicos de zebrafish mantidos em biotério

A suscetibilidade de *zebrafish* a vários agentes etiológicos está amplamente documentada (Tabela 2). Esses agentes são capazes de desencadear alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais, fazendo com que os padrões normais descritos anteriormente sejam leve ou intensamente desestabilizados. Dentre os principais sinais clínicos associados a doenças em *zebrafish* estão: nado anormal; emaciação; protusão de

escamas dorsais; distensão da cavidade celomática; congestão e hemorragias de pele; dispneia; nadadeiras rentes ao corpo; curvatura espinhal; prolapso retal; nado na superfície; nado no fundo; isolamento; inapetência; perda de peso/score corporal; úlceras externas; mortalidade em grupo ^(76,86,89). Das doenças infecciosas, as mais prevalentes em biotérios de *zebrafish* parecem ser causadas por *P. neurophilia* e *Mycobacterium* spp. ⁽⁷⁶⁾. Para o bioterista conhecer mais profundamente as doenças de *zebrafish* recomenda-se os estudos de Esmail et al. ⁽¹⁰³⁾; Kent e Sanders ⁽⁸⁸⁾ e Kent et al. ⁽¹⁰⁴⁾.

Ao analisar a Tabela 2 é possível perceber que

muitas dessas afecções apresentam possíveis sinais clínicos em comum, mesmo as causadas por agentes etiológicos muito distintos (como, por exemplo, infecções causadas por *Mycobacterium marinum* e *Pseudocapillaria tomentosa*) e várias possuem latência de vários meses ou se apresentam de forma subclínica (como *P. neurophilia*; *Mycobacterium* spp.; *Myxidium* spp. e *P. tomentosa*, por exemplo). Por isso, é importante que além da simples observação e exame clínico, o responsável pelos animais utilize também quantos métodos complementares estiverem disponíveis que auxiliem no diagnóstico definitivo ⁽⁹²⁾.

Tabela 2. Principais patógenos identificados em *zebrafish* (*Danio rerio*) e informações sobre órgãos acometidos, sinais clínicos e riscos à saúde humana

| Classificação | Espécie | Sítio de infecção/infestação | Sinais clínicos | Risco zoonótico | Referência |
|----------------------------------|--|--|---|-------------------|---------------------------|
| Bactéria | <i>Aeromonas salmonicida masoucida</i> | Cavidade celômica | Nado errático; nado superficial; taquipneia; altas taxas de mortalidade | - | 76;107;175 |
| | <i>Aeromonas hydrophila</i> | Cavidade celômica | Distensão e hemorragias na cavidade celômica | + | 76;92;134;151 |
| | <i>Aeromonas sobria</i> | Cavidade celômica; úlceras cutâneas | Hemorragias petequiais na pele, musculatura e nadadeiras; distensão da cavidade celômica | + | 76;133;152 |
| | <i>Aeromonas veronii</i> | Diversos órgãos | Hemorragias e lesões severas na superfície do corpo; distensão da cavidade celômica | + | 92;134 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | Diversos órgãos | Distensão da cavidade celômica; edema perianal; crescimento da lesão inicial que serviu como porta de entrada para a infecção; nado superficial; taquipneia; altas taxas de mortalidade. | + | 107 |
| | <i>Plesiomonas shigelloides</i> | Cavidade celômica | Nado errático; lesões na superfície do corpo; exoftalmia | + | 76;92 |
| | <i>Pseudomonas</i> spp. | Diversos órgãos | Septicemia com distensão da cavidade celômica; úlceras cutâneas; dispneia; morte | + | 92;153 |
| | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Úlceras cutâneas | Septicemia com distensão da cavidade celômica; úlceras cutâneas; dispneia; morte | +(raro) | 76;153;154 |
| | <i>Shewanella putrefaciens</i> | Cavidade celômica; úlceras cutâneas | Úlceras cutâneas | + | 76 |
| | <i>Vibrio alginolyticus</i> | Pele | Úlceras cutâneas | + | 76 |
| | <i>Vibrio metschnikovii</i> | Cavidade celômica; pele | Úlceras cutâneas | + | 76 |
| | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | Cavidade celômica; vesícula natatória | Curvatura espinhal; hemorragias internas com distensão da cavidade celômica | + | 76;145 |
| | <i>Vibrio cholerae</i> | Intestino | Fezes esbranquiçadas; diarreia; letargia; perda de peso; água do aquário torna-se turva ao longo da infecção como resultado da maior eliminação de muco nas fezes | + | 109;110 |
| | <i>Vibrio vulnificus</i> | Cavidade celômica | Distensão da cavidade celômica com septicemia hemorrágica | + | 76;176 |
| | <i>Edwardsiella tarda</i> | Vários órgãos | Mortalidade de embriões e larvas até 8 dpf; embriões e larvas com coloração esbranquiçada e pouco móveis; altas taxas de mortalidade em adultos; hemorragias petequiais; descoloração da injúria inicial que serviu de porta de entrada para a infecção; letargia; nado superficial; distensão da cavidade celômica; edema perianal | + | 106 |
| | <i>Flavobacterium columnare</i> | Pele; brânquias | Perda de pigmentação e escamas ao redor da nadadeira dorsal (lesão em forma de cela de cavalo); altas taxas de mortalidade | - | 155 |
| | <i>Mycobacterium abscessus</i> | Vários órgãos | Quadro subclínico; baixa mortalidade; doença/morte quando em ambiente estressante e com água de baixa qualidade | + | 86;92;103;156 |
| | <i>Mycobacterium chelonae</i> | Vários órgãos | Quadro subclínico; baixa mortalidade; doença/morte quando em ambiente estressante e com água de baixa qualidade | + | 92;103;104;156;157;158 |
| | <i>Mycobacterium fortuitum</i> | Vários órgãos | Quadro subclínico; baixa mortalidade; doença/morte quando em ambiente estressante e com água de baixa qualidade | + | 86;92;103;156;158 |
| | <i>Mycobacterium peregrinum</i> | Vários órgãos | Quadro subclínico; baixa mortalidade; doença/morte quando em ambiente estressante e com água de baixa qualidade | - | 86;103;158 Continua... |
| <i>Mycobacterium haemophilum</i> | Vários órgãos | Letargia; emaciação severa; surtos com alta mortalidade; deformações musculares e esqueléticas | + | 86;92;103;104;157 | |
| <i>Mycobacterium marinum</i> | Vários órgãos | Distensão da cavidade celômica; surtos com alta mortalidade; deformações musculares e esqueléticas | + | 86;92;103;104 | |
| <i>Mycobacterium saopaulense</i> | Vários órgãos | Sinais não relatados na bibliografia | + | 86;156 | |

Continua...

...continuação

Tabela 2. Principais patógenos identificados em *zebrafish* (*Danio rerio*) e informações sobre órgãos acometidos, sinais clínicos e riscos à saúde humana

| Classificação | Espécie | Sítio de infecção/infestação | Sinais clínicos | Risco zoonótico | Referência |
|---------------|---|---|--|-----------------|---------------------------|
| Ciliado | <i>Coleps</i> sp. | Embrião e larvas inteiros | Embriões e larvas de até ~7 dpf são predados pelo ciliado; baixas taxas de eclosão e altas taxas de mortalidade na larvicultura | - | 159;160 |
| | <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> | Superfície do corpo; brânquias | Nódulos esbranquiçados na superfície da pele e brânquias; maior produção de muco; dispneia; perda de equilíbrio; anorexia; letargia; morte | - | 161;162;163 |
| | <i>Tetrahymena</i> sp. | Larvas inteiras | Larvas de ~30 dias são predadas pelo ciliado; mortalidade em massa de larvas | - | 164 |
| | <i>Trichodina</i> spp. | Superfície do corpo; brânquias | Dermatite e dispneia com inflamação branquial; geralmente surtos relacionadas com aumento da temperatura da água | - | 86;161 |
| Dinoflagelado | <i>Piscinoodinium pillulare</i> | Superfície do corpo; brânquias | Pele com aspecto "aveludado"; desconforto cutâneo/prurido, representado por animais se esfregando em objetos ou nas paredes do aquário; excesso de muco cutâneo; letargia; dispneia; nado superficial; escurecimento da pele; hemorragias petequiais; surtos com alta letalidade | - | 88 |
| Oomiceto | <i>Saprolegnia brachydanis</i> | Superfície do corpo; brânquias | Crescimento de hifas filamentosas brancas e finas que se acumulam na superfície do corpo e nas brânquias formando uma massa com aspecto de algodão | - | 86;103 |
| | <i>Saprolegnia ferax</i> | Superfície do corpo; brânquias | Idem a <i>S. brachydanis</i> | - | 86;103 |
| Mixozoário | <i>Myxidium streisingeri</i> | Ductos mesonéfricos; lúmen dos túbulos renais | Quadro subclínico | - | 88;104;165 |
| Microsporídio | <i>Pleistophora hypessobryconis</i> | Principalmente na musculatura esquelética, mas também no rim, baço, intestino e ovários | Necrose e deformação muscular, emaciação, letargia; frequentemente ocorrem quadros subclínicos | - | 86;88;103 |
| | <i>Pseudoloma neurophilia</i> | Principalmente nervos; medula espinhal e rombencéfalo, mas também em musculatura esquelética; esôfago; rim e ovário | Emaciação; lordose; escoliose; necrose muscular; crescimento reduzido; déficit reprodutivo; frequentemente ocorrem quadros subclínicos; emaciação não relacionada a anorexia; doença relacionada a quadros de estresse | - | 86;92;103;104;158;166;167 |
| Monogenético | <i>Gyrodactylus</i> spp. | Superfície do corpo; brânquias | Dermatite e dispneia com inflamação branquial; geralmente surtos relacionadas com aumento da temperatura da água | - | 161 |
| | <i>Clinostomum</i> sp. | Musculatura | Nado tortuoso; curvatura lateral da espinha; nódulos amarelados sob a pele | + | 89 |
| Digenético | <i>Transversotrema patialense</i> | Pele | Quadro subclínico; lesões locais nos pontos de adesão do parasito foram constatadas apenas em infecções experimentais | - | 88 |
| | <i>Centrocestus formosanus</i> | Brânquias | Anormalidades respiratórias; quadro subclínico | + | 125;168;169;170 |
| Nematódeo | <i>Pseudocapillaria tomentosa</i> | Intestino | Emaciação; protuberâncias no ventre | - | 92;104;158;171;172 |
| Vírus | Red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) | Sistema nervoso central | Nado errático; mancha opaca clara e de aspecto cremoso no dorso da cabeça; alta letalidade de adultos | - | 104;173 |
| | Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) | Baço e rim | Letargia; perda de apetite; nado anormal; distensão da cavidade celômica; taquipneia; brânquias pálidas; hemorragias petequiais na base das nadadeiras; morte | - | 104;174 |

Muitos desses agentes causadores de enfermidades em *zebrafish* fazem parte da microbiota normal da espécie (103,105) caracterizando-se como agentes oportunistas. Ainda, vários patógenos, inclusive alguns zoonóticos, têm sido usados para modelagem experimental de infecções em *zebrafish* como, por exemplo, *Edwardsiella tarda*; *Vibrio cholerae*; *Staphylococcus aureus*; *Aeromonas salmonicida*; Spring viremia of carp virus (SVCV) e diversos outros (106-111). Por isso, ratifica-se a manutenção das boas práticas no biotério relacionadas a fatores como qualidade da água, barreiras sanitárias e ao bem-estar para que surtos de doenças críticas para a colônia ou para os manipuladores não se instalem em decorrência da

debilidade imunológica dos animais provocada pelo desbalanço desses fatores.

Além dessas doenças infecciosas, diversas doenças podem se desenvolver nos *zebrafish* a partir da manutenção da criação sob parâmetros ambientais desfavoráveis, são as chamadas doenças ambientais. Dentre elas, podem ser citadas as lesões branquiais decorrentes por exposição à amônia, nitritos, nitratos e ao cloro; a nefrocalcinose, decorrente da apresentação em excesso de cálcio ambiental/nutricional e do excesso de dióxido de carbono (CO₂) na água; a doença das bolhas de gás, decorrente da supersaturação de oxigênio na água; os tumores ultimobranquiais, provavelmente decorrentes do

desbalanço eletrolítico do meio; os tumores de tireoide, causados pela deficiência de iodo; e finalmente a megalocitose hepática e os seminomas, causados possivelmente pela exposição a xenobióticos e carcinógenos, respectivamente ⁽¹⁰⁴⁾. A partir dessa série de doenças salienta-se a importância da manutenção de um meio de cultivo saudável e do controle e correção dos parâmetros de qualidade da água como práticas favoráveis à saúde plena da criação.

Ainda, existem doenças idiopáticas, ou seja, com causa desconhecida como, por exemplo, deformações espinhais; inflamação associada ao ovo; malformações operculares; lesões proliferativas de ducto biliar e pancreático; cordoma; tumores de bainha de nervo periférico e linfossarcoma ⁽¹⁰⁴⁾. Devido ao desconhecimento da origem dessas afecções, recomenda-se evitar variações bruscas da qualidade da água ou do manejo geral, de forma que os animais não entrem em um quadro de *stress* ou baixa imunológica que possa desencadear tais doenças.

Várias das doenças apresentadas na Tabela 2 estão relacionadas com a idade dos animais. Até os 24 meses de idade a prevalência de patógenos e de lesões associadas em geral aumenta conforme a idade dos animais ⁽⁷⁵⁾. Por isso, não é recomendado manter animais idosos no plantel principal. Quando os procedimentos experimentais exigirem animais em senescência, estes devem ser isolados dos demais, de forma a reduzir o risco de transmissão de doenças relacionadas à idade.

Assim, a simples percepção de anormalidades individuais ou coletivas dos peixes, pode indicar ao bioterista que a colônia está sendo acometida por algo e, também, pode nortear a tomada de decisão rumo à solução do problema. Nos casos em que o pesquisador perceba qualquer sinal clínico e desvio de comportamento, a recomendação mais adequada é separar os peixes acometidos dos demais o mais rápido possível para depois planejar a melhor abordagem para o problema. Dessa forma interrompe-se a transmissão do agente para animais saudáveis, em casos de doenças infecciosas cujo ciclo ainda esteja no início. Em casos de agressão entre companheiros do mesmo aquário, o animal agressor deve ser isolado dos demais para que a hierarquia seja quebrada e esse animal perca sua dominância sobre os outros em uma possível volta ao mesmo aquário. Uma substância de alerta é liberada na água quando um peixe está machucado sinalizando a todos os peixes que compartilham o ambiente que existe alguma ameaça iminente ⁽⁹⁶⁾. Por isso, se o peixe agredido estiver muito lesionado, ele também pode ser isolado em um tanque hospital para tratamento ou para repouso antes que seja direcionado de volta ao aquário, visando diminuir o estresse do próprio animal e dos companheiros de aquário. Vale salientar que *zebrafish* é uma espécie social e que o isolamento por longos períodos pode gerar estresse nos animais ⁽⁴⁶⁾.

4.13. Controle da Microbiota

Para evitar problemas sanitários com vários dos patógenos citados, os biotérios aquáticos de *zebrafish* podem adotar a criação de colônias “*specific pathogen free*” (SPF, livres de patógenos específicos) ou mesmo “*germ free*” (livres de germes, totalmente livres de microbiota). Biotérios com criações desse tipo sem dúvidas são aqueles que mais atentam para o estado de saúde geral e específica de seus animais e, por isso, requerem maior investimento em instalações, materiais, rações, barreiras sanitárias, pessoal, procedimentos e, principalmente, testagem e diagnóstico definitivo ^(87,92). Por exemplo, colônias SPF regularmente adotam um criterioso monitoramento periódico do status sanitário. Além disso, optam por não utilizar alimento vivo, visto que a manutenção das espécies de invertebrados com microbiota controlada torna-se um desafio maior do que a própria criação de *zebrafish* ⁽⁸⁵⁾.

No entanto, por mais que a eliminação completa ou parcial de microrganismos associados pareça uma vantagem para a criação de qualquer animal, efeitos adversos também existem. O status sanitário dos animais é citado como uma variável capaz de afetar o sistema imune e a resposta ao tratamento experimental em animais de laboratório ^(112,113). Da mesma forma que a presença de organismos patogênicos é capaz de afetar a fisiologia geral e o desenvolvimento dos animais, a total ausência também é capaz disso ⁽¹¹⁴⁾. *Zebrafish germ free* apresentam ausência de ativação natural de vias importantes para maturação do sistema imune e para homeostase de tecidos diversos ⁽¹¹⁴⁾; menor resistência imunológica a agentes infecciosos ⁽¹¹⁵⁾; menor proliferação de células epiteliais do intestino ⁽¹¹⁶⁾; menor capacidade de absorção de lipídios ⁽¹¹⁷⁾ e possuem comportamento locomotor drasticamente alterado ^(118,119), por exemplo. Por isso, alguns autores afirmam que modelos com microbiota mais natural devem ser preconizados em estudos translacionais e modelos SPF devem ser direcionados a estudos mecanísticos sobre a relação entre microbiota e patogêneses diversas ⁽¹²⁰⁾. Dessa forma, os pesquisadores e instituições devem adequar a forma de suas criações, bem como suas barreiras sanitárias e programas de monitoramento, ao objetivo dos estudos desenvolvidos. Da mesma forma, é imprescindível que cada estudo seja planejado tendo em mente a capacidade, estrutura e padrão sanitário do biotério que subsidiará a pesquisa. Para isso, o planejamento conjunto e colaborativo entre pesquisadores e bioteristas é essencial.

4.14. Recomendações sobre saúde única relacionada a biotérios de zebrafish

As recomendações sobre saúde de *zebrafish* não devem estar limitadas ao âmbito da saúde animal, mas sim da saúde única. O conceito de saúde única foi criado em 2004 e é diretamente derivado do conceito de medicina única, o qual prega a união da medicina humana e

medicina veterinária em resposta às zoonoses^(121,122). Em 2008, a OMS, a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) criaram a iniciativa “*One World, One Health*” (Um mundo, uma saúde), na qual o termo “*One Health*” (traduzido para o português como saúde única) expressa a indissociabilidade da saúde humana, saúde animal e saúde do ecossistema (ou saúde ambiental)^(123,124). Doenças parasitárias de *zebrafish* têm relevância para a saúde única^(89,125). Desse ponto de vista, a saúde de uma colônia de *zebrafish* pode impactar a saúde dos experimentadores e bioteristas, bem como de pessoas de suas convivências e do meio ambiente e, por isso, algumas recomendações são importantes.

4.14.1. Saúde humana

Vários dos agentes infecciosos já identificados natural ou experimentalmente em *zebrafish* têm potencial de serem transmissíveis tanto de humanos para *zebrafish* quanto de *zebrafish* para humanos (ou seja, são tanto zoonotônicos quanto antropozoonóticos, respectivamente) como, por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* e fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus*^(126,127). Não à toa *zebrafish* está sendo usado como modelo de estudo sobre infectologia humana⁽¹²⁸⁾. Por isso, o bioterista deve ter em mente que os animais da colônia podem estar abrigando natural ou experimentalmente algum patógeno humano. No caso de infecções experimentais por esses patógenos, os aquários devem estar devidamente identificados e apenas os profissionais treinados e envolvidos no projeto devem entrar em contato com os aquários e fômites usados. O potencial zoonótico das principais doenças de *zebrafish* está indicado na Tabela 2.

De fato, os bioteristas que desenvolvem suas atividades com *zebrafish* estão constantemente expostos a riscos ocupacionais potencialmente importantes. A preocupação se intensifica ainda mais pelo fato de esses agentes infecciosos se apresentarem através da água, que, por sua vez, é uma das principais fontes de disseminação de doenças para humanos^(129,130). Em vista disso, recomenda-se que o manipulador sempre higienize as mãos antes e após o contato com os animais, água de criação ou qualquer fômite que tenha entrado em contato com a água do biotério e use luvas para realização dessas atividades. O uso de máscara de proteção também se faz necessário, visto que o ambiente de um biotério aquático pode frequentemente ter formação de gotículas que podem ser inaladas ou ingeridas inadvertidamente. Outra recomendação importante é que, tão logo se perceba animais mortos nos aquários, eles sejam retirados e usados em programas de vigilância (como já abordado) e/ou descartados de forma correta (ver adiante). A higienização e desinfecção de fômites que entraram ou que entrarão em contato com a água de criação, bem como uso de pedilúvio

na entrada e na saída, são importantes medidas tanto de biossegurança quanto de biosseguridade. Ou seja, evitando a infecção dos animais com possíveis patógenos vindos de fora do biotério ou evitando a infecção dos manipuladores e de outras pessoas com possíveis patógenos saídos dos aquários/biotério, respectivamente. Higienização e desinfecção de bancadas que rotineiramente recebem gotejamento de água dos aquários também são medidas eficazes que evitam a contaminação do ambiente e a infecção de manipuladores.

A manutenção do esquema vacinal em dia também é recomendada. Já foi reportado que a vacina BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) se provou capaz de reduzir a letalidade de *M. marinum* sobre *zebrafish*⁽¹³¹⁾. Além disso, a vacina BCG é capaz de proporcionar alguma proteção cruzada contra várias espécies de *Mycobacterium* presentes em colônias de *zebrafish*⁽¹³²⁾. Isso mostra que a vacina BCG tem um amplo espectro protetivo no que diz respeito às espécies de bactérias e às espécies de hospedeiros potenciais presentes em um biotério de *zebrafish*. Em casos mais específicos de surtos localizados em determinados biotérios ou em experimentos que usem *zebrafish* como modelo de estudo para infectologia humana, a vacinação contra cólera pode ser indicada.

Além do risco de transmissão da zoonose em si, ainda há o problema de o manipulador se infectar com agentes resistentes aos tratamentos disponíveis na maioria dos serviços de saúde como é o caso da infecção por bactérias resistentes a antibióticos^(133,134). Além disso, ainda que não se infecte, o manipulador pode transportar agentes infecciosos (resistentes ou não a tratamentos disponíveis) a ambientes frequentados por indivíduos imunocomprometidos, recém-nascidos e suas mães, idosos ou hospitalizados de maneira geral. De fato, recomenda-se que o bioterista nunca saia do biotério para visitar um paciente hospitalizado no mesmo dia ou sem antes ter se higienizado rigorosamente com um banho, pelo menos⁽¹³⁵⁾.

4.14.2. Saúde ambiental

Como já mencionado, um biotério aquático que não prima pelas boas práticas e pela biossegurança de suas instalações pode se tornar um risco não só para a saúde dos animais e dos experimentadores, mas também para a saúde ambiental. Já é amplamente defendido que avaliações experimentais de peixes transgênicos, por exemplo, sejam realizadas em instalações de forma que a contenção física seja eficaz para garantir a segurança da aplicação desses animais⁽¹³⁶⁾. No entanto, recentemente foi reportado que *zebrafish* transgênicos alcançaram o ambiente natural da Mata Atlântica brasileira em decorrência de barreiras de contenção inadequadas de criadores de peixes ornamentais, causando preocupação no que se refere à saúde do ecossistema^(137,138).

Além disso, *zebrafish* transgênicos ou selvagens

são potenciais reservatórios de patógenos que podem contaminar o ambiente natural, infectando, conseqüentemente, peixes silvestres e outros animais de forma geral, inclusive humanos (Tabela 2). De fato, a ocorrência amplamente distribuída de *zebrafish* ao redor do mundo já causa preocupação pela introdução de doenças que não eram reportadas no passado em determinadas regiões geográficas ^(89,125). Para evitar a contaminação do ambiente e o risco infeccioso é recomendado que os coordenadores de biotérios aquáticos de *zebrafish* estejam atentos ao disposto pela legislação vigente. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) tornaram públicas a Resolução da Diretoria Colegiada nº 222/2018 ⁽¹³⁹⁾ a Resolução nº 358/2005 ⁽¹⁴⁰⁾, respectivamente, que regulamentam as boas práticas de gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde e dispõem de várias orientações sobre o descarte e destino de resíduos provenientes das atividades de manutenção e de experimentação de animais de laboratório. Ainda, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) publicou a RN nº 18/2014 que dispõe sobre a classificação de riscos de organismos geneticamente modificados (OGM) e os níveis de biossegurança a serem aplicados nas atividades com OGMs, visando a contenção desses organismos e seus derivados ⁽¹⁴¹⁾. Além disso, o CONCEA possui duas normativas particularmente importantes que auxiliam na orientação da contenção de material biológico em instalações que mantêm *zebrafish* com fins científicos, são a RN nº 55/2022, que apresenta a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa (DBCA) ⁽¹⁴²⁾ e a RN nº 34/2017 ⁽¹³⁾, que apresenta informações relevantes sobre criação e manutenção de *zebrafish* em instalações de ensino e/ou pesquisa científica ⁽¹³⁾.

No entanto, apesar de os biotérios de *zebrafish* representarem riscos, eles também atuam a favor da saúde ambiental e da saúde única como um todo. *Zebrafish* de diversas linhagens têm sido empregados como modelos promissores em estudos de doenças animais ^(110,143), humanas ^(144,145) e em ecotoxicologia ^(146,147). Por isso, se bem administrado e atentando para as boas práticas e para a biossegurança, um biotério aquático de *zebrafish* pode trazer mais benefícios para a sociedade do que riscos.

5. Regras

5.1. Planos de estudos, protocolos e procedimentos

O plano de estudo contém em detalhes o objetivo da pesquisa, como o trabalho será organizado, quais dados serão coletados durante o experimento e quem é responsável pelos vários aspectos do estudo. Este é o documento central através do qual o pesquisador comunica os objetivos e a condução do estudo para a

equipe de trabalho e para terceiros. Neste documento deve conter uma descrição geral do experimento com cronograma de atividade, material e métodos e responsabilidade de cada membro da equipe envolvido. A aprovação do plano de estudo é vital para que se possa começar a pesquisa. No Brasil rotineiramente esse documento é elaborado como projeto de monografia, tese ou dissertação.

Procedimentos de operação padrão (POP), são desenvolvidos para a condução de estudos, registros e relatórios. Estes protocolos fazem parte das tarefas de rotina do laboratório e descrevem como os procedimentos devem ser conduzidos. De acordo com Andrade et al. ⁽¹⁴⁸⁾, o trabalho com animais de laboratório requer a utilização e o contato com substâncias químicas e alérgenos potencialmente perigosos para a saúde do pessoal envolvido, as instalações e os próprios animais. Esses perigos podem ser minimizados ou eliminados com o estrito cumprimento de procedimentos operacionais padronizados destinados a garantir a segurança.

Um POP é preparado para as pessoas diretamente ligadas à tarefa com o objetivo de atingir de forma eficiente e segura os requisitos da qualidade. No POP é importante observar as atividades críticas que devem ser resumidas e conter somente aquelas etapas básicas que não podem deixar de ser cumpridas. As atividades críticas devem ser detalhadas no manual de treinamento, no qual podem ser utilizadas figuras, fotos e esquemas. O manual de treinamento pode ainda ser colocado sob a forma de vídeo ou áudio visual para facilitar o treinamento ⁽¹⁵⁰⁾.

No caso de *zebrafish* foi desenvolvido uma plataforma *online* pelo *Zebrafish Information Network* (ZFIN). Nesse site estão disponibilizadas informações sobre os dados biológicos de *zebrafish* e alguns protocolos para sua manutenção em laboratório.

Uma das diferenças mais importantes do protocolo de estudo entre projetos de mamíferos e peixes envolve o aumento da atenção que deve ser dada ao meio físico (água) nos estudos com peixes. O ambiente aquático é equivalente a um sistema de suporte à vida, portanto, os sistemas de alojamento e teste podem ser bastante complexos. Assim, protocolos de verificação dos parâmetros de qualidade da água descritos anteriormente, assim como seu registro, tornam-se necessários para uma maior confiabilidade dos dados gerados. Nesse quesito o tipo de protocolo será ajustado ao tipo de sistema de manutenção adotado. Dessa forma, são elencados a seguir os principais itens que devem estar inclusos no POP de um biotério de *zebrafish*.

- Contatos para emergência.
- Sistemas de criação e checagem de equipamentos.
- Limpeza dos utensílios e tanques.
- Cuidados gerais e alimentação dos peixes.

- Verificação de parâmetros abióticos e de qualidade da água.
- Recebimento e transporte dos peixes.
- Avaliação da saúde dos peixes.
- Eutanásia.
- Aprovação, identificação e registro de experimentos.

O POP deve ser revisado periodicamente e deve apresentar o número e data da última revisão realizada como forma de registro. Ao serem considerados os dados fornecidos pela pesquisa científica, podem ser elaborados protocolos com práticas e normas de bem-estar animal e segurança no trabalho. Dessa forma, cada laboratório de experimentação/criação de *zebrafish* deve trabalhar conforme a legislação vigente em busca do bem-estar animal a fim de qualificar os resultados das pesquisas.

6. Resultados

Dada a importância potencial do conhecimento derivado de um estudo, é importante que os dados estejam completos, tenham integridade e sejam mantidos em segurança⁽²⁹⁾. Embora seja menos comum nos primeiros artigos publicados com *zebrafish*, atualmente há uma tendência crescente de inclusão de informações detalhadas sobre a criação e os parâmetros usados nos estudos na seção de “Material e Métodos” das publicações⁽⁴⁷⁾. Com a noção de que parâmetros como alimentação, temperatura, fotoperíodo etc. podem afetar os resultados da pesquisa experimental⁽¹⁵⁰⁾ é recomendado incluir sempre uma descrição detalhada dos parâmetros de criação de *zebrafish* usados. No caso de biotérios o registro das atividades como alimentação, dados abióticos é de suma importância para a gestão dos recursos e planejamento das atividades.

O relatório e os dados gerados são o resultado final do experimento. Essas informações muitas vezes passam a fazer parte da base de conhecimento científico assim que os resultados chegam a domínio público, muitas vezes por meio de publicação em periódicos. Dada a importância potencial do conhecimento derivado do estudo, é importante que os dados estejam completos, tenham integridade e sejam mantidos em segurança⁽²⁸⁾. Os arquivos resultantes de um estudo devem ser armazenados de forma que ao acessar as informações seja possível repetir o experimento.

7. Controle de qualidade

As BPL definem os requisitos mínimos de garantia de qualidade necessários para garantir a validade dos resultados experimentais. Para respeitar os princípios de BPL, o controle de qualidade deve revisar todas as fases da pesquisa pré-clínica – desde o planejamento até a

geração de relatórios e arquivamento da documentação. Em resumo, a missão fundamental do controle de qualidade é a de uma testemunha independente de todo o processo de pesquisa pré-clínica e sua estrutura organizacional. Nesse sentido as comissões de ética em pesquisa animal das instituições de ensino superior, Conselho Federal de Medicina Veterinária, assim como a avaliação por pares das revistas científicas, desempenham uma importante colaboração no cumprimento deste requisito. Cabe ressaltar que raramente pode ser feito por apenas uma pessoa e geralmente requer informações de especialistas científicos da área de estudo.

8. Conclusão

De maneira geral, a implantação das BPL deve começar com uma avaliação dos riscos e oportunidades em todo o sistema através da realização de uma busca por melhorias que serão práticas em determinadas situações. Esta avaliação deverá incluir o embasamento científico das necessidades e do bem-estar dos animais, e avaliação de riscos para identificar as causas da precariedade do bem-estar animal. Em muitos casos, a abordagem mais eficaz é susceptível de ser um processo contínuo de melhoria com base em metas alcançáveis.

De certa forma o Brasil ainda necessita de melhorias relacionadas ao bem-estar de organismos aquáticos (leis nacionais, normativas para construção de biotérios, acordos internacionais, programas corporativos e outros); especialmente em relação à utilização destes organismos na pesquisa e desenvolvimento tecnológico. Dessa forma, a implementação das BPL fornece uma orientação valiosa para a melhoria do bem-estar animal e segurança do trabalhador, além de vir a facilitar a padronização da pesquisa. Como parte da avaliação dos riscos e oportunidades, as BPL devem considerar o possível papel e os benefícios de tais protocolos para a experimentação, assim como qualquer capacitação necessária, para facilitar que os trabalhadores envolvidos possam cumprir as normas.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Contribuições do autor

Conceituação: M.T. Kutter e T. Silveira. *Curadoria de dados:* M.T. Kutter. *Análise formal:* T. Silveira. *Metodologia:* M.T. Kutter. *Redação (esboço original):* M.T. Kutter, T. Silveira e L.J.G. Barcellos. *Redação (revisão e edição):* M.T. Kutter, T. Silveira, L.F. Marins e R.T. Boyle.

Referências

1. Lapenta VA. Physiological assay of glucosides, toxins and poisons on gold fish, *Carassius auratus*. Proceedings of the Indiana Academy of Science. 1931;41:445-448.

2. Gersdorff WA. Relative toxicity of the cresols as demonstrated by tests with *Carassius auratus*. Journal of Agricultural Research. 1937;54(6):469-478.
3. Schlaifer A. Studies in mass physiology: effect of numbers upon the oxygen consumption and locomotor activity of *Carassius auratus*. Physiological Zoology. 1938;11(4):408-424. <https://doi.org/10.1086/physzool.11.4.30152652>.
4. Shaw RJ, Escobar RA, Baldwin FM. The influence of temperature and illumination on the locomotor activity of *Carassius auratus*. Ecology. 1938;19(2):343-346. <https://doi.org/10.2307/1929654>.
5. Ribas L, Piferrer F. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. Reviews in Aquaculture. 2014;6(4):09-240. <https://doi.org/10.1111/raq.12041>.
6. Creaser WC. The Technic of Handling the Zebra Fish (*Brachydanio rerio*) for the Production of Eggs Which Are Favorable for Embryological Research and Are Available at Any Specified Time Throughout the Year. Copeia / JSTOR. 1934;1934(4):159-161. <https://doi.org/10.2307/1435845>.
7. Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). Nature. 1981;291(5813):293-296. <https://doi.org/10.1038/291293a0>.
8. Mari-Beffa M, Palmqvist P, Marín-Girón F, Montes GS, Becerra J. Morphometric study of the regeneration of individual rays in teleost tail fins. Journal of Anatomy. 1999;31(195):393-405. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1999.19530393.x>.
9. Figueiredo MA, Ceccon CF, Almeda DV, Marins LF. Improving the production of transgenic fish germplines: in vivo evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using a green fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene coinjection strategy. Genetics and Molecular Biology. 2007;30(1):31-36. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000100008>.
10. Trigueiro NSS, Canedo A, Braga DLS, Luchiarri AC, Rocha TL. Zebrafish as an Emerging Model System in the Global South: Two Decades of Research in Brazil. Zebrafish. 2020;17(6):412-425. <https://doi.org/10.1089/zeb.2020.1930>.
11. Brasil. Constituição da República Federativa do Brasil. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União; 2008; nº 196; seção 1, p.1. Português.
12. Brasil. Presidência da República. Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais – CIUCA, mediante a regulamentação da Lei n. 11.794, de 08.10.2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Diário Oficial da União; 2009; nº 134; seção 1; p.2. Português.
13. CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa CONCEA nº 34, de 27 de julho de 2017. Institui o capítulo “Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica para fins de estudo biológico ou biomédico I – Lambari (*Astyanax*), Tilápia (*Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis*) e Zebrafish (*Danio rerio*). Diário Oficial da União. 2017; seção 1, p. 218. Português.
14. Brand M, Granato M, Nüsslein-Volhard C. Keeping and raising zebrafish. In: Dahm R and Nüsslein-Volhard C. Zebrafish: A Practical Approach. London: IRL Press; 2002. p. 7-37.
15. Matthews M, Trevarrow B, Matthews J. A virtual tour of the Guide for zebrafish users. Lab Animal. 2002;31(3):34-40.
16. Reed B, Jennings M. Guidance on housing and care of zebrafish *Danio rerio*. Horsham: Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA); 2011. 64p. (<https://norecopa.no/no/textbase/guidance-on-the-housing-and-care-of-zebrafish-danio-rerio>)
17. Canedo A, Saiki P, Santos AL, Carneiro SK, Souza, AM, Qualhato G, Brito RS, Mello-Andrade, Rocha, TL. O peixe-zebra (*Danio rerio*) encontra a bioética: os princípios éticos dos 10Rs na pesquisa. Ciência Animal Brasileira. 2022;23(1):e-70884. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v22e-70884>.
18. Wolf JC, Wolfe MJ. Good laboratory practice considerations in the use of fish models. Toxicologic Pathology. 2003;31(1):53-57. <https://doi.org/10.1080/01926230390178739>.
19. CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa CONCEA nº 32, de 06 de setembro de 2016. Baixa as Diretrizes de Integridade e de Boas Práticas para Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. Diário Oficial da União. 2016; seção 1, p. 5. Português.
20. Politi FAS, Majerowicz J, Cardoso TAO, Pietro RCLR, Salgado HRN. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 2008;29(1):17-28. <https://rcfba.fcfa.unesp.br/index.php/ojs/article/view/489>.
21. UNDP, World Bank, WHO. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Handbook: Good Laboratory Practice (GLP). World Health Organization; 2001. 225p. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66894>.
22. WHO, World Health Organization. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Good laboratory practice training manual for the trainee: A tool for training and promoting good laboratory practice (GLP) concepts in disease endemic countries. 2nd ed. World Health Organization; 2008. 268p.
23. CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa CONCEA nº 49, de 07 de maio de 2021. Dispõe sobre a obrigatoriedade de capacitação do pessoal envolvido em atividades de ensino e pesquisa científica que utilizam animais. Diário oficial da União. 2021; seção 1, p. 5. Português.
24. National Research Council (US). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. <https://nap.nationalacademies.org/catalog/12910/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals-eighth>
25. Kuzel MAA, Freitas TPT, Schirato GV, Souza JB, Müller CB. A importância da qualificação profissional e o trabalho em equipe no biotério de experimentação. Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. 2012;1(3):263-269. <https://www.sbcal.org.br/old/upload/ar-qupload/artigo8numero3-2111e.pdf>.
26. Trevarrow B. Zebrafish facilities for small and large laboratories. Methods in cell biology. 2004;77:565-591. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(04\)77030-2](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(04)77030-2).
27. Lawrence C, Mason T. Zebrafish housing systems: A review of basic operating principles and considerations for design and functionality. ILAR Journal. 2012;53(2):179-191. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.179>.

28. CCAC, Canadian Council on Animal Care. CCAC Guidelines: Zebrafish and other small, warm-water laboratory fish. 2020. 110p. <https://ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/CCAC-Guidelines-Zebrafish-and-other-small-warm-water-laboratory-fish.pdf>
29. Villamizar N, Ribas L, Piferrer F, Vera LM, Sánchez-Vázquez FJ. Impact of Daily Thermocycles on Hatching Rhythms, Larval Performance and Sex Differentiation of Zebrafish. PLoS ONE. 2012;7(12):e52153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052153>.
30. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. Biological Reviews. 2008;83(1):13-34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>.
31. Bilotta, J, Saszik S, DeLorenzo AS, Hardesty HR. Establishing and maintaining a low-cost zebrafish breeding and behavioural research facility. Behaviour Research Methods, Instruments and Computers. 1999;31(1):178-184. <https://doi.org/10.3758/bf03207707>.
32. Osterauer R, Heinz-R. Köhler. Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology. 2008;86:485-494. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.12.013>.
33. Barrionuevo WR, Burggren WW. O₂ consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): Influence of temperature and ambient O₂. American Journal of Physiology. 1999;276(2):R505-513. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.2.R505>.
34. Scott GR, Johnston IA. Temperature during embryonic development has persistent effects on thermal acclimation capacity in zebrafish. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012;109(35):14247-14252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205012109>.
35. Zhang Q, Kopp M, Babiak I, Fernandes JMO. Low incubation temperature during early development negatively affects survival and related innate immune processes in zebrafish larvae exposed to lipopolysaccharide. Scientific Reports. 2018;8:4142. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22288-8>.
36. Hurd MW, Debruyne J, Straume M, Cahill GM. Circadian rhythms of locomotor activity in zebrafish. Physiology & Behavior. 1998;65(3):465-472. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00183-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00183-8).
37. López-Olmeda JF, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ. Light and temperature cycles as zeitgebers of zebrafish (*Danio rerio*) circadian activity rhythms. Chronobiology International. 2006;23(3):537-550. <https://doi.org/10.1080/07420520600651065>.
38. del Pozo A, Sánchez-Férez JA, Sánchez-Vázquez FJ. Circadian rhythms of self-feeding and locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). Chronobiology International. 2011;28(1):39-47. <https://doi.org/10.3109/07420528.2010.530728>.
39. Francis, M. Aquatics labs: five questions you don't want to have to ask. Canadian Association for Laboratory Animal Science/Association Canadienne pour la Science des Animaux de Laboratoire membership magazine. 2008;42(3):25-27.
40. Lawrence C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. Aquaculture. 2007;269:1-20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>.
41. Avdesh A, Chen M, Martin-Iverson MT, Mondal A, Ong D, Rainey-Smith S, Taddei K, Lardelli M., Groth DM, Verdile G, Martins RN. Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction. Journal of Visualized Experiments. 2012;69:e4196. <https://doi.org/10.3791/4196>.
42. Boström ML, Berglund O. Influence of pH-dependent aquatic toxicity of ionizable pharmaceuticals on risk assessments over environmental pH ranges. Water Research. 2015; 72:154-161. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.040>.
43. Magalhães DP, Marques MRC, Baptista DF, Buss DF. Metal bioavailability and toxicity in freshwaters. Environmental Chemistry Letters. 2015;13:69-87. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0491-9>.
44. Martinelle K, Häggström L. Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: Transport across cell membranes, Journal of Biotechnology. 1993;30(3):339-350. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(93\)90148-G](https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90148-G)
45. Wurts WA. Alkalinity and hardness in production ponds. World Aquaculture. 2002; 33:16-17.
46. Timmons MB, Ebeling JM, Wheaton JM, Summerelt ST, Vinci BJ. Recirculating Aquaculture Systems. 2nd ed. Ithaca (NY): Cayuga Aqua Ventures; 2002. 757p.
47. Aleström P, D'Angelo L, Midtlyng PJ, Schorderet DF, Schulte-Merker S, Sohm F, Warner S. Zebrafish: Housing and Husbandry Recommendations. Laboratory Animals. 2020;54(3):213-24. <https://doi.org/10.1177/0023677219869037>.
48. Kalichak F, Barcellos HHA, Idalencio R, Koakoski G, Soares SM, Pompermaier A, Rossini M, Barcellos LJG. Persistent and transgenerational effects of risperidone in zebrafish. Environmental Science and Pollution Research. 2019;26:26293-26303. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05890-9>.
49. Tamagno WA, Sofiatti, JRO, Alves C, Sutorillo NT, Vanin AP, Bilibio D, Pompermaier A, Barcellos LJG. Synthetic estrogen bioaccumulates and changes the behavior and biochemical biomarkers in adult zebrafish. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2022;92:103857. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103857>.
50. Chaulet FC, HHA Barcellos, Fior D, Pompermaier A, Koakoski G, Rosa JGS, Fagundes M, Barcellos LJG. Glyphosate- and Fipronil-Based Agrochemicals and Their Mixtures Change Zebrafish Behavior. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2019;77:443-451. <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00644-7>.
51. Barcellos HHA, Pompermaier A, Mendonça-Soares S, Maffi VC, Fernandes M, Koakoski G, Kirsten K, Baldisserotto B, Barcellos LJG. Aripiprazole prevents stress-induced anxiety and social impairment, but impairs antipredatory behavior in zebrafish. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2020;189:172841. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.172841>.
52. Giacomini ACVV, Abreu MS, Giacomini LV, Siebel AM, Zimmerman FF, Rambo CL, Mocelin R, Bonan CD, Piatto AL, Barcellos LJG. Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. Behavioural Brain Research. 2016;296:301-310. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.09.027>.
53. Abreu MS, Koakoski G, Ferreira D, Oliveira TA, Rosa JGS, Gusso D, Giacomini ACV, Piatto AL, Barcellos LJG. Diazepam and Fluoxetine Decrease the Stress Response in Zebrafish. PLoS ONE. 2014;9(7):e103232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103232>.
54. Quadros VA, Rosa LV, Costa FV, Koakoski G, Barcellos LJG, Rosemberg DB. Predictable chronic stress modulates behavioral and neuroendocrine phenotypes of zebrafish: Influence of two homotypic stressors on stress-mediated responses. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology &

- Pharmacology. 2021;247:109030. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109030>.
55. Kirsten K, Pompermaier A, Koakoski G, Mendonça-Soares S, da Costa AR, Maffi VC, Kreutz LC, Barcellos LJG. Acute and chronic stress differently alter the expression of cytokine and neuronal markers genes in zebrafish brain. *Stress*. 2021;24(1):107-112. <https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1724947>.
56. Vargesson NA. Zebrafish. In: S. Barnett. *Manual of Animal Technology*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 2007. p. 78-84.
57. Westerfield, M. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed. Eugene: University of Oregon Press; 2000.
58. Lawrence C. Advances in Zebrafish Husbandry and Management. In: Detrich III HW, Westerfield M, Zon LI. *Methods in Cell Biology*. Vol 104. Oxford: Academic Press; 2011. p. 430-452.
59. Geisler R, Borel N, Ferg M, Maier JV, Strähle U. Maintenance of Zebrafish Lines at the European Zebrafish Resource Center. *Zebrafish*. 2016;13(S1):S19-S23. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1205>.
60. AFS, American Fisheries Society. *Guidelines for the use of fishes in research*. American Fish Society, Bethesda, 2014. 90 p.
61. Dametto FS, Fior D, Idalencio R, Rosa JGS, Fagundes M, Marqueze A, Barreto RE, Piato A, Barcellos LJG. Feeding regimen modulates zebrafish behavior. *PeerJ*. 2018;6:e5343. <https://doi.org/10.7717/peerj.5343>.
62. Nasiadka A, Matthew DC. Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment. *ILAR Journal*. 2012;53(2):161-168. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.161>.
63. Duff NM, Sommerfeld RE, Litvak MK. Discriminating Sex in Zebrafish (*Danio rerio*) Using Geometric Morphometrics. *Zebrafish*. 2019;16(2):207-213. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1664>.
64. McMillan SC, Géraudie J, Akimenko M-A. Pectoral Fin Breeding Tubercle Clusters: A Method to Determine Zebrafish Sex. *Zebrafish*. 2015;12(1):121-123. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1060>.
65. Hutter S, Penn DJ, Magee S, Zala SM. Reproductive behaviour of wild zebrafish (*Danio rerio*) in large tanks. *Behaviour*. 2010;147:641-660. <https://doi.org/10.1163/000579510X12632972473944>.
66. Pham LN, Kanther M, Semova I, Rawls JF. Methods for generating and colonizing gnotobiotic zebrafish. *Nature Protocols*. 2008;3(12):1862-1875. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.186>.
67. Han J-H, Jung S-K. Toxicity Evaluation of Household Detergents and Surfactants Using Zebrafish. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2021;26(1):156-164. <https://doi.org/10.1007/s12257-020-0109-3>.
68. Nickmilder M, Carbonnelle S, House BA. House cleaning with chlorine bleach and the risks of allergic and respiratory diseases in children. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2007;18(1):27-35. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2006.00487.x>.
69. Berutti E, Angelini E, Rigolone M, Migliaretti G, Pasqualini D. Influence of sodium hypochlorite on fracture properties and corrosion of ProTaper Rotary instruments. *International Endodontic Journal*. 2006;39:693-699. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01134.x>.
70. Liu D, Pellicer AM, Brüggmann A, Kiggen M, Behrens S, Good C, Straus DL, Meinelt T. Effect of water hardness/alkalinity and humic substances on the toxicity of peracetic acid to zebrafish embryos and pathogenic isolates. *Aquaculture Reports*. 2021;21:100900. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100900>.
71. Garcia RL, Sanders GE. Efficacy of cleaning and disinfection procedures in a zebrafish (*Danio rerio*) facility. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2011;50(6):895-900. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3228927/>.
72. Chang CT, Colicino EG, DiPaola EJ, Al-Hasnawi HJ, Whipps CM. Evaluating the effectiveness of common disinfectants at preventing the propagation of *Mycobacterium* spp. isolated from zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2015;178:45-50. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.09.008>.
73. Ferguson JA, Watral V, Schwindt AR, Kent ML. Spores of two fish microsporidia (*Pseudoloma neurophilia* and *Glugea anomala*) are highly resistant to chlorine. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2007;76(3):205-214. <https://doi.org/10.3354/dao076205>.
74. Chang CT, Amack JD, Whipps CM. Zebrafish Embryo Disinfection with Povidone-Iodine: Evaluating an Alternative to Chlorine Bleach. *Zebrafish*. 2016;13(S1):S-96-S-101. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1229>.
75. CFMV, Conselho Federal de Medicina Veterinária. 2017. Resolução nº 1165, de 11 de agosto de 2017. Dispõe sobre Anotação de Responsabilidade Técnica e registro de profissionais e de estabelecimentos de cultivo e manutenção de organismos aquáticos. *Diário Oficial da União*. 2017; seção 1, p. 65. Português.
76. Borges AC, Pereira N, Franco M, Vale L, Pereira M, Cunha MV, Amaro A, Albuquerque T, Rebelo M. Implementation of a Zebrafish Health Program in a Research Facility: A 4-Year Retrospective Study. *Zebrafish*. 2016;13(S1):1-12. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1230>.
77. CFMV, Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução nº 1321, de 27 de abril de 2020. Institui normas sobre os documentos no âmbito da clínica médico-veterinária e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. 2020; nº 79, seção 1, p. 112. Português.
78. Oliveira TA, Idalencio R, Kalichak F, Rosa JGS, Koakoski G, Abreu MS, Giacomini ACV, Gusso D, Rosemberg DB, Barreto RE, Barcellos LJG. Stress responses to conspecific visual cues of predation risk in zebrafish. *PeerJ*. 2017;5:e3739. <https://doi.org/10.7717/peerj.3739>.
79. Abreu MS, Oliveira TA, Koakoski G, Barreto RE, Barcellos LJG. Modulation of Cortisol Responses to an Acute Stressor in Zebrafish Visually Exposed to Heterospecific Fish During Development. *Zebrafish*. 2018;15(3):228-233. <http://doi.org/10.1089/zeb.2017.1509>.
80. Reolon GK, Melo GM, Rosa JG, Barcellos LJG, Bonan CD. Sex and the housing: Effects on behavior, cortisol levels and weight in zebrafish. *Behavioural Brain Research*. 2018;336:85-92. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.006>.
81. Rambo CL, Mocelin R, Marcon M, Villanova D, Koakoski G, Abreu MS, Oliveira TA, Barcellos LJG, Piato AL, Bonan CD. Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress. *Physiology & Behavior*. 2017;171:50-54. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.12.032>.
82. Soares SM, Kirsten K, Pompermaier A, Maffi VC, Koakoski G, Woloszyn M, Barreto RE, Barcellos LJG. Sex segregation affects exploratory and social behaviors of zebrafish according

- to controlled housing conditions. *Physiology & Behavior*. 2020;222:112944. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112944>.
83. Pompermaier A, Tamagno WA, Alves C, Barcellos LJG. Persistent and transgenerational effects of pesticide residues in zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2022;262:109461. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109461>.
84. Varga ZM. Aquaculture, husbandry, and shipping at the Zebrafish International Resource Center. *Methods Cell Biol*. 2016;135:509-534. <https://doi.org/10.1016/bs.mc.2016.01.007>.
85. Barton, CL, Johnson EW, Tanguay RL. Facility Design and Health Management Program at the Sinnhuber Aquatic Research Laboratory. *Zebrafish*. 13;(S1):S-39-S-43. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1232>.
86. Collymore C, Crim MJ, Lieggi C. Recommendations for Health Monitoring and Reporting for Zebrafish Research Facilities. *Zebrafish*. 2016;13(S1):S138-S148. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1210>.
87. Murray KN, Clark TS, Kebus MJ, Kent ML. Specific Pathogen Free - A Review of Strategies in Agriculture, Aquaculture, and Laboratory Mammals and How They Inform New Recommendations for Laboratory Zebrafish. *Research in Veterinary Science*. 2022;142:78-93. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.11.005>.
88. Kent ML, Sanders JL. Important Parasites of Zebrafish in Research Facilities. In: Cartner SC, Eisen JS, Farmer SC, Guillemain KJ, Kent ML, Sanders GE. *The Zebrafish in Biomedical Research - Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications* [Internet]. 1st ed. London: Elsevier Academic Press; 2020. p. 479-94. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00040-3>.
89. Silveira T, Kütter MT, Martins CMG, Marins LF, Boyle RT, Campos VF, Remião MH. First record of *Clinostomum* sp. (Digenaea: Clinostomidae) in *Danio rerio* (Actinopterygii: Cyprinidae) and the implication of using zebrafish from pet stores on research. *Zebrafish*. 2021;18(2):139-148. <https://doi.org/10.1089/zeb.2020.1950>.
90. Mähler M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, Raspa M. FELASA Recommendations for the Health Monitoring of Mouse, Rat, Hamster, Guinea Pig and Rabbit Colonies in Breeding and Experimental Units. *Laboratory Animals*. 2014;48(3):178-192. <https://doi.org/10.1177/0023677213516312>.
91. Kent ML, Feist SW, Harper C, Hoogstraten-Miller S, Law JM, Sánchez-Morgado JM, Tanguay RL, Sanders GE, Spitsbergen JM, Whipps CM. Recommendations for Control of Pathogens and Infectious Diseases in Fish Research Facilities. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology*. 2009;149(2):240-48. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.08.001>.
92. Marancik D, Collins J, Afema J, Lawrence C. Exploring the Advantages and Limitations of Sampling Methods Commonly Used in Research Facilities for Zebrafish Health Inspections. *Laboratory Animals*. 2020;54(4):373-385. <https://doi.org/10.1177/0023677219864616>.
93. Oliveira TA, Koakoski G, Motta AC, Piato AL, Barreto RE, Volpato GL, Barcellos LJG. Death-associated odors induce stress in zebrafish. *Hormones and Behavior*. 2014;65(4):340-344. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.02.009>.
94. Paciorek T, McRobert S. Daily Variation in the Shoaling Behavior of Zebrafish *Danio rerio*. *Current zoology*. 2012;58(1):129-137. <https://doi.org/10.1093/czoolo/58.1.129>.
95. Graham C, von Keyserlingk MAG, Franks B. Zebrafish Welfare: Natural History, Social Motivation and Behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*. 2018;200:13-22. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.11.005>.
96. Colwill RM, Creton R. Imaging Escape and Avoidance Behavior in Zebrafish Larvae. *Reviews in the Neurosciences*. 2011;22(1):63-73. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.008>.
97. Ali M K, Nicholson HL. Increasing Zebrafish (*Danio rerio*) Numbers in a Limited Tank Space Reduces Night-Time Fish Sleep-like State and Induces Aggressive Behaviour. *World Journal of Depression and Anxiety*. 2018;1(1):1003.
98. Hutter S, Hettzey A, Penn DJ, Zala SM. Ephemeral Sexual Dichromatism in Zebrafish (*Danio rerio*). *Ethology*. 2012;118(12):1208-1218. <https://doi.org/10.1111/eth.12027>.
99. Lidster K, Readman GD, Prescott MJ, Owen SF. International Survey on the Use and Welfare of Zebrafish *Danio rerio* in Research. *Journal of Fish Biology*. 2017;90(5):1891-1905. <https://doi.org/10.1111/jfb.13278>.
100. Stevens CH, Reed BT, Hawkins P. Enrichment for Laboratory Zebrafish - A Review of the Evidence and the Challenges. *Animals*. 2021;11(3):698. <https://doi.org/10.3390/ani11030698>.
101. Barcellos HHA, Koakoski G, Chaulet F, Kirsten KS, Kreutz LC, Kalueff AV, Barcellos LJG. The effects of auditory enrichment on zebrafish behavior and physiology. *PeerJ*. 2018;6:e5162. <https://doi.org/10.7717/peerj.5162>.
102. Marchetto L, Barcellos LJG, Koakoski K, Soares SM, Pompermaier A, Maffi VC, Costa R, Silva CG, Zorzi NR, Demin KA, Kalueff AV, Barcellos HHA. Auditory environmental enrichment prevents anxiety-like behavior, but not cortisol responses, evoked by 24-h social isolation in zebrafish. *Behavioural Brain Research*. 2021;404:113169. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113169>.
103. Esmail MY, Astrofsky KM, Lawrence C, Serluca FC. The Biology and Management of the Zebrafish. In: Fox JG, Anderson LC, Otto GM, Pritchett-Corning KR, Whary MT. *Laboratory Animal Medicine*. 3rd ed. London: Academic Press - Elsevier Inc.; 2015. p.1015-1062. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00020-1>.
104. Kent ML, Sanders JL, Spagnoli S, Al-Samarrie CE, Murray KN. Review of Diseases and Health Management in Zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822) in Research Facilities. *Journal of Fish Diseases*. 2020;43(6):637-650. <https://doi.org/10.1111/jfd.13165>.
105. Cantas L, Sørby JRT, Aleström P, Sørum H. Culturable Gut Microbiota Diversity in Zebrafish. *Zebrafish*. 2012;9(1):26-37. <https://doi.org/10.1089/zeb.2011.0712>.
106. Pressley ME, Phelan PE, Witten PE, Mellon MT, Kim CH. Pathogenesis and Inflammatory Response to *Edwardsiella tarda* Infection in the Zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology*. 2005;29(6):501-513. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.10.007>.
107. Lin B, Chen S, Cao Z, Lin Y, Mo D, Zhang H, Gu J, Dong M, Liu Z, Xu A. Acute Phase Response in Zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* Infection: Striking Similarities and Obvious Differences with Mammals. *Molecular Immunology*. 2007;44(4):295-301. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.03.001>.
108. Kanther M, Rawls JF. Host-Microbe Interactions in the Developing Zebrafish. *Current Opinion in Immunology*. 2010;22(1):10-19. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.006>.
109. Runft DL, Mitchell KC, Abuaita BH, Allen JP, Bajer S,

- Ginsburg K, Neely MN, Withey JH. Zebrafish as a Natural Host Model for *Vibrio cholerae* Colonization and Transmission. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014;80(5):1710-1717. <https://doi.org/10.1128/AEM.03580-13>.
110. Mitchell, KC, Breen P, Britton S, Neely MN, Withey JH. Quantifying *Vibrio cholerae* Enterotoxicity in a Zebrafish Infection Model. *Applied and Environmental Microbiology*. 2017;83(16):e00783-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00783-17>.
111. Rongrong L, Hu X, Lü A, Song Y, Lian Z, Sun J, Sung YY. Proteomic Profiling of Zebrafish Challenged by Spring Viremia of Carp Virus Provides Insight into Skin Antiviral Response. *Zebrafish*. 2020;17(2):91-103. <https://doi.org/10.1089/zeb.2019.1843>.
112. Beura, LK, Hamilton SE, Bi K, Schenkel JM, Odumade OA, Casey KA, Thompson EA, Fraser KA, Rosato PC, Filali-Mouhim A, Sekaly RP, Jenkins MK, Vezys V, Haining WN, Jameson SC, Masopust D. Normalizing the Environment Recapitulates Adult Human Immune Traits in Laboratory Mice. *Nature*. 2016;532(7600):512-516. <https://doi.org/10.1038/nature17655>.
113. Rosshart SP, Vassallo BG, Angeletti D, Hutchinson DS, Morgan AP, Takeda K, Hickman HD, McCulloch JA, Badger JH, Ajami NJ, Trinchieri G, Villena FP-M, Yewdell JW, Rehmann B. Wild Mouse Gut Microbiota Promotes Host Fitness and Improves Disease Resistance. *Cell*. 2017;171(5):1015-1028.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.016>.
114. Kanther M, Sun X, Mühlbauer M, MacKey LC, Flynn III EJ, Bagnat M, Jobin C, Rawls JF. Microbial Colonization Induces Dynamic Temporal and Spatial Patterns of NF-KB Activation in the Zebrafish Digestive Tract. *Gastroenterology*. 2011;141(1):197-207. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.03.042>.
115. Galindo-Villegas J, García-Moreno D, Oliveira S, Meseguer J, Mulero V. Regulation of Immunity and Disease Resistance by Commensal Microbes and Chromatin Modifications during Zebrafish Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(39):e2605-e2614. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209920109>.
116. Cheesman SE, Neal JT, Mittge E, Srednick BM, Guillemin K. Epithelial Cell Proliferation in the Developing Zebrafish Intestine Is Regulated by the Wnt Pathway and Microbial Signaling via Myd88. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(1):4570-4577. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000072107>.
117. Semova I, Carten JD, Stombaugh J, MacKey LC, Knight R, Farber SA, Rawls JF. Microbiota Regulate Intestinal Absorption and Metabolism of Fatty Acids in the Zebrafish Cell Host and Microbe. 2012;12(3):277-288. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.003>.
118. Davis DJ, Bryda EC, Gillespie CH, Ericsson AC. Microbial Modulation of Behavior and Stress Responses in Zebrafish Larvae. *Behavioural Brain Research*. 2016;311:219-227. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.05.040>.
119. Phelps D, Brinkman NE, Keely SP, Anneken EM, Catron TR, Betancourt D, Wood CE, Espenschied ST, Rawls JF, Tal T. Microbial Colonization Is Required for Normal Neurobehavioral Development in Zebrafish. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10517-5>.
120. Dobson GP, Letson HL, Biroš E, Morris J. Specific Pathogen-Free (SPF) Animal Status as a Variable in Biomedical Research: Have We Come Full Circle? *EbioMedicine*. 2019;41:42-43. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.038>.
121. Destoumieux-Garzón D, Mavingui P, Boetsch G, Boissier J, Darriet F, Duboz P, Fritsch C, Giraudoux P, Le Roux F, Morand S, Paillard C, Pontier D, Sueur C, Voituren Y. The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. *Frontiers in Veterinary Science*. 2018;5:article 14,1-13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00014>.
122. Zinsstag J, Schelling E, Waltner-Toews D, Tanner M. From 'One Medicine' to 'One Health' and Systemic Approaches to Health and Well-Being. *Preventive Veterinary Medicine*. 2011;101(3-4):148-56. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.07.003>.
123. WHO - World Health Organization, FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, OIE - World Organisation for Animal Health. *Taking a Multisectoral, One Health Approach: A Tripartite Guide to Addressing Zoonotic Diseases in Countries*. 2019. p.151.
124. Couto RM, Brandespim DF. A Review of the One Health Concept and Its Application as a Tool for Policy-Makers. *International Journal of One Health*. 2020;6(1):83-89. <https://doi.org/10.14202/IJOH.2020.83-89>.
125. Pace A, Dipineto L, Aceto S, Censullo MC, Valoroso MC, Varriale L, Rinaldi L, Menna LF, Fioretti A, Borrelli L. Diagnosis of *Centrocestus formosanus* Infection in Zebrafish (*Danio rerio*) in Italy: A Window to a New Globalization-Derived Invasive Microorganism. *Animals*. 2020;10(3):456. <https://doi.org/10.3390/ani10030456>.
126. Mesureur J, Vergunst AC. Zebrafish Embryos as a Model to Study Bacterial Virulence. In: Vergunst AC, O'Callaghan D. *Host-Bacteria Interactions Methods and Protocols*. 1st ed. New York: Humana Press; 2014. p. 41-66. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1261-2>.
127. Rosowski EE, Knox BP, Archambault LS, Huttenlocher A, Keller NP, Wheeler RT, Davis JM. The Zebrafish as a Model Host for Invasive Fungal Infections. *Journal of Fungi*. 2018;4(4):136. <https://doi.org/10.3390/jof4040136>.
128. Gomes MC, Mostowy S. The Case for Modeling Human Infection in Zebrafish. *Trends in Microbiology*. 2020;28(1):10-18. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.08.005>.
129. Pandey PK, Kass PH, Soupier ML, Biswas S, Singh VP. Contamination of Water Resources by Pathogenic Bacteria. *AMB Express*. 2014;4(1):1-16. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0051-x>.
130. Leclerc H, Schwartzbrod L, Dei-Cas E. Microbial Agents Associated with Waterborne Diseases. *Critical Reviews in Microbiology*. 2002;28(4):371-409. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046768>.
131. Oksanen KE, Myllymäki H, Ahava MJ, Mäkinen L, Parikka M, Rämetsä M. DNA Vaccination Boosts Bacillus Calmette-Guérin Protection against Mycobacterial Infection in Zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology*. 2016;54(1):89-96. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.09.001>.
132. Orujyan D, Narinyan W, Rangarajan S, Rangchaikul P, Prasad C, Saviola B, Venketaraman V. Protective Efficacy of BCG Vaccine against *Mycobacterium leprae* and Non-Tuberculous Mycobacterial Infections. *Vaccines*. 2022;10(3):390. <https://doi.org/10.3390/vaccines10030390>.
133. Hossain S, Silva BCJ, Dahanayake PS, Heo GJ. Characterization of Virulence Properties and Multi-Drug Resistance Profiles in Motile *Aeromonas* spp. Isolated from Zebrafish (*Danio rerio*). *Letters in Applied Microbiology*. 2018;67(6):598-605. <https://doi.org/10.1111/lam.13075>.

134. Chandrarathna HPSU, Nikapitiya C, Dananjaya SHS, Wijerathne CUB, Wimalasena SHMP, Kwun HJ, Heo GJ, Lee J, Zoysa MD. Outcome of Co-Infection with Opportunistic and Multidrug Resistant *Aeromonas hydrophila* and *A. veronii* in Zebrafish: Identification, Characterization, Pathogenicity and Immune Responses. *Fish and Shellfish Immunology*. 2018;80:573-81. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.049>.
135. Munoz-Price LS, Banach DB, Bearman G, Gould JM., Leekha S, Morgan DJ, Palmore TN, Rupp ME, Weber DJ, Wiemken TL. Isolation Precautions for Visitors. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2015;36(7):747-58. <https://doi.org/10.1017/ice.2015.67>.
136. Devlin RH, Sundstro LF, Muir WM. Interface of Biotechnology and Ecology for Environmental Risk Assessments of Transgenic Fish. *Trends in Biotechnology*. 2006;24(2):89-97. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.12.008>.
137. Magalhães ALB, Bezerra VS, Daga LAV, Pelicice FM, Vitule JRS, Brito MFG. Biotic Differentiation in Headwater Creeks after the Massive Introduction of Non-Native Freshwater Aquarium Fish in the Paraíba Do Sul River Basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*. 2021;19(03): e20014. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0147>.
138. Magalhães ALB, Brito MFG, Silva LGM. The Fluorescent Introduction Has Begun in the Southern Hemisphere: Presence and Life-History Strategies of the Transgenic Zebrafish *Danio rerio* (Cypriniformes: Danionidae) in Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 2022;1-13. <https://doi.org/10.1080/01650521.2021.2024054>.
139. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2018. Resolução da Diretoria Colegiada nº. 222, de 28 de março de 2018. Regulamenta as Boas Práticas de Gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. 2018; nº 61; seção 1; p. 76. Português.
140. CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 358 de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. 2005; nº 84, seção 1, p. 63-65. Português.
141. CTNBio, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. 2018. Resolução Normativa nº 18, de 23 de março de 2018. Dispõe sobre a classificação de riscos de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) e os níveis de biossegurança a serem aplicados nas atividades e projetos com OGM e seus derivados em contenção. *Diário Oficial da União*, 1-13. Português.
142. CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. Atualiza o texto da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. *Diário Oficial da União*. 2022; nº 192, seção 1, p. 10. Português.
143. Nowik N, Podlasz P, Jakimiuk A, Kasica N, Sienkiewicz W, Kaleczyc J. Zebrafish: An Animal Model for Research in Veterinary Medicine. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2015;18(3):663-674. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0086>.
144. Shive HR. Zebrafish Models for Human Cancer. *Veterinary Pathology*. 2013;50(3):468-82. <https://doi.org/10.1177/0300985812467471>.
145. Zhang Q, Dong X, Chen B, Zhang Y, Zu Y, Li W. Zebrafish as a Useful Model for Zoonotic *Vibrio parahaemolyticus* Pathogenicity in Fish and Human. *Developmental and Comparative Immunology*. 2016;55:159-68. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.10.021>.
146. Silveira CR, Varela Junior AS, Corcini CD, Soares SL, Anciuti AN, Kütter MT, Martínez PE. Effects of Bisphenol A on Redox Balance in Red Blood and Sperm Cells and Spermatic Quality in Zebrafish *Danio rerio*. *Ecotoxicology*. 2019;28(8):913-22. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02091-5>.
147. Almeida DV, Vaz B, Figueiredo MA, Varela Junior AS, Marins LF. Fluorescent Transgenic Zebrafish as a Biosensor for Growth-Related Effects of Methyl Parathion. *Aquatic Toxicology*. 2014;152:147-151. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.001>.
148. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. *Animais de Laboratório: Criação e Experimentação*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 2002. 388 p. Português. <http://books.scielo.org>.
149. Cruz JCA. Modelo de gestão em biotério convencional de produção de *Rattus norvegicus* de instituição de ensino superior privada brasileira. *Universitas Ciências da Saúde*. 2003; 01(02):343-362.
150. Fraser TWK, Khezri A, Jusdado JGH, Lewandowska-Sabat AM, Henry T, Ropstad E. Toxicant induced behavioural aberrations in larval zebrafish are dependent on minor methodological alterations. *Toxicology Letters*. 2017;276:62-68. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.05.021>.
151. Rodríguez I, Novoa B, Figueras A. Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2008;25(3):239-49. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.05.002>.
152. Zheng F, Asim M, Lan J, Zhao L, Wei S, Chen N, Liu X, Zhou Y, Lin L. Molecular cloning and functional characterization of mannose receptor in zebra fish (*Danio rerio*) during infection with *Aeromonas sobria*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(5):10997-11012. <https://doi.org/10.3390/ijms160510997>.
153. Hawke JP, Kent M, Rogge M, Baumgartner W, Wiles J, Shelley J, Savolainen LC, Wagner R, Murray K, Peterson TS. Edwardsiellosis caused by *Edwardsiella ictaluri* in laboratory populations of Zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Aquatic Animal Health*. 2013;25(3):171-83. <https://doi.org/10.1080/08997659.2013.782226>.
154. Scales BS, Dickson RP, Lipuma JJ, Huffnagle GB. Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014; 27(4):927-48. <https://doi.org/10.1128/CMR.00044-14>.
155. Moyer TR, Hunnicutt DW. Susceptibility of zebra fish *Danio rerio* to infection by *Flavobacterium columnare* and *F. johnsoniae*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2007;76:39-44. <https://doi.org/10.3354/DAO076039>.
156. Fogelson SB, Camus AC, Walter Lorenz W, Vasireddy R, Vasireddy S, Smith T, Brown-Elliott BA, Wallace Jr RJ, Hasan NA, Reischl U, Sanchez S. Variation among human, veterinary and environmental *Mycobacterium chelonae*-abscessus complex isolates observed using core genome phylogenomic analysis, targeted gene comparison, and anti-microbial susceptibility patterns. *PLoS One*. 2019;14(3):e0214274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214274>.
157. Shah MK, Sebti A, Kiehn TE, Massarella SA, Sepkowitz KA. *Mycobacterium haemophilum* in Immuno compromised Patients. *Clinical Infectious Diseases*. 2001;33(3):330-337. <https://doi.org/10.1086/321894> <https://academic.oup.com/cid/article/33/3/330/277298>.
158. Crim MJ, Lawrence C, Livingston RS, Rakitin A, Hurley SJ, Riley LK. Comparison of antemortem and environmental

- samples for zebrafish health monitoring and quarantine. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2017;56(4):412-424. PMID: PMC5517331.
159. Cosma CL, Swaim LE, Volkman H, Ramakrishnan L, Davis JM. Zebrafish and frog models of *Mycobacterium marinum* infection. *Current Protocols in Microbiology*. 2006;10B.2(Supplement3):10B.2.1-10B.2.33. <https://doi.org/10.1002/0471729256.mc10b02s3>.
160. Linbo TL. Zebrafish (*Danio rerio*) husbandry and colony maintenance at the Northwest Fisheries Science Center. U.S. Dept. Commer., NOAA Tech. Memo. NMFS-NWFSC-100; 2009. 62p. <https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/3645>.
161. Casebolt DB, Speare DJ, Horney BS. Care and Use of Fish as Laboratory Animals: Current State of Knowledge. *Laboratory Animal Science*. 1998;48(2):124-36. PMID: 10090003.
162. Jørgensen LG. Infection and immunity against *Ichthyophthirius multifiliis* in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*. 2016;1(57):335-339. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.042>.
163. Alavinia SJ, Mirzargar SS, Rahmati-Holasoo H, Mousavi HE. The *in vitro* and *in vivo* effect of tannic acid on *Ichthyophthirius multifiliis* in zebrafish (*Danio rerio*) to treat ichthyophthiriasis. *Journal of Fish Diseases*. 2018;41(12):1793-1802. <https://doi.org/10.1111/jfd.12886>.
164. Astrofsky KM, Schech JM, Sheppard BJ, Obenschain CA, Chin AM, Kacergis MC, Laver ER, Bartholomew JL, Fox JG. High Mortality Due to *Tetrahymena* sp. Infection in Laboratory-Maintained Zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Comparative Medicine*. 2002;52(4):363-367. PMID: 12211282.
165. Whipps CM, Murray KN, Kent ML. Occurrence of a myxozoan parasite *Myxidium streisingeri* n. sp. in laboratory zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Parasitology*. 2015;101(1):86-90. <https://doi.org/10.1645/14-613.1>.
166. Sanders JL, Peterson TS, Kent ML. Early Development and Tissue Distribution of *Pseudoloma neurophilia* in the Zebrafish, *Danio rerio*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2014;61(3):238-46. <https://doi.org/10.1111/jeu.12101>.
167. Caballero-Huertas M, Soto M, Ribas L. Reviewing *Pseudoloma neurophilia* infections in the popular zebrafish model. *Reviews in Aquaculture*. 2021;13(4):1816-27. <https://doi.org/10.1111/raq.12545>.
168. Ortega C, Fajardo R, Enríquez R. Trematode *Centrocestus formosanus* infection and distribution in ornamental fishes in Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health*. 2009;21(1):18-22. <http://dx.doi.org/10.1577/H07-022.1>.
169. Wanlop A, Wongsawad C, Prattapong P, Wongsawad P, Chontanarath T, Chai JY. Prevalence of *Centrocestus formosanus* metacercariae in ornamental fish from Chiang Mai, Thailand, with molecular approach using ITS2. *Korean Journal of Parasitology*. 2017;55(4):445-449. <https://doi.org/10.3347/kjp.2017.55.4.445>.
170. Iaria C, Migliore S, Macri D, Bivona M, Capparucci F, Gaglio G, Marino F. Evidence of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) in Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*. 2019;16(6):522-526. <https://doi.org/10.1089/zeb.2019.1744>.
171. Kent ML, Bishop-Stewart JK, Matthews JL, Spitsbergen JM. *Pseudocapillaria tomentosa*, a nematode pathogen, and associated neoplasms of zebrafish (*Danio rerio*) kept in research colonies. *Comparative Medicine*. 2002;52(4):354-358. PMID: 12211280.
172. Maley D, Laird AS, Rinkwitz S, Becker TS. A simple and efficient protocol for the treatment of zebrafish colonies infected with parasitic nematodes. *Zebrafish*. 2013;10(3):447-450. <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0868>.
173. Binesh CP. Mortality due to viral nervous necrosis in zebrafish *Danio rerio* and goldfish *Carassius auratus*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2013;104(3):257-260. <https://doi.org/10.3354/dao02605>.
174. Bermúdez R, Losada AP, de Azevedo AM, Guerra-Varela J, Pérez-Fernández D, Sánchez L, Padrós F, Nowak B, Quiroga MI. First description of a natural infection with spleen and kidney necrosis virus in zebrafish. *Journal of Fish Diseases*. 2018;41(8):1283-1294. <https://doi.org/10.1111/jfd.12822>.
175. Igbinsosa IH, Igumbor EU, Aghdasi F, Tom M, Okoh AI. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *The Scientific World Journal*. 2012;625023. <https://doi.org/10.1100/2012/625023>.
176. Li S, Jiang C, Chen H, Zhang L, Ke L, Chen X, Lin C. Pre-injection of Zebrafish (*Danio rerio*) tnf α Polyclonal Antibody Decreases the Mortality of *Vibrio vulnificus* Infected Zebrafish. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021;8:article 741242,1-9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.741242>.