

**IMPLEMENTAÇÃO DE UM NOVO MODELO DE
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - ZEBRAFISH**

**IMPLEMENTATION OF A NEW EXPERIMENTAL ANIMAL
MODEL - ZEBRAFISH**

Ana Cláudia Reis Schneider¹, Jorge Luiz dos Santos¹, Marilene Porawski², Pedro Guilherme Schaefer³,
Rafael Lucyk Maurer¹, Ursula Matte⁴, Themis Reverbel da Silveira¹

RESUMO

O *Danio rerio* (zebrafish, paulistinha) é um pequeno peixe de água-doce, que vem sendo utilizado como modelo de animal para o estudo de numerosas doenças humanas. A sua facilidade de manutenção e reprodução e os métodos laboratoriais para sua criação já estão bem estabelecidos. Sua manutenção requer alguns cuidados básicos e a compra de equipamentos específicos, porém estes são de baixo custo. Este peixe é considerado um bom modelo para o estudo de doenças humanas, pode servir como uma relevante plataforma para estudo de eventos moleculares, estratégias terapêuticas e avaliação dos mecanismos fisiológicos de algumas patologias. O Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG), do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, iniciou em 2008 estudos na área da Hepatologia com o *Zebrafish*, aqui apresentados.

Unitermos: Zebrafish; danio rerio; modelo animal

ABSTRACT

Danio rerio (zebrafish, paulistinha) is a freshwater small fish that has been used as an animal model for studies of several human diseases. Its characteristics of being easily bred and reproduced and its laboratory housing methods are well established. It requires some basic care and the acquisition of specific low-cost equipment. Since this fish has already been considered a good human disease model, it may serve as a powerful preclinical platform for the study of molecular events, therapeutic strategies, and for evaluating the physiological mechanisms of some pathologies. The Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology (LEHG) of the Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre initiated studies with the zebrafish in 2008, presented here.

Keywords: Zebrafish; danio rerio; animal model

Rev HCPA 2009;29(2):100-103

O *Danio rerio* (Hamilton, 1822) conhecido popularmente como *zebrafish* ou paulistinha (figura 1), pertence à família Cyprinidae e é um pequeno peixe teleosteo (3 – 4 cm) de água-doce, que vem sendo utilizado como animal de experimentação para o estudo de numerosas doenças humanas. O seu manejo, a facilidade de reprodução e de manutenção, e os métodos laboratoriais para sua criação já estão bem estabelecidos (1). Em geral, os peixes utilizados em pesquisa laboratorial são de pequeno porte, de forma que se pode montar um vivário em espaços reduzidos. Além disto, os animais podem ser mantidos em grupos relativamente grandes por aquário. Sua manutenção requer alguns cuidados básicos e a compra de equipamentos específicos, porém estes são de baixo custo quando comparados com os exigidos por animais experimentais mais tradicionais, como roedores. Os peixes consomem, proporcionalmente, menos ração que mamíferos, o que reduz os gastos com alimentação (2).



Figura 1 - *Danio rerio* (zebrafish ou paulistinha)

Um grande interesse na pesquisa com o *zebrafish* é o seu uso para determinação das mutações e identificação de genes funcionalmente importantes. Por isso, uma das suas principais vantagens apóia-se no fato de seu genoma haver sido inteiramente sequenciado e de possuir homólogos em mamíferos (2). Instrumentos para a sua manipulação genética já estão disponíveis e oferecem um grande leque

1. Pediatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

2. Fisiologia, UFRGS, Laboratório de Hepatologia Experimental – Fisiologia, Centro de Pesquisas, HCPA.

3. Patologia Cirúrgica, UFRGS, Laboratório de Patologia Cirúrgica, Centro de Pesquisas, HCPA.

4. Centro de Terapia Gênica, Centro de Pesquisas, HCPA e Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, UFRGS.

Contato: Themis Reverbel da Silveira. E-mail: themisrs@terra.com.br (Porto Alegre, RS, Brasil)

de possibilidades para a pesquisa dos fenótipos produzidos por determinadas mutações. Podem ser observadas mutações causadas por agentes químicos específicos (3), poluentes (4), vírus (5) e células cancerígenas (6). No momento, existe significativa documentação científica das mutações que já foram observadas (7,8). A pesquisa utilizando tais mutantes tem sido focada nos aspectos de desenvolvimento embrionário, pois o embrião e a larva são transparentes, o que permite um detalhamento anatômico apurado. Além da análise de fenótipos mutantes, estuda-se o silenciamento genético pelo uso de RNA de interferência (RNAi), denominado “morfolino” no caso do *zebrafish*, por meio do qual são produzidas alterações fenotípicas por alteração dos mecanismos de transcrição gênica (9).

Nas áreas da Hepatologia e da Gastroenterologia, a possibilidade de visualização dos processos da embriogênese pode proporcionar a determinação de uma variedade de defeitos nas funções dos sistemas gastrointestinal e hepato-biliar. Foram identificadas mutações causadas por agentes hepatotóxicos (10,11) e determinada a expressão genética de diversas proteínas no fígado (12).

O Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG), do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, iniciou estudos na área da Hepatologia com o *zebrafish*. A aplicação de fármacos e substâncias tóxicas, o silenciamento de genes e a observação do desenvolvimento embrionário sob a ação de diferentes métodos abrem um campo de pesquisa inestimável na utilização deste modelo experimental em nosso laboratório.

MÉTODO DE CRIAÇÃO

Utilizamos o método previamente descrito por Westerfield (1) na implementação do criatório dos peixes. Os peixes adultos são criados em aquários de 50 litros, com ciclo de luz de 14 horas e alimentados com ração específica, 2 vezes ao dia. O ciclo claro-escuro é garantido por temporizadores que ligam e desligam automaticamente as luzes dos aquários. No fundo de um dos aquários, deposita-se uma bandeja com bolas de vidro para coleta dos ovos produzidos e nesta mesma bandeja são fixadas plantas artificiais indispensáveis para o acasalamento dos animais e desova. O objetivo das bolas de vidro é impedir que os peixes se alimentem dos ovos fecundados. A temperatura ideal para os peixes, entre 26°C e 28°C, é mantida por termostato.

A limpeza do aquário é realizada por meio da troca quinzenal de 1/3 do total da água do aquário. As paredes são higienizadas, conforme necessidade, com esponja. Juntamente com a limpeza é realizada a manutenção do ambiente

aquático com dosagens dos parâmetros de controle: pH e presença de nitritos, amônia e oxigênio dissolvidos.

Os peixes são adquiridos em lojas de aquarismo de Porto Alegre e passam por um período de quarentena ao chegarem em nosso laboratório de criação, localizado na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA. A quarentena tem como objetivo identificar peixes doentes ou contaminados por fungos ou parasitos e descartá-los. Cerca de duas semanas antes dos peixes serem definitivamente alocados nos aquários do laboratório são realizados os preparos do ambiente ideal para criação dos peixes: a água do aquário deve ser declorada, pois o cloro provoca a morte dos peixes, e constantemente aerada a fim de permitir as trocas gasosas (figura 2).



Figura 2 - Foto do aquário no laboratório dentro da UEA (Unidade de Experimentação Animal).

O sistema de filtragem é composto por três tipos de filtro: biológico, para o crescimento da microbiota própria do aquário; químico, com carvão ativado para a retirada das toxinas; e mecânico, para retirar restos de ração e produtos excretados pelos animais. O carvão ativado é mensalmente trocado, a fim de manter a água sempre purificada. Para manutenção de um ambiente ideal para a criação dos peixes, alguns cuidados devem ser tomados e a constância do pH adequado da água é um deles. Neste caso, o ideal é 6,8. Quando há um desequilíbrio do pH, a correção é realizada com agentes para alcalinizar ou acidificar a água até a obtenção do nível adequado. Todos os parâmetros para a manutenção de um ambiente adequado para os peixes do laboratório são periodicamente verificados (Quadro 1).

Quadro 1 - Recomendações para a manutenção do ambiente aquático para o *Zebrafish*.

Parâmetro	Recomendado
Densidade do estoque	< 7 peixes/l
Iluminação	12 – 14 h/dia
Temperatura	26 - 28 °C
pH	6,8 – 7,5
Alcalinidade	50 – 100 mg/l de CaCO ₃
Amônia	< 0,02 mg/l
Nitrito	< 0,1 mg/l
Oxigênio dissolvido	6,0 mg/l - saturação

ESTUDOS EM DESENVOLVIMENTO COM O ZEBRAFISH NO LEHG

Estudo anatômico

Os estudos que serviram como base teórica para o estudo anatômico do *zebrafish* no LEHG foram os de Bryson-Richardson e de Sprague (13,14). A fim de estudarmos a anatomia e criarmos um banco de imagens, peixes adultos foram individualmente emblocados em parafina, segundo técnica previamente descrita (15), para cortes seriados. Os cortes foram de 5 µm, distando 95 µm entre si, incluindo cada peixe em sua dimensão completa. As amostras foram coradas com hematoxilina e eosina e as lâminas foram elaboradas sob a supervisão de um patologista do Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas do HCPA.

O estudo anatômico visou: a) identificar as estruturas hepatobiliares, localizando-as, do ponto de vista macroscópico, no peixe adulto; b) caracterizar, do ponto de vista microscópico, as diferentes estruturas hepatobiliares; c) montagem da biblioteca de imagens da estrutura do *zebrafish*.

Montagem da biblioteca de imagens do Zebrafish

As imagens dos cortes sagitais, expostas em lupa no aumento de 32x, foram inicialmente capturadas com câmera digital (Sony, DSC-S650), visando obter uma imagem completa de cada corte para a avaliação das inter-relações anatômicas (figura 3). A seguir foram capturadas imagens das estruturas hepatobiliares destes cortes no microscópio óptico (Olimpus BX51), em aumento de 200X, utilizando o programa ImagePro Express, em formato TIFF (*tag image format*). Imagens dos cortes transversais foram capturadas e gravadas a partir do microscópio segundo este último método (figura 4).

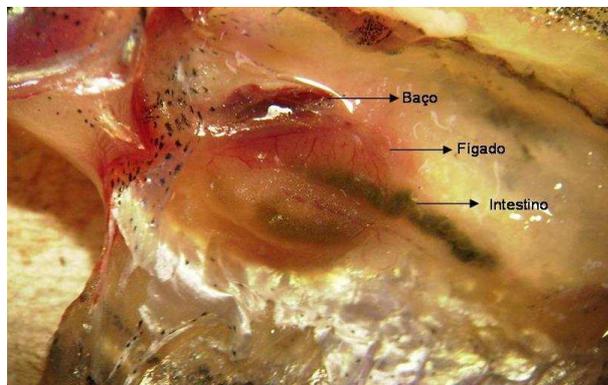


Figura 3 - Foto macroscópica do fígado do *Zebrafish*

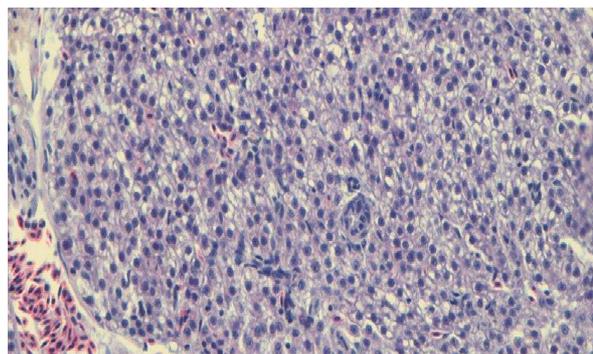


Figura 4 - Imagem microscópica mostrando os hepatócitos (corados com hematoxilina-eosina) do *Zebrafish*

Indução de esteatose hepática por administração intraperitoneal de tioacetamida

Este estudo, em andamento, foi aprovado no Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação sob o número 08-677 com suporte do FIPE/HCPA e tem como objetivos: a) reproduzir o modelo de esteatose hepática em *zebrafish* utilizando tioacetamida, b) determinar o tempo de administração da droga necessário para o desenvolvimento completo da doença e c) caracterizar a esteatose hepática utilizando marcadores histoquímicos e moleculares específicos.

Estudo morfométrico e histológico dos fígados de Zebrafish expostos cronicamente ao álcool

Este estudo está sendo desenvolvido em conjunto com pesquisadores (Diogo Souza, Renato Dutra Dias, Denis Brook Rosemberg, Carla Denise Bonan, Maurício Reis Bogo e Eduardo Pacheco Rico) do Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia da Pontifícia Universidade Católica (PUC-RS) e Instituto de Bioquímica (UFRGS). Estes pesquisadores têm larga experiência com o *zebrafish* (16,17) e conduzem experimentos com álcool a fim de observar seus efeitos deletérios no cérebro (18, 19). O objetivo de nossa parceria é determinar a ocorrência de doença hepática nos peixes cronicamente expostos ao álcool.

CONCLUSÃO

Em resumo, a pesquisa utilizando o *zebrafish* como modelo animal tem como principais vantagens o baixo custo e facilidade de manutenção, além disso, o seu tamanho facilita o manejo em pequenos espaços. Com novas tecnologias sendo desenvolvidas, o estudo com este peixe pode melhorar significativamente a compreensão do desenvolvimento de patologias e proporcionar estratégias para tratamento das

mesmas. Neste sentido, a implantação deste modelo no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA torna esta instituição apta a contribuir com o avanço do conhecimento nesta área e oferece uma nova alternativa nos estudos em modelos animais.

REFERÊNCIAS

1. Westerfield M The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of the zebrafish (*Danio rerio*). Eugene. OR: University of Oregon, Institute of Neuroscience, 1994.
2. Briggs JP. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 2002;282(1):R3 – 9.
3. Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*. 2005; 86(1):6-19.
4. Kosmehl T, Hallare AV, Braunbeck T, Hollert H. DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. *Mutat Res*. 2008;650(1):1-14.
5. Sivasubbu S, Balciunas D, Amsterdam A, Ekker SC. Insertional mutagenesis strategies in zebrafish. *Genome Biology*. 2007;8(1):S9 1-9
6. Feistsma H, Cuppen E. Zebrafish as a cancer model. *Mol Cancer Res*. 2008;6(5):685-94.
7. Sadler KC, Amsterdam A, Soroka C, Boyer J, Hopkins N. A genetic screen in zebrafish identifies the mutants vps 18, nf2 and foie gras as models of liver disease. *Development*. 2005;132:3561-72.
8. Her GM, Yeh YH, Wu JL. 435-bp Liver Regulatory Sequence in the Liver Fatty Acid Binding Protein (L-FABP) Gene is sufficient to modulate liver regional expression in transgenic zebrafish. *Developmental Dynamics* 2003; 227(3):347-56.
9. Nasevicius A. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature America* 2000; 26:216-20.
10. Seok SH, Back MW, Lee HY, Kim DJ, Na YR, Noh KJ, Park SH, Lee HK, Lee BH, Ryu DY, Park JK. Arsenite-induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line. *Toxicol in vitro* 2007; 870-7.
11. Amali AA, Recka RD, Lin CJF, Wang WL, Gong HY, Her GM, Wu JL. Thioacetamide induced liver damage in zebrafish embryo as a disease model for steatohepatitis. *J Biomed Sci* 2006; 13:225-32.
12. Reckha RD, Amali AA, Her GM, Yeh YH, Gong HY, Hu SY, Wu JL. Thioacetamide accelerates steatohepatitis, cirrhosis and HCC by expressing HCV core protein in transgenic zebrafish *Danio rerio*. *Toxicology*. 2008;243:11-22.
13. Bryson-Richardson RJ, Berger S, Schilling TF, Hall TE, Cole NJ, Gibson AJ, Sharpe J, Currie PD. Fishnet: an online database of zebrafish anatomy. *BMC Biol*. 2007; 5:1-8.
14. Sprague J, Bayraktaroglu L, Clements D, Conlin T, Fashena D, Frazer K, Haendel M, Howe DG, Mani P, Ramachandran S, Schaper K, Segerdell E, Song P, Sprunger B, Van Slyke CE, Taylor S, Westerfield M. The Zebrafish Information Network: The zebrafish model organism database. *Nucleic Acid Res*. 2006;1:34.
15. Sabaliuskas NA, Foutz CA, Mest JR, Budgeon LR, Sidor AT, Gershenson JA, Joshi SB, Cheng KC. High-throughput zebrafish histology. *Methods*. 2006; 39:246-54.
16. Senger Mr, Rico EP, de Bem Arizi M, rosemberg DB, Dias RD, Bogo Mr, Bonan CD. Carbofuran e malathion inhibit nucleotide hidrolisis in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Toxicology*. 2005;212(2-3):107-15.
17. Rico EP, Senger MR, Fauth M da G, Dias RD, Bonan CD. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of Zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci*. 2003;73(16):2071-82.
18. Rico EP, Rosemberg DB, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicol Lett* 2007;174(1-3):25-30.
19. Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, de Bem Arizi M, Dias RD, Souto AA, Bogo MR, Bonan CD. Ethanol and acetaldehyde alter NTPDase and 5'-nucleotidase from zebrafish brain membranes. *Neurochem Int*. 2008;52(1-2):290-6.

Recebido: 14/03/2009

Aceito: 08/08/2009