

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

**CULTIVO, REPRODUÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO
COM *Danio rerio*: PADRONIZAÇÃO DE PRÁTICAS
NO LABORATÓRIO DE
BIOEXPERIMENTAÇÃO/CEUNES/UFES**

IAN GUIMARÃES DE ARAÚJO

**São Mateus/ES
Março de 2025**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

**CULTIVO, REPRODUÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO
COM *Danio rerio*: PADRONIZAÇÃO DE PRÁTICAS
NO LABORATÓRIO DE
BIOEXPERIMENTAÇÃO/CEUNES/UFES**

IAN GUIMARÃES DE ARAÚJO

Monografia de conclusão de curso
apresentada ao Curso de Ciências Biológicas
da Universidade Federal do Espírito Santo,
como requisito parcial para obtenção do título
de BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Orientador: Prof. Me. Matheus Santos Costa

Coorientador: Prof. Dr. Rogerio Oliveira Faleiros

**São Mateus/ES
Março de 2025**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: **Ian Guimarães de Araújo**

Título: **Cultivo, Reprodução e Experimentação com *Danio rerio*:
Padronização de Práticas no Laboratório de
Bioexperimentação/Ceunes/UFES**

Monografia do Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado)
Defendida e aprovada em 20/03/2025

Documento assinado digitalmente



MATHEUS SANTOS COSTA
Data: 25/03/2025 16:09:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Me. Matheus Santos Costa

Orientador e presidente da Comissão Examinadora

Documento assinado digitalmente



PAOLA ROCHA GONCALVES
Data: 26/03/2025 10:42:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Paola Rocha Gonçalves

Examinador 1

Documento assinado digitalmente



PEDRO VICTOR DE CARVALHO COSTA
Data: 25/03/2025 15:12:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Me. Pedro Víctor de Carvalho Costa

Examinador 2

DEDICATÓRIA

Dedico a minha mãe, Elenir Lopes Guimarães, que em tudo me apoiou e não poupou esforços para realização desse sonho. Amo você.

AGRADECIMENTOS

Assim como dedico, também agradeço primeiramente a minha mãe, que foi e sempre será uma pessoa de grande inspiração, sem você eu não teria nada.

Agradeço aos meus orientadores, Rogerio Faleiros, Juliana Castro e Matheus Costa, responsáveis por me levar ao aprendizado investigativo e me dar auxílio nas pesquisas e estudos. Em especial ao Rogerio que me deu oportunidade e acolhimento quando eu mais precisei.

Agradeço aos meus amigos Lara, Otavio, Jasmyn, Savia, Larissa, Matheus, Renata, Will, Marrane, Elisa, Janilto, Amora, Fumaça, Pedro que me apoiaram e me mostraram que eu era capaz e competente para realização desse projeto e se alegraram comigo com a finalização dele. Sempre se mostraram como abrigo para consolo e ajuda nos momentos difíceis. Sem esse apoio eu não teria conseguido.

Aos meus amigos da Ufes, Thiago, Izabella, Rafael, Marcos, Piter, Matheus, Brissia e Marcela que sempre me divertiam e me traziam bons momentos de alegria e descontração, todo amor a vocês.

Aos meus companheiros de laboratório Otavio, André, Carol, Carolzinha, Sibeli, Heloisa, Luiza e Lorryne. Foi um prazer imenso dividir esse espaço de trabalho com vocês, obrigado pelos aprendizados, perrengues e conquistas, sem vocês tudo seria mais difícil.

As meninas que monitorei no PICJr. Sara, Roberta, Yasmin, Maria Vitoria e Alice. Queridas, alegres e animadinhas me ajudaram e muito nesse espaço e vivência de biotério.

À Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de vivenciar tudo o que se passou nesses anos, pelas bolsas recebidas, pelos professores que conheci e pelo aprendizado recebido. Em especial as professoras Karina Mancini e Paola Rocha, coordenadoras dos projetos de ensino em Biologia Celular e Bioquímica, que me mostraram uma pequena parte do caminho do ensino e me despertaram para um novo sonho, vocês foram luz para mim.

A todas as pessoas que fizeram parte desse caminho longo e muitas vezes sofrido, mas que valeu a pena

RESUMO

O peixe-zebra ou *zebrafish* (*Danio rerio*) tem se consolidado como modelo experimental em diversas áreas de pesquisa devido às suas características biológicas e genéticas favoráveis. Este trabalho tem como objetivo apresentar a padronização dos processos de cultivo, reprodução e o teste de embriotoxicidade utilizando o peixe-zebra no Laboratório de Bioexperimentação (LaBex) do Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas (DCAB) da Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes), campus São Mateus. Para tanto, foi realizada uma análise documental das diretrizes nacionais e internacionais sobre boas práticas laboratoriais, além da implementação de um protocolo técnico para a manutenção da espécie no LaBex/DCAB/Ufes. O estudo abordou aspectos como infraestrutura, qualidade da água, alimentação, biossegurança e enriquecimento ambiental, visando garantir a reprodutibilidade dos experimentos e o bem-estar animal. Como resultado, foi elaborado um guia técnico detalhado para a criação de *zebrafish* no LaBex, além do desenvolvimento e otimização de um protocolo de teste de embriotoxicidade baseado em metodologias padronizadas. O desenvolvimento de procedimentos, em conformidade com regulamentações científicas e éticas, e adaptados à realidade do LaBex/DCAB/Ufes, contribuirá significativamente para a implementação de uma Unidade de Monitoramento Ecotoxicológico e Ambiental, associado ao Núcleo de Estudos em Ecofisiologia Animal da Ufes, utilizando *zebrafish* como modelo para estudos ecotoxicológicos.

Palavras-chave: zebrafish, biotério, reprodução, embriotoxicidade.

ABSTRACT

Zebrafish (*Danio rerio*) has been established as an experimental model in various research fields due to its favorable biological and genetic characteristics. This study aims to standardize the cultivation, reproduction, and embryotoxicity testing using zebrafish at the Laboratory of Bioexperimentation (LaBex) of the Department of Agricultural and Biological Sciences (DCAB) at the Federal University of Espírito Santo (Ufes), São Mateus campus. To achieve this, a documentary analysis of national and international guidelines on good laboratory practices was conducted, along with the implementation of a technical protocol for the maintenance of the species at LaBex/DCAB/Ufes. The study addressed aspects such as infrastructure, water quality, feeding, biosafety, and environmental enrichment to ensure the reproducibility of experiments and animal welfare. As a result, a detailed technical guide for zebrafish breeding at LaBex was developed, along with the development and optimization of an embryotoxicity testing protocol based on standardized methodologies. The development of procedures in compliance with scientific and ethical regulations, adapted to the reality of LaBex/DCAB/Ufes, will significantly contribute to the implementation of an Ecotoxicological and Environmental Monitoring Unit, associated with the Animal Ecophysiology Research Center at Ufes, using zebrafish as a model for ecotoxicological studies.

Keywords: zebrafish, vivarium, reproduction, embryotoxicity.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1 – LEGISLAÇÃO	4
INTRODUÇÃO.....	4
OBJETIVOS.....	6
Objetivo Geral	6
Objetivos Específicos	6
MATERIAL E MÉTODOS.....	7
RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
CAPÍTULO 2 – GUIA DE BOAS PRÁTICAS	11
INTRODUÇÃO.....	11
OBJETIVOS.....	12
Objetivo geral	12
Objetivos específicos.....	12
MATERIAL E METODOS.....	13
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	16
Infraestrutura laboratorial	16
Aspectos éticos	17
Fotoperíodo.....	18
Origem dos animais.....	19
Fornecimento água	19
Aquários	21
Enriquecimento Ambiental.....	24
Limpeza e Filtração	25
Alimentação.....	27
Cultivo de <i>Artemia salina</i>	28
Cultivo de <i>Panagrellus redivivus</i>	29
Cultivo de <i>Paramecium</i>	31

Qualidade da água	32
Compostos Nitrogenados.....	35
Biossegurança.....	37
Eutanásia.....	38
Descarte	39
ANEXO I.....	41
ANEXO II	48
ANEXO III.....	49
ANEXO IV	51
CAPÍTULO 3 – REPRODUÇÃO	52
INTRODUÇÃO.....	52
MATERIAL E METODOS.....	53
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	54
Dimorfismo sexual	54
Comportamento reprodutivo	54
Desenvolvimento embrionário	55
Reprodução em biotério.....	57
ANEXO V	62
ANEXO VI.....	72
CAPÍTULO 4 - BIOEXPERIMENTAÇÃO	73
INTRODUÇÃO.....	73
MATERIAL E METODOS.....	75
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	76
ANEXO VII.....	79
CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS	85

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros da água provinda do poço artesiano. Fonte: autor.	20
Tabela 2 - Parâmetros a serem medidos, periodicidade, faixa a aceitável e ação corretiva a ser realizada para o cultivo de D. rerio nos sistemas da circulação e aquários individuais. Fonte: autor.	36
Tabela 4 - Referências dos parâmetros para a reprodução:	62
Tabela 5- Regime alimentar das matrizes reprodutoras.....	64
Tabela 6 - Condições de acomodação e alimentação de ovos, larvas e juvenis de D. rerio.	71

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1 - (a) Corredor de acesso ao biotério com divisórias de MDF o tampando completamente, sala com divisória na altura da porta e porta de entrada/saída ao fundo; (b) Porta de entrada/saída do Laboratório de Ecofisiologia Animal e porta semi-aberta de entrada para o Laboratório de Bioexperimentação. Fonte: autor	16
Figura 2 – (a) Timer analógico com tomada para controle do fotoperíodo; (b) Filtro de linha onde estão ligadas as lâmpadas de LED, vista ao fundo. Fonte: autor.....	19
Figura 3 - Testes de parâmetros da água Labcon (dureza em carbonatos, dureza total, nitrito, amônia, O ₂ dissolvido e pH) e Alcalinizante Labcon. Fonte: autor.....	21
Figura 4- - Sistema de recirculação de água do Laboratório de Bioexperimentação/Ufes campus São Mateus. Seta azul indicando o <i>Sump</i> , onde a bomba impulsiona água para os aquários de vidro (setas vermelhas), em que estão os peixes adultos (linhagem FK nos aquários a direita e linhagem <i>Kauar</i> no aquário a esquerda), e para os aquários <i>ZebClean</i> , com peixes de linhagem FK juvenis (aquário a esquerda e central) e um casal adulto (a direita). Seta cinza apontando para o aquário de cerâmica, onde se localizam os aquecedores e a água é direcionada ao <i>Sump</i> . Fonte: autor.....	22
Figura 5- Peixes juvenis em aquário <i>ZebClean/Alesco</i> . Fonte: autor.....	23
Figura 6- Aquários com peixes e enriquecimento ambiental representado pelos canos de PVC (setas verdes), plantas artificiais no fundo (setas vermelhas) e flutuantes (setas azuis). Fonte: autor.....	24
Figura 7- Sump do sistema de recirculação do Laboratório de Bioexperimentação/DCAB/Ceunes/Ufes campus São Mateus. Filtro mecânico para retenção de partículas grandes, indicado por seta vermelha no primeiro compartimento. Ainda no primeiro compartimento e no segundo, setas azuis indicam o biofiltro de compostos nitrogenados, seguido da terceira subdivisão, onde está o filtro químico (setas verdes), em que pequenas partículas se aderem nos poros do carvão ativado. Por fim, o quarto compartimento com a bomba de recalque, responsável por impulsionar a água para o filtro UV (seta preta) e para os aquários. Fonte: autor	26
Figura 8 - Alimentador automático disposto em aquário de vidro no LaBex/DCAB/Ceunes/Ufes. Fonte: autor.....	28
Figura 9 – (a) Artemeira em utilização, com aeração e iluminação; (b) Pacote de cistos de artêmias vendido comercialmente. Fonte: autor.....	29
Figura 10 – Culturas de microverme em potes de vidro tapados com elástico e perlon. Fonte: autor.....	30

Figura 11- Cultivos de <i>Paramecium</i> em Erlenmeyer tampado por elástico e prelon, Fonte: autor	31
Figura 12 - Aquário de cerâmica com aquecedores (setas brancas) e uma caixa de mídias siporax (seta preta). Fonte: autor	33
Figura 13 - Sistema de criação com recirculação de água. Fonte: autor	43
Figura 14 - <i>Zebrafish</i> macho com corpo esguio a esquerda, sinalizado por seta vermelha, e fêmea com protuberância ventral a direita, sinalizado por seta verde. Fonte: autor	54
Figura 15 - Ovos em placa de Petri a esquerda na figura a; vista sob lupa (4x) de um ovo recém fertilizado na figura b. Fonte: autor.	55
Figura 16 – Embriões de <i>Danio rerio</i> (A) Após a fertilização, ocorre a primeira divisão celular. O zigoto apresenta o polo animal na região superior e o polo vegetal ocupando a maior parte inferior da célula; (B) Fase de clivagem, caracterizada pela ocorrência de 2 a 7 ciclos celulares rápidos e sucessivos; (C) Fase de blástula oblonga, na qual ocorrem de 8 a 9 ciclos celulares, com o início do processo de epibolia; (D) Fase de blástula esférica, também com 8 a 9 ciclos celulares; (E) Fase de gástrula, estágio em que têm início os movimentos morfogênicos de involução, convergência e extensão, que levam à formação do epiblasto, hipoblasto e do eixo embrionário, finalizando o processo de epibolia; (F) Fase de segmentação inicial (1 somito), marcada pelo início do desenvolvimento dos somitos, dos primórdios dos arcos branquiais e dos neurômeros; (G) Fase de segmentação avançada (14 somitos), com formação de estruturas embrionárias mais definidas; (H) Fase de eclosão no estágio long-pec sob vista dorsal, quando os principais sistemas de órgãos já estão formados e se observa o desenvolvimento da cartilagem cefálica e das nadadeiras peitorais. Fonte: Modificado de Quintaneiro et al., 2022.	56
Figura 17 – Embriões de <i>Danio rerio</i> . (A) Fase de eclosão, com a larva no estágio pec-fin, vista lateralmente; (B) Período da larva inicial, quando a bexiga natatória começa a se inflar e a larva inicia comportamentos como alimentação e evitamento; (C) Larva inicial, observada sob vista lateral. Fonte: Modificado de Quintaneiro et al., 2022.....	57
Figura 18- Aquários de reprodução montados sob bandeja de plástico com água e aquecedor a 28°Cm (vista de cima). Nos aquários estão os peixes, placas de separação, plantas de plástico e bolinhas de gude (vista de cima). Fonte: autor.	58
Figura 19- Aquário de reprodução com peixes tampado sob bandeja de plástico com água e aquecedor com termostato a 28°C (vista lateral). Fonte: autor.....	59
Figura 20- Ovos no fundo de aquário de reprodução, mostrando que são demersais e sendo sinalizados por setas vermelhas. Fonte autor.....	60

Figura 21 – (a) Ovos de <i>D. rerio</i> vistos sob microscópio (4x); (b) Ovos coagulados vistos sob microscópio (4x). Fonte: autor.	60
Figura 22 – (a) Ovos fecundados, em formato esférico e coloração transparente (visão macroscópica); (b) Ovo fecundado (microscópio lupa) com coloração transparente. Fonte: autor	67
Figura 23 - Processo de teste de embriotoxicidade aguda. Os ovos de <i>Zebrafish</i> são coletados do aquário de reprodução e postos em placa de Petri para observação no microscópio ou lupa para seleção. Os ovos inviáveis são descartados e os viáveis postos em placas de 24 poços aclimatadas. Fonte: OECD/ Teste FET.....	77

INTRODUÇÃO GERAL

Ao longo da história, diversos animais foram utilizados e estabelecidos como modelos de pesquisa animal na produção científica, entre eles, cavalos, porcos, macacos, coelhos, camundongos, cães, entre outros (Duarte, 2022). Em 1981, o pesquisador Dr. George Streisinger apresentou o peixe *Danio rerio* (Hamilton, 1822), como modelo de estudos de clonagem em vertebrados (Streisinger et al., 1981). Dali em diante, o peixe passou a ser implementado como uma escolha alternativa aos modelos experimentais de pesquisa já estabelecidos (Roper et al., 2018).

Conhecido como peixe-zebra ou paulistinha, o *zebrafish* é um peixe teleósteo pertence a ordem Cypriniforme e chega a medir cerca de 4-5 centímetros. O animal vem ganhando destaque no cenário científico mundial por possuir características que o fazem um excelente modelo para estudos com diversos enfoques (Dammski et al., 2011). A espécie apresenta um curto ciclo de vida, fácil reprodução em condições laboratoriais, elevada taxa de reprodução, rápido desenvolvimento embrionário, fertilização externa, ovos transparentes, genoma completamente sequenciado e com cerca de 70% de semelhança ao genoma humano (Currie & Lieschke, 2007). Tais características o tornaram uma boa alternativa ao uso de modelos convencionais como roedores (Ribeiro et al., 2022).

Com base nessas vantagens, o peixe-zebra tem sido amplamente empregado como modelo animal em diversas áreas das Ciências Biológicas e Biomédicas. Entre os principais campos de aplicação, destacam-se a biologia do desenvolvimento, genética, neurociência, toxicologia e ecotoxicologia, farmacologia, fisiologia, anatomia, nanotecnologia, além de seu crescente uso em estudos voltados à medicina translacional (Canedo et al., 2022). Isso se deve à sua notável capacidade de modelar doenças humanas, o que o torna uma ferramenta valiosa na investigação de patologias genéticas, na compreensão de seus mecanismos moleculares e na avaliação de novas estratégias terapêuticas (Zortéa, 2020).

Seus ovos possuem córion translúcido, o que permite o acompanhamento de todas as fases de seu desenvolvimento embrionário, sendo possível a visualização e identificação através desse revestimento (Kimmel et al., 1995). Essa característica torna o animal um modelo ideal para estudos de embriotoxicidade e biomonitoramento de poluentes, visto que, assim como ocorrer transferência placentária de químicos em mamíferos, pode acontecer transferência de substância via tecido materno (gônadas) ou por absorção coriônica no ambiente, sendo sensíveis a alterações de ambientes contaminados (Braga et al., 2024; Fonseca, 2018). A partir desses

aspectos supracitados, a espécie começou a ser utilizada em diversas instituições de ensino no mundo. Com isso, foram criados biotérios específicos para manutenção e cultivo desses animais.

Levando em conta esses aspectos, a espécie começou a ser utilizada em diversas instituições de ensino no mundo. Com isso, foram criados biotérios específicos para a manutenção e cultivo desses animais, permitindo o controle rigoroso das condições ambientais e reprodutivas necessárias para experimentação científica. Essas instalações, nas quais são produzidos, mantidos ou utilizados animais para atividades de ensino, pesquisa científica e/ou extensão, são denominadas biotérios. O biotério deve possuir infraestrutura adequada para atender aos requisitos ambientais, sanitários e de bem-estar animal, de modo que as condições do alojamento e do ambiente onde se encontram os animais sejam constantemente monitoradas, minimizando inclusive possíveis variações fisiológicas (Brasil, 2021). Para a utilização adequada dos animais nesses ambientes, é imprescindível a adoção de diretrizes que regulamentem essas instalações — conhecidas como Boas Práticas de Laboratório (BPL) — as quais asseguram o bom funcionamento dos projetos de pesquisa por meio de procedimentos laboratoriais padronizados (World Health Organization, 2009).

Os custos de todo seu cultivo e produção são relativamente reduzidos se comparados a biotérios para cultivo de outros animais. Os peixes-zebra podem ser mantidos em cardumes em aquários grandes ou individualmente em aquários pequenos (Dammski et al., 2011). Como manutenção dos sistemas de criação, deve-se selecionar matrizes de reprodução para manutenção do cultivo com constante renovação. Contudo, ainda que o animal apresente fácil cuidado, é necessária a aquisição de equipamentos específicos, sendo alguns de uso prolongado ou mais curto, que quando comparados aos exigidos para o cultivo por animais tradicionais na pesquisa, são de baixo custo (Schneider et al., 2009).

A criação e manutenção do *zebrafish* em laboratório exigem uma infraestrutura adequada, incluindo sistemas de recirculação de água, controle rigoroso de temperatura, pH, oxigenação e iluminação para garantir condições ideais ao desenvolvimento da espécie (Lawrence, 2007). Além disso, é fundamental o estabelecimento de Procedimentos Operacionais Padrão (POP's) para alimentação, monitoramento sanitário e manejo reprodutivo, assegurando a reprodutibilidade dos experimentos e o bem-estar animal. Essas medidas garantem um ambiente controlado, minimizando variações experimentais e promovendo a confiabilidade dos estudos científicos conduzidos com o modelo *zebrafish*.

Apesar das inúmeras vantagens do *zebrafish* como modelo experimental, a ausência de protocolos locais padronizados pode comprometer a reprodutibilidade dos estudos. Nesse sentido, torna-se essencial a implementação de condições reprodutivas e experimentais ajustadas à realidade da instituição. Os ensaios ecotoxicológicos utilizando *D. rerio* como organismo-modelo vêm se consolidando como ferramenta essencial para a avaliação de xenobióticos e de produtos destinados à remediação de impactos ambientais.

Considerando esse cenário, e com o intuito de viabilizar a utilização de *D. rerio* como modelo experimental para estudos ecotoxicológicos na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), *campus* São Mateus, o presente estudo teve como objetivo a padronização do cultivo e da reprodução do *zebrafish* no Laboratório de Bioexperimentação (LaBex), vinculado ao Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas. Além disso, foi desenvolvido um guia técnico contendo os protocolos para reprodução, larvicultura e manejo da espécie, incluindo a padronização do cultivo de alimento vivo, a fim de otimizar a nutrição dos organismos. Por fim, elaborou-se também uma ficha técnica específica para estudos de embriotoxicidade, com o objetivo de padronizar as futuras análises conduzidas no LaBex.

Os resultados e procedimentos desenvolvidos neste trabalho estão organizados e serão apresentados em quatro capítulos: Capítulo 1, dedicado à legislação vigente relacionada ao uso de animais em pesquisa; Capítulo 2, que apresenta um guia de boas práticas para o manejo e manutenção do *zebrafish*; Capítulo 3, voltado à reprodução da espécie em ambiente laboratorial; e Capítulo 4, que trata da bioexperimentação, com foco na aplicação de protocolos padronizados para ensaios ecotoxicológicos de embriotoxicidade.

CAPÍTULO 1 – LEGISLAÇÃO

INTRODUÇÃO

O uso de modelos animais desempenha um papel primordial no avanço do conhecimento científico, especialmente nas áreas de biomedicina, farmacologia e toxicologia. Entre os modelos mais utilizados nas últimas décadas, o *D. rerio*, popularmente conhecido como *zebrafish*, peixe-zebra ou paulistinha, tem se destacado devido às suas características favoráveis, como a alta taxa reprodutiva, o desenvolvimento embrionário externo e rápido, a transparência dos embriões (Cassar et al., 2021; Elizalde-Velázquez, 2023), além de sua homologia genética significativa com seres humanos (Currie & Lieschke, 2007). Essas vantagens tornaram o *zebrafish* uma ferramenta poderosa para estudos em genética, desenvolvimento, comportamento e avaliação de toxicidade.

A regulamentação sobre o uso de animais em pesquisa científica passou por um processo gradual de consolidação desde meados do século XX, em resposta ao crescimento das preocupações éticas e à pressão social por maior responsabilidade institucional. A formulação dos princípios dos 3Rs (substituição, redução e refinamento), proposta por Russell e Burch em 1959, marcou o início de um paradigma ético que viria a orientar legislações em todo o mundo (Ferdowsian & Beck, 2011).

Na América do Norte, os Estados Unidos estabeleceram em 1966 o *Animal Welfare Act*, que num primeiro momento se dedicou à regulação do comércio de animais de laboratório, mas aperfeiçoando-se ao longo do tempo, onde é destacável o estabelecimento do *Health Research Extension Act* de 1985, que introduziu requisitos éticos mais rigorosos para pesquisas financiadas publicamente, mesmo diante da resistência inicial de parte da comunidade científica (Rollin, 2006).

No Reino Unido, a promulgação do *Animals (Scientific Procedures) Act* de 1986 estabelece uma abordagem que leva em consideração o custo-benefício de uma pesquisa na análise do uso de animais (Kirk & Myelnikov, 2022). Esse modelo britânico contribuiu diretamente para o avanço europeu, culminando na Diretiva 2010/63/EU, que integrou exigências legais e éticas em torno dos 3Rs, formação contínua de profissionais e critérios rigorosos de revisão ética (Grimm et al., 2023).

No Brasil, a regulamentação do uso de animais em pesquisa foi marcada por avanços graduais. Com a Lei nº 11.794/2008, conhecida como Lei Arouca, diretrizes foram

estabelecidas para o uso científico de animais vertebrados no Brasil, incluindo a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) nas instituições de ensino e pesquisa. No entanto, a aplicação específica dessas normas ao *zebrafish* — um peixe teleósteo — ainda gera questionamentos, dada a diversidade de interpretações sobre as exigências éticas e metodológicas aplicáveis a esse modelo experimental.

Atualmente, o cenário regulatório brasileiro encontra-se em constante atualização, com o CONCEA emitindo resoluções normativas e orientações técnicas que buscam acompanhar o crescimento da pesquisa com *zebrafish* no país. Ainda assim, pesquisadores enfrentam desafios relacionados à clareza, especificidade e aplicabilidade dessas normas, especialmente no que diz respeito à manipulação, manutenção, bem-estar e protocolos experimentais envolvendo essa espécie.

Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar a legislação brasileira vigente relacionada ao uso de *zebrafish* em pesquisa científica. A análise busca contribuir para a compreensão crítica do regramento aplicável e subsidiar boas práticas que garantam o rigor ético e científico na utilização desse importante modelo animal.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Analisar a legislação brasileira e as diretrizes internacionais que regulamentam a criação, o manejo e o uso do *D. rerio* (*zebrafish*) em ambientes laboratoriais, com foco em aspectos éticos, normativos e estruturais aplicáveis à experimentação científica.

Objetivos Específicos

- Levantar a legislação brasileira relacionada ao uso científico do *D. rerio*.
- Identificar diretrizes internacionais sobre boas práticas com a espécie.
- Verificar normas aplicáveis à estrutura e funcionamento de biotérios.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo consistiu em uma análise documental da legislação brasileira e de diretrizes internacionais relacionadas à criação, manejo e uso do *D. rerio* em ambientes laboratoriais. A metodologia baseou-se na identificação, seleção e sistematização de documentos oficiais, sem delimitação temporal para a inclusão de normas e publicações.

Foram considerados os seguintes eixos de levantamento:

- Legislação brasileira vigente sobre experimentação animal:
 - Lei nº 11.794/2008 (Lei Arouca);
 - Resoluções e diretrizes publicadas pelo CONCEA;
 - Normas e instruções do IBAMA;
 - Portarias, decretos e demais documentos correlatos.
- Diretrizes e guias internacionais:
 - Documentos internacionais que tratam de boas práticas na criação e experimentação com *D. rerio*;
 - Normativas de instituições estrangeiras amplamente reconhecidas no campo da experimentação animal.
- Normativas sobre biotérios:
 - Regulamentações técnicas referentes à estruturação, funcionamento e monitoramento de biotérios no Brasil;
 - Diretrizes sobre biossegurança, bem-estar animal e parâmetros ambientais adequados à espécie.

Todos os documentos foram obtidos a partir de fontes oficiais e bases institucionais, como sites governamentais, portais de conselhos reguladores e repositórios científicos. A análise teve caráter descritivo, com foco na identificação de pontos de convergência e lacunas regulatórias que impactam diretamente a prática científica com *D. rerio* no país.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Brasil, a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica é regulamentada por um conjunto de leis federais, decretos e resoluções. A principal norma que rege a experimentação animal é a Lei nº 11.794/2008, conhecida como Lei Arouca, que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, visando garantir seu bem-estar e minimizar o sofrimento.

A partir dessa lei, foi criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), vinculado ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), com a responsabilidade de normatizar, avaliar e monitorar as atividades envolvendo animais em instituições de pesquisa no país.

A Lei também determina a obrigatoriedade da criação dos Comitês de Ética no Uso de Animais (CEUAs) nas instituições, os quais são responsáveis por analisar, aprovar e acompanhar os projetos de pesquisa e ensino que envolvam animais, assegurando que estejam em conformidade com as diretrizes éticas e legais estabelecidas pelo CONCEA.

As instituições que desenvolvem atividades ou projetos que envolvam a produção, a manutenção ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, exceto humanos, que englobam qualquer uso de animais para ensino ou pesquisa científica, devem requerer o “Credenciamento Institucional para Atividades com Animais para Ensino ou Pesquisa” (CIAEP) junto ao CONCEA, por meio do “Cadastro de Instituições de Uso Científico de Animais” (CIUCA). Para cadastro das instalações, deve-se constar documentação comprobatória da existência de estrutura física adequada e pessoal qualificado para a produção, a manutenção ou a utilização de animais para atividades de ensino ou pesquisa científica.

Em 2009, houve a criação do Decreto nº 6.899, responsável pela regulamentação da Lei Arouca, explicação de como o CONCEA funciona e como as CEUAs devem atuar em suas instituições, juntamente com as punições referentes ao descumprimento da lei.

O CONCEA atua por meio de Resoluções Normativas, regulando e supervisionando como devem ser feitos o uso de animais na experimentação. A saber:

- 1) Resolução Normativa nº 37/2018: Diretriz da Prática de Eutanásia no Brasil, estabelecendo métodos e critérios para a eutanásia de animais em ensino e pesquisa.
- 2) Resolução Normativa nº 49/2021: Capacitação obrigatória para profissionais que trabalham com animais em atividades de ensino e pesquisa científica.

3) Resolução Normativa nº 50/2021: Critérios e procedimentos para a emissão e renovação do Credenciamento Institucional para Atividades com Animais em Ensino ou Pesquisa (CIAEP).

4) Resolução Normativa nº 61/2023: Regulamenta as condições para a criação, manutenção e experimentação com peixes mantidos em instituições de ensino ou pesquisa.

5) Nota Informativa nº 01/2024: Dispõe sobre o uso de embriões, fetos ou formas larvais animais em atividades de ensino ou pesquisa científica.

A Resolução Normativa nº 61/2023: Dispõe sobre as condições que deverão ser observadas para a criação, a manutenção e a experimentação com peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Onde define:

“Parágrafo único. Para fins do disposto nesta Resolução Normativa, consideram-se peixes de laboratório as espécies Lambari (*Astyanax* spp.), Tilápia (*Tilapia* spp., *Sarotherodon* spp. e *Oreochromis* spp.) e zebrafish (*Danio rerio*).”

Nesse contexto, torna-se fundamental a definição de pontos de atenção específicos para a experimentação animal com peixes, considerando que seu comportamento e necessidades fisiológicas diferem significativamente dos modelos mais tradicionais, como roedores. O estabelecimento de diretrizes claras de bem-estar e de estratégias para minimizar o estresse deve ser desenvolvido em conjunto com as normativas legais, garantindo uma abordagem ética e adaptada às particularidades desses organismos.

A legislação tem como objetivo principal evitar maus-tratos e o sofrimento desnecessário dos animais, recomendando, sempre que possível, a utilização de métodos alternativos, como simulações por computador ou o uso de embriões em substituição a animais adultos. Para situações em que não há o cumprimento da legislação, o pesquisador e/ou instituição podem ser multados, perder o direito de realizar experimentos e em casos de maior gravidade, responder judicialmente pela Lei de Crimes Ambientais (Lei nº 9.605/1998), se enquadrando no crime de maus-tratos.

Além do CONCEA, outros órgãos também atuam na experimentação animal, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O IBAMA controla o uso de animais silvestres, emitindo autorizações para captura, transporte e manutenção em pesquisas, além de fiscalizar irregularidades para evitar tráfico e maus-tratos. Já o MAPA regula a experimentação

com animais de produção, como bovinos, peixes, suínos e aves, garantindo normas de biossegurança, bem-estar animal e supervisão de pesquisas agropecuárias.

No âmbito da Universidade Federal do Espírito Santo, através da Portaria 1.112 de 26 de setembro de 2007, a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-Ufes) foi designada analisar os aspectos éticos dos protocolos de ensino e pesquisa realizados na instituição, bem como avaliar e monitorar as instalações cadastradas no CIUCA.

CAPÍTULO 2 – GUIA DE BOAS PRÁTICAS

INTRODUÇÃO

As boas práticas de laboratório (BPL) são fundamentais para garantir a qualidade, a confiabilidade e a reprodutibilidade dos dados obtidos em pesquisas científicas que utilizam modelos animais. No contexto da experimentação com *D. rerio*, tais práticas assumem um papel ainda mais relevante, considerando a sensibilidade desse modelo às condições ambientais e ao manejo. A padronização de procedimentos, o controle rigoroso de variáveis como temperatura, qualidade da água, densidade populacional e fotoperíodo, bem como o treinamento contínuo dos profissionais envolvidos, são aspectos cruciais para assegurar o bem-estar dos animais e a validade dos resultados obtidos (OECD, 2018; Aleström et al., 2020).

A implementação de rotinas baseadas em BPL também visa minimizar o estresse dos organismos e prevenir interferências experimentais, o que se traduz em maior consistência nos dados e menor necessidade de repetição de testes, contribuindo diretamente com os princípios dos 3Rs, especialmente a redução e o refinamento (Russell & Burch, 1959; Burden et al., 2015). Em laboratórios que trabalham com *zebrafish*, práticas como o monitoramento sistemático de parâmetros físico-químicos da água (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade), o uso de sistemas de recirculação e filtragem adequados e a adoção de protocolos padronizados para alimentação, reprodução e eutanásia são indispensáveis (Lawrence, 2007)

No Brasil, embora as BPL estejam previstas em diversas normas técnicas e orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sua aplicação prática ainda enfrenta desafios de padronização e adesão institucional. Iniciativas voltadas à capacitação de pessoal, investimento em infraestrutura e alinhamento com padrões internacionais são necessárias para consolidar uma cultura de boas práticas no manejo e na experimentação com *D. rerio*, promovendo pesquisas éticas, eficientes e replicáveis

Além disso, o registro detalhado das atividades realizadas, a rastreabilidade dos lotes e linhagens, e a gestão criteriosa dos dados experimentais são componentes centrais das boas práticas, promovendo a integridade científica e facilitando auditorias e reavaliações de estudos.

Frente a esse cenário, é imprescindível que instituições científicas invistam na capacitação, na estruturação de seus ambientes laboratoriais e na adoção consistente das BPL. Isso contribui não apenas para o cumprimento da legislação vigente, mas também para a excelência científica e o compromisso ético na experimentação animal (Kutter et al., 2023).

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Descrever e analisar as condições estruturais, operacionais e sanitárias do biotério do Laboratório de Bioexperimentação para a criação, manutenção e experimentação utilizando *D. rerio*

Objetivos específicos

- Apresentar a estrutura física e funcional do biotério;
- Caracterizar o sistema de criação e manutenção de *D. rerio*;
- Identificar os protocolos de biossegurança, alimentação e qualidade da água empregados no laboratório;
- Verificar o cumprimento das normas éticas e legais vigentes relacionadas ao bem-estar animal;
- Apontar desafios e adequações em andamento para aprimoramento das práticas laboratoriais.

MATERIAL E MÉTODOS

Com base no levantamento documental previamente realizado, foi elaborado um Guia Técnico com recomendações práticas de Boas Práticas de Laboratório (BPL) para a manutenção de *D. rerio* no LaBex. O objetivo principal foi orientar a implantação de um sistema de cultivo padronizado que atendesse às exigências normativas e garantisse o bem-estar dos animais mantidos em ambiente controlado.

1. Implantação do sistema de recirculação

Para o estabelecimento do sistema de recirculação de água, foram utilizados os seguintes equipamentos e materiais:

- Componentes principais do sistema:
 - Aquários de vidro;
 - Aquários *ZebClean* (*Alesco*, Monte Mor/SP, Brasil);
 - Bomba de recalque *Ocean Tech*;
 - Climatizador e ar-condicionado;
 - Aquecedores com termostato;
 - Filtro UV *Ocean Tech 13w*;
 - Pressurizador de ar (*Boyu*);
 - Aeradores;
 - Iluminação *LED* com controle de fotoperíodo.
- Materiais filtrantes:
 - Mídias *Ocean Tech K1*;
 - Mídias *Sera Siporax*;
 - Malha de perlon;
 - Carvão ativado *Ocean Tech*.
- Estrutura hidráulica:
 - Tubulações e conexões hidráulicas;

- Calhas de PVC;
- Mangueiras de jardim;
- Pedras porosas;
- Torneiras de jardim.
- Enriquecimento ambiental:
 - Plantas artificiais;
 - Tubos de PVC, visando o estímulo comportamental dos peixes.
- Outros:
 - Pedras porosas
 - Mangueira de silicone

2. Alimentação dos animais

A dieta dos exemplares de *D. rerio* foi composta por:

- Ração comercial (Nutricon);
- *Artemia salina* proveniente do Rio Grande do Norte;
- Microvermes da aveia.

3. Monitoramento e análise da qualidade da água

Para garantir condições físico-químicas adequadas à manutenção da espécie, foram utilizados os seguintes instrumentos:

- Análises de parâmetros da água:
 - Refratômetro manual (salinidade);
 - Multiparâmetro Hanna (pH e temperatura);
 - Kits colorimétricos Labcon:
 - Oxigênio dissolvido;
 - Amônia;
 - Nitrito;

- Dureza total;
- Dureza em carbonatos.
- Correções químicas:
 - Bicarbonato de sódio e ácido clorídrico, aplicados conforme necessidade para controle de pH.
 - Acelerador biológico de bactérias nitrificantes

RESULTADO E DISCUSSÃO

Infraestrutura laboratorial

O Laboratório de Bioexperimentação (LaBex) (Figura 1a) do Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas fica localizado no Bloco B, Eixo 1 do Centro Universitário Norte do Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, campus São Mateus. O laboratório é composto por duas salas fechadas (por divisórias de MDF) e o espaço onde é feito o trânsito de pessoas e se localizam os equipamentos de pesquisa e bancadas com pia. Uma sala é fechada por completo onde está situado o biotério, enquanto a outra tem uma abertura na parte superior e é utilizada ocasionalmente.



Figura 1 - (a) Corredor de acesso ao biotério com divisórias de MDF o tampando completamente, sala com divisória na altura da porta e porta de entrada/saída ao fundo; (b) Porta de entrada/saída do Laboratório de Ecofisiologia Animal e porta semiaberta de acesso para o Laboratório de Bioexperimentação. Fonte: autor

Atualmente, há um acesso direto ao Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA) (Figura 1b) onde são desenvolvidas pesquisas com animais aquáticos e semi-terrestres. Esse laboratório atua como unidade de apoio ao LaBex. Inicialmente, ambos funcionavam de forma independente. A integração entre as duas unidades de pesquisa ocorreu por meio de uma parceria entre seus respectivos coordenadores: Prof. Dr. Rogério Oliveira Faleiros (LEFA) e Prof^a. Dr^a. Juliana Castro Monteiro Pirovani (LaBex).

Aspectos éticos

Nesse contexto, os Laboratórios de Ecofisiologia Animal e de Bioexperimentação, vinculados ao Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas do Ceunes/Ufes, passaram a compor a Unidade Experimental do Ceunes/Ufes, registrada junto ao CIUCA-CONCEA. Essa unidade é destinada ao estabelecimento e à manutenção do sistema de criação de *D. rerio* (*zebrafish*), englobando atividades como seleção de matrizes, reprodução, larvicultura, obtenção e acomodação de juvenis, além da realização de experimentação animal.

A equipe da CEUA-Ufes, em visita técnica realizada em 23/08/2023, acompanhada pelo responsável técnico, o médico veterinário Me. André Gomes Lima, e pelos respectivos coordenadores, monitorou e avaliou as instalações quanto aos diversos aspectos imprescindíveis para garantir o bem-estar animal. De acordo com relatório emitido pela CEUA-Ufes (em 10/11/2023), foram considerados satisfatórios aspectos como: estado sanitário dos animais (com origem conhecida), controle e registro dos parâmetros físico-químicos (O_2 dissolvido, amônia, nitrito, nitrato, dureza) da água utilizada nos aquários, temperatura, luminosidade, aeração e controle de patógenos. Além disso, os aquários e o local de estocagem de ração também foram considerados dentro do padrão exigido.

Contudo, alguns fatores foram indicados como preocupantes, a saber: o descarte dos resíduos químicos e biológicos, a ausência de gerador para falta de energia elétrica, o monitoramento remoto da ambiência, a falta de enriquecimento dos aquários e, principalmente, a ausência de sistema adequado de abastecimento/reposição de água para os aquários. Diversos desses pontos foram abordados pela direção do Centro e pela Diretoria de Infraestrutura – Setorial Norte da Ufes, com soluções a curto e médio prazo, como é o caso do descarte de resíduos por empresa especializada com contrato vigente, e da adequação da rede elétrica, através da instalação de diversos pontos de energia no Laboratório de Bioexperimentação (foram instaladas 30 tomadas duplas para ligação dos diversos equipamentos – iluminação, aquecedores, aeradores, filtros, etc.), bem como da climatização do ambiente por meio da instalação de aparelhos de ar-condicionado para garantir a manutenção adequada da temperatura ambiental de modo ininterrupto.

Outros fatores também foram solucionados para garantir o pleno atendimento às recomendações da CEUA-Ufes. O enriquecimento foi estabelecido por meio da inclusão de tubos de PVC e plantas artificiais nos aquários, com o objetivo de reduzir o estresse experimental. O monitoramento da ambiência está sendo planejado, com orientação do médico

veterinário responsável, e será realizado utilizando câmeras Wi-Fi e lâmpadas sentinelas (para monitorar a ausência de energia elétrica).

Ainda, a conexão direta entre as duas instalações (Laboratório de Ecofisiologia Animal e Laboratório de Bioexperimentação) foi providenciada de modo a facilitar a manutenção, manuseio e transporte de animais de uma sala para outra, sem a necessidade de movimentação dos animais em aquários para fora dos laboratórios, minimizando o estresse experimental.

Os protocolos desenvolvidos nesse trabalho foram autorizados pela CEUA-Ufes e possui relação com os projetos, registrados sobre os nº 02/2023 e 12/2023, os quais envolvem a produção, manutenção e experimentação utilizando *zebrafish* no Laboratório de Bioexperimentação.

Fotoperíodo

O ciclo circadiano, também conhecido como ritmo circadiano, é o mecanismo pelo qual os organismos ajustam seus processos fisiológicos em função do dia e da noite. Durante o dia, a luz, e durante a noite, a ausência dela, influenciam o “relógio biológico” dos organismos, regulando o comportamento ao longo das 24 horas de um ciclo claro/escuro. Neste sentido, é necessário a manutenção adequada de um período “claro/escuro” e, assim, o isolamento e automação do fornecimento de luz são inevitáveis para o sucesso do processo de cultivo em laboratório.

A sala de cultivo é adaptada para simular os períodos dia e noite para os peixes. Para isto, foram adaptadas lâmpadas de LED a um filtro de linha (Figura 1b) ligado à tomada de um Timer analógico (Figura 1a), possibilitando a alternância de iluminação nos períodos: claro: de 14h e escuro: de 10h, de acordo com Matthews et al. (2002), para adequada criação do *Zebrafish* em biotério.



Figura 2 – (a) Timer analógico com tomada para controle do fotoperíodo; (b) Filtro de linha onde estão ligadas as lâmpadas de LED, vista ao fundo. Fonte: autor

Origem dos animais

Os peixes da linhagem principal utilizada no LaBex foram adquiridos no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia em Peixes (LABFISH) da Universidade Federal de Jataí (UFJ), cedidos gentilmente pela coordenadora Prof^a. Dr^a. Mônica Rodrigues Ferreira Machado, coordenadora do laboratório. Uma outra linhagem, essa por sua vez comercial, foi adquirida através de criadouro comercial (Empresa Kauar, Belo Horizonte/MG) e se encontra em fase de observação para futura utilização em ensaios e reprodução. É importante que haja controle sobre a origem (criadouros) em que os peixes foram adquiridos para garantir uma replicabilidade dos experimentos (Tsang, 2017).

Fornecimento água

A água utilizada no sistema é oriunda de poço artesiano e não passa por um tratamento prévio antes de sua utilização, sendo inserida no sistema pelo aquário de cerâmica caso ocorra

a reposição (diluição de compostos nitrogenados ou TPA) para que haja diluição da água a ser inserida com a água já presente no sistema.

Segundo a Resolução Normativa CONCEA nº 61, é necessário que haja sistema de abastecimento de água e reservatório de armazenamento, sendo recomendada a utilização de filtros de tratamento prévio, visto que podem existir contaminantes e patógenos que são carregados pela água, sendo que em alguns casos nem mesmo a utilização de filtros sé eficiente contra.

O biotério está buscando se adequar a essa normativa, visto que ainda é novo e está em fase de adaptação. No entanto, os parâmetros da água monitorados encontram-se dentro dos limites aceitáveis, exceto a dureza, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros da água provinda do poço artesiano. Fonte: autor.

pH	Amônia	Nitrito	Dureza	Alcalinidade	Oxigênio Dissolvido	Temperatura
5,5-6,5	0 ppm	0 ppm	Muito branda	3,5° dH	>6,0 ppm	Varia ao longo do dia

Manter a qualidade da água dentro dos parâmetros ideais é fundamental para garantir a saúde e o desempenho, prevenindo impactos negativos que possam comprometer seu desenvolvimento e longevidade, especialmente em ambientes controlados como biotérios e laboratórios de pesquisa. Para isso são utilizados testes de parâmetros vendidos comercialmente (Figura 3) para manutenção da qualidade da água. Sendo que, para cada parâmetro existe uma forma de correção, abordada nos itens a seguir e na Tabela 2.



Figura 3 - Testes de parâmetros da água Labcon (da esquerda para direita: dureza em carbonatos, dureza total, nitrito, amônia, O₂ dissolvido e pH) e Alcalinizante Labcon. Fonte: autor.

Aquários

Os peixes podem ser criados em diferentes tipos de aquários, sejam eles de vidro, acrílico ou outro tipo de material plástico. Para o sistema de recirculação (Figura 4), no biotério utiliza-se principalmente aquários de vidro de 70,0 x 30,0 x 45,5 cm sendo que o nível da água nos aquários permanece estabilizado enquanto a bomba de recalque permanece ligada. Em caso de queda de energia, um pequeno volume de água sai dos aquários pelo overflow reverso e permanece no Sump (Aquario com sistemas de filtragem mecânica, química e biológica) até o restabelecimento da rede elétrica.



Figura 4- - Sistema de recirculação de água do Laboratório de Bioexperimentação/Ufes campus São Mateus. Seta azul indicando o *Sump*, onde a bomba impulsiona água para os aquários de vidro (setas vermelhas), em que estão os peixes adultos (linhagem FK nos aquários a direita e linhagem *Kauar* no aquário a esquerda), e para os aquários *ZebClean*, com peixes de linhagem FK juvenis (aquário a esquerda e central) e um casal adulto (a direita). Seta cinza apontando para o aquário de cerâmica, onde se localizam os aquecedores e a água é direcionada ao *Sump*.
Fonte: autor.

Outro modelo de aquário utilizado no sistema de recirculação é o ZebClean (Figura 5), em que existe um fluxo unidirecional de água, escapando por extravasamento e sua saída é conectada à calha que leva ao SUMP. Nesses aquários são colocados animais que precisam ser isolados dos outros, por motivos que não são sanitários (pois nesse caso é aconselhado a eutanásia).



Figura 5- Peixes juvenis em aquário ZebClean/Alesco. Fonte: autor

Em casos em que os peixes precisam ficar em isolamento do sistema de recirculação (animais recém-chegados, por exemplo), são utilizados aquários de plástico ou vidro com filtro hang-on e mídias biológicas (serão abordadas melhor no tópico sobre limpeza e filtração), aquecedor com termostato.

Enriquecimento Ambiental

O enriquecimento ambiental (Figura 6) se caracteriza por serem elementos como plantas, esconderijos, substratos variados e estímulos visuais ajudam a criar um ambiente mais dinâmico, melhorando a saúde física e mental dos animais. Resultados sugerem que o enriquecimento ambiental pode atenuar o estresse e o comportamento semelhante à ansiedade (Gatto et al, 2022), bem como melhora o bem-estar e pode reduzir fontes de viés na pesquisa científica (Gallas-Lopes et al., 2023).

O uso de canos de PVC é uma boa alternativa para criar esconderijos para os peixes, podendo também ser utilizadas plantas de fundo e flutuantes. É importante ressaltar que as limpezas desses materiais devem ser feitas de forma recorrente, pois se tornam fonte de acúmulo de matéria orgânica quando inseridos nos aquários. O uso de elementos naturais não é indicado devido aos riscos de contaminação que podem ocorrer.

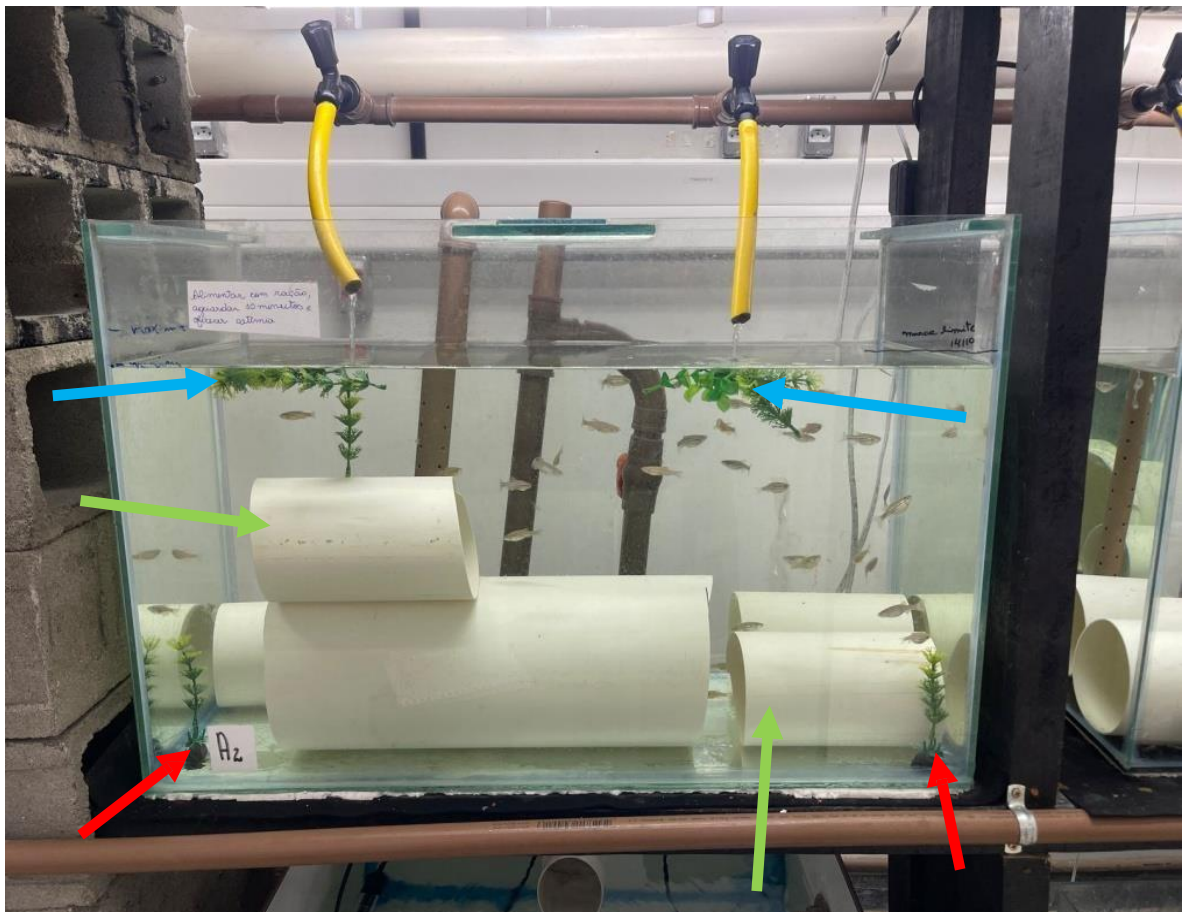


Figura 6- Aquários com peixes e enriquecimento ambiental representado pelos canos de PVC (setas verdes), plantas artificiais no fundo (setas vermelhas) e flutuantes (setas azuis). Fonte: autor

Limpeza e Filtração

A constante passagem de água pelo encanamento e seu contato com as paredes dos aquários acaba gerando proliferação bacteriana em forma de biofilme, que permanece incrustada e necessita remoção. Para evitar a proliferação bacteriana, a limpeza dos restos de ração e fezes deve ser feita diariamente, de preferência no período da manhã, tanto em aquários do sistema de recirculação quanto em aquários de uso esporádico.

Ao alimentar os peixes com ração comercial, as partículas não consumidas pelos peixes ficam depositadas no fundo dos aquários, sendo necessário a limpeza recorrente por sifonamento, enquanto as menores partículas são levadas às calhas pelo overflow reverso e ao primeiro filtro; o filtro mecânico ou físico. Uma parte das partículas maiores também são levadas às calhas, mas ficam retidas no fundo do aquário de cerâmica e sua limpeza é feita juntamente com os aquários de vidro.

A utilização de filtros no tratamento da água é essencial para garantir a qualidade e estabilidade do sistema de recirculação. De acordo com Geisler (2016), o modelo adotado pelo *European Zebrafish Resource Center* envolve múltiplas etapas: filtragem mecânica, oxigenação, passagem por biofiltro, filtro de luz UV e, por fim, filtragem por carvão ativado antes da água retornar aos aquários. Esse sistema apresenta como vantagens a alta eficiência na remoção de impurezas e microrganismos, além de garantir estabilidade química e biológica da água. Como desvantagens, destaca-se o custo elevado e a necessidade de manutenção técnica constante.

Já Avdesh et al. (2012) relatam um modelo semelhante, iniciando com dois filtros mecânicos — uma malha de 120 micrômetros e um filtro *canister* de 50 micrômetros — seguidos por biofiltração, carvão ativado, luz UV, e então direcionamento para a bomba e aquários. Esse modelo é eficiente e modular, com vantagem de fácil manutenção, mas, assim como o anterior, demanda monitoramento frequente para garantir seu funcionamento ideal.

No LaBex, o sistema de filtragem se dá de forma semelhante, no qual a água é retirada do aquário por um sifonador overflow reverso, direcionada por calhas para um aquário de cerâmica (utilizado para aumento do volume de água do sistema) e desse aquário a água, por gravidade, cai no SUMP (Figura 7) em cima de uma manta acrílica (perlon) para filtragem mecânica, onde os resíduos maiores ficam retidos. Em seguida, a água passa pelo biofiltro, onde se localizam as mídias de filtragem biológica, sendo constituídas por 12 litros de mídias Ocean Tech K1 e cerca de 1 litro de mídias Sera Siporax.

No biofiltro acontece a oxidação dos compostos nitrogenados pelas bactérias do gênero *Nitrosomonas* que realizam a conversão da amônia em nitrato (nitrificação) e as bactérias *Nitrobacter* convertem o nitrito em nitrato (nitratação), composto com baixa toxicidade aos animais (DeLong e Losordo, 2012). Para um melhor aproveitamento da capacidade autolimpante e eficiência do modelo de mídias, é utilizada uma intensa aeração desse compartimento, onde a movimentação das mídias realiza sua própria limpeza por atrito.

No terceiro compartimento do SUMP se localiza no filtro químico de carvão ativado, o produto adquirido comercialmente é conhecido como Ocean Tech Coco, onde micropartículas e moléculas solubilizadas na água se aderem aos poros do carvão para que não fiquem circulantes no sistema. Por fim, a bomba de recalque localizada no último compartimento impulsiona a água para o filtro de luz ultravioleta. O modelo utilizado é o Filtro UV Esterilizador 9w Ocean Tech, em seguida essa água segue pela tubulação até os aquários.

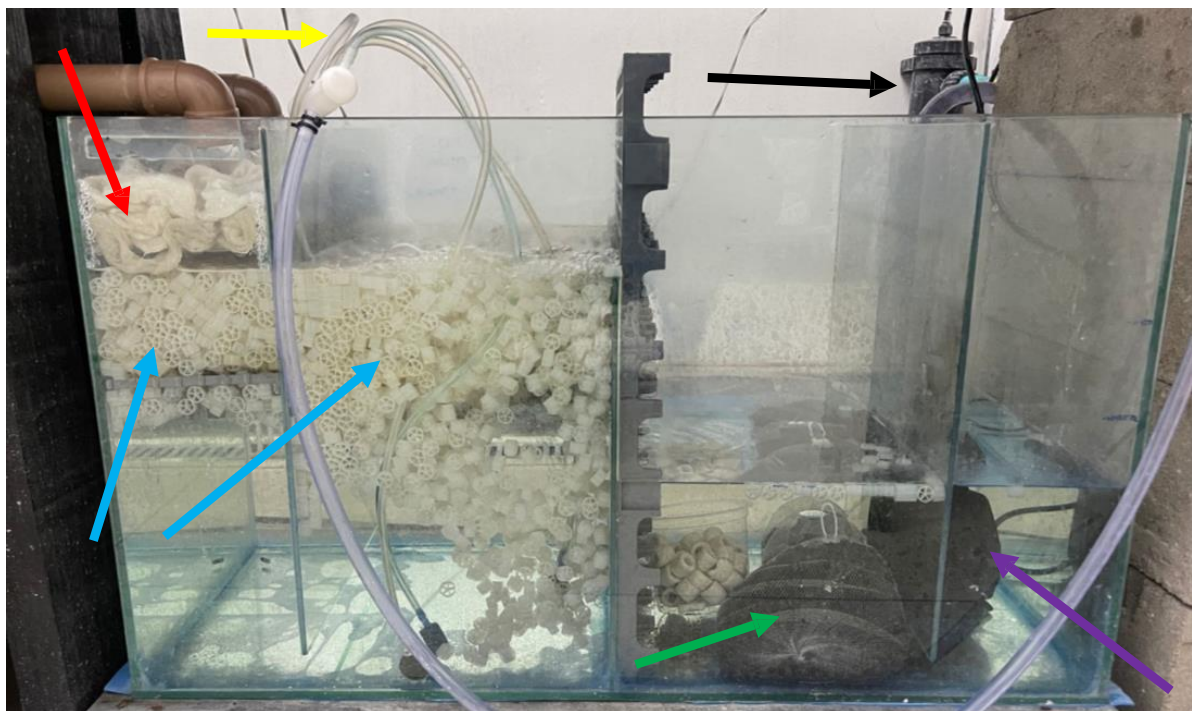


Figura 7- Sump do sistema de recirculação do Laboratório de Bioexperimentação/DCAB/Ceunes/Ufes campus São Mateus. Filtro mecânico para retenção de partículas grandes, indicado por seta vermelha no primeiro compartimento. Ainda no primeiro compartimento e no segundo, setas azuis indicam o biofiltro de compostos nitrogenados, seguido da terceira subdivisão, onde está o filtro químico (setas verdes), em que pequenas partículas se aderem nos poros do carvão ativado. Por fim, o quarto compartimento com a bomba de recalque, responsável por impulsionar a água para o filtro UV (seta preta) e para os aquários. Fonte: autor

Alimentação

A alimentação natural do peixe paulistinha vai desde plâncton, material vegetal, insetos, larvas, ovos detritos, areia, entre outros, sendo classificado como um animal onívoro (Spence, 2008). Matthews (2002) mostra que existe efeito na interpretação de resultados em relação a dieta que o peixe recebe. Ainda não há uma receita padronizada de dieta para criação deste peixe em biotério, mas é sabido que para minimizar variações nos resultados, a criação de uma ração padronizada e específica para a espécie de acordo com seu perfil nutricional é desejada.

A alimentação de um peixe pequeno como o espécime tratado depende do tamanho da abertura da boca. Suas larvas, ao iniciar a alimentação exógena, irão consumir partículas de no máximo 150-200 μm como *Paramecium spp.*, rotíferos e uma variedade de dietas processadas. Juvenis conseguem comer partículas de até 400 μm , consumindo ração e artêmia como os indivíduos adultos (Dammski et al., 2011). Uma melhoria na alimentação possível é o enriquecimento nutricional das culturas de alimento vivo, fato esse que deve ser mais bem pesquisado para aplicação prática.

No LaBex, a alimentação dos animais é feita com ração comercial de boa qualidade (a ração utilizada atualmente é a Nutricon/nutriflakes) ofertada às 9 horas e às 15 horas, enquanto os náuplios de artêmia são ofertados às 12 horas. Aos finais de semana, caso ninguém esteja presente no laboratório, alimentadores automáticos (Figura 8) são instalados para oferecer ração às 06:00, às 10:00, às 14:00 e às 18:00 horas.



Figura 8 - Alimentador automático disposto em aquário de vidro no LaBex/DCAB/Ceunes/Ufes. Fonte: autor.

Cultivo de *Artemia salina*

A utilização de *Artemia salina* (Leach, 1819) como uma fonte de alimento para criação de pequenos peixes, larvas e juvenis é bem comum entre aquaristas e em biotérios. Elas são comercializadas em pacotes de cistos encapsulados (Figura 9b), que após serem hidratados em água salgada com constante aeração e sob luminosidade, ocorre a eclosão em aproximadamente 24 horas.

Para uma boa taxa de eclosão (Anexo II), é necessário que alguns parâmetros da água estejam adequados, sendo eles, temperatura constante de 25 a 28 °C, salinidade de 15 a 35 ppm, pH mínimo de 8,0, níveis de oxigênio quase saturados, densidades máximas de cistos de 2 g/l e iluminação forte de 2000 lx (Sorgeloos et al., 2001) (Figura 9a).

Os náuplios de artêmia são ofertados aos peixes coletando água da artemeira pela mangueira de aeração, após cerca de 3 a 5 minutos sem aeração e em escuro completo, para que os náuplios se concentrem no fundo da artemeira, visto seu fototropismo. Os náuplios que permanecem nadando perto da lâmina de água podem ser coletados com ajuda de pipeta Pasteur.

Vale ressaltar que sem a aeração os náuplios podem se concentrar no fundo do substrato e após um tempo morrem por hipóxia. Logo, a coleta de artérias deve ser feita rapidamente e a aeração deve ser acionada logo após a coleta. Os cistos são postos para eclosão no dia anterior a sua utilização e devem ser oferecidos num período máximo de 24 horas pós eclosão, visto que sua carga nutricional diminui à medida que os náuplios passam de instar (Sorgeloos et al., 2001).



Figura 9 – (a) Artemeira em utilização, com aeração e iluminação; (b) Pacote de cistos de artêmias vendido comercialmente. Fonte: autor.

Cultivo de *Panagrellus redivivus*

O *Panagrellus redivivus* é um nematódeo de vida livre já usado e estudado como fonte de alimento para estágios iniciais de organismos vertebrados e invertebrados (Affandi et al., 2019; Gomes et al., 2022). Conhecido popularmente como verme da aveia ou microverme, esse organismo é uma excelente fonte de alimento para estágios larvais e juvenis, especialmente

quando o uso de alimento vivo é essencial. Seu cultivo é simples (Anexo III), exigindo apenas um recipiente com circulação de ar, aveia, água e uma cultura inicial, (ou start, obtido comercialmente), podendo ser replicado conforme a necessidade (Figura 10).

Seu cultivo, é realizado para alimentação dos estágios larvais e juvenis de *D. rerio*, conforme Anexo III, onde é informado sua forma de disponibilização.

É vital ressaltar que há uma intensa decomposição e proliferação de fungos no meio de cultura onde os vermes estão, que pode acarretar a altos níveis de compostos nitrogenados quando ofertados aos peixes em aquários pequenos e com baixo volume de água (geralmente aquários fora do sistema de recirculação, utilizados para larvas e juvenis). Nesses casos, a replicação com frequência se faz necessária para minimizar riscos à saúde dos peixes.



Figura 10 – Culturas de microverme em potes de vidro tapados com elástico e perlite. Fonte: autor.

Cultivo de *Paramecium*

Paramécios são protozoários de vida livre encontrados em águas doces, salobras e marinhas, caracterizados por um movimento relativamente rápido (Araújo & Medeiros, 2013). Sendo seres unicelulares, são base da alimentação de pequenos organismos aquáticos.

Para criação de *zebrafish* seu cultivo é de grande ajuda, pois nos primeiros estágios de vida sua principal fonte de alimentação serão os alimentos vivos (Carvalho et al., 2006; Dammski et al., 2011). Seu cultivo em laboratório (Figura 11) é fácil, se proliferando rapidamente em um meio contendo a microalga spirulina, leite em pó e água, além do start (água com paramécios vivos) que pode ser obtido na própria água de cultivo dos peixes. O Anexo IV trata sobre o cultivo desses organismos.



Figura 11- Cultivos de *Paramecium* em Erlenmeyer tampado por elástico e prelon, Fonte: autor

Qualidade da água

Os parâmetros da água são essenciais para o bem-estar dos animais, pois influenciam na imunidade, fisiologia, estresse, resistência a doenças, comportamento e reprodução (Harper e Lawrence, 2016). O *zebrafish* tolera variações na água devido à adaptação aos diferentes habitats, mas condições inadequadas comprometem sua homeostasia, reduzindo posturas, crescimento e sobrevivência (Lawrence, 2007).

Temperatura

A temperatura comumente utilizada em laboratórios para reprodução e crescimento larval é 28,5° C (Westerfield, 2007), podendo ter efeito no desenvolvimento, comportamento, relógio biológico, estresse e toxicidade de compostos. Contudo, sabe-se que há uma necessidade de estudos para entendimento da biologia térmica do peixe zebra (López-Olmeda e Sánchez-Vázquez, 2011).

No LaBex, o ar-condicionado permanece ligado para manutenção da temperatura da sala permanecer entre 23 a 26° C e a água de cultivo é aquecida a 28° C por termostato com aquecedor Roxin Q3, localizado no aquário de cerâmica onde ficam constantemente ligados (Figura 12).

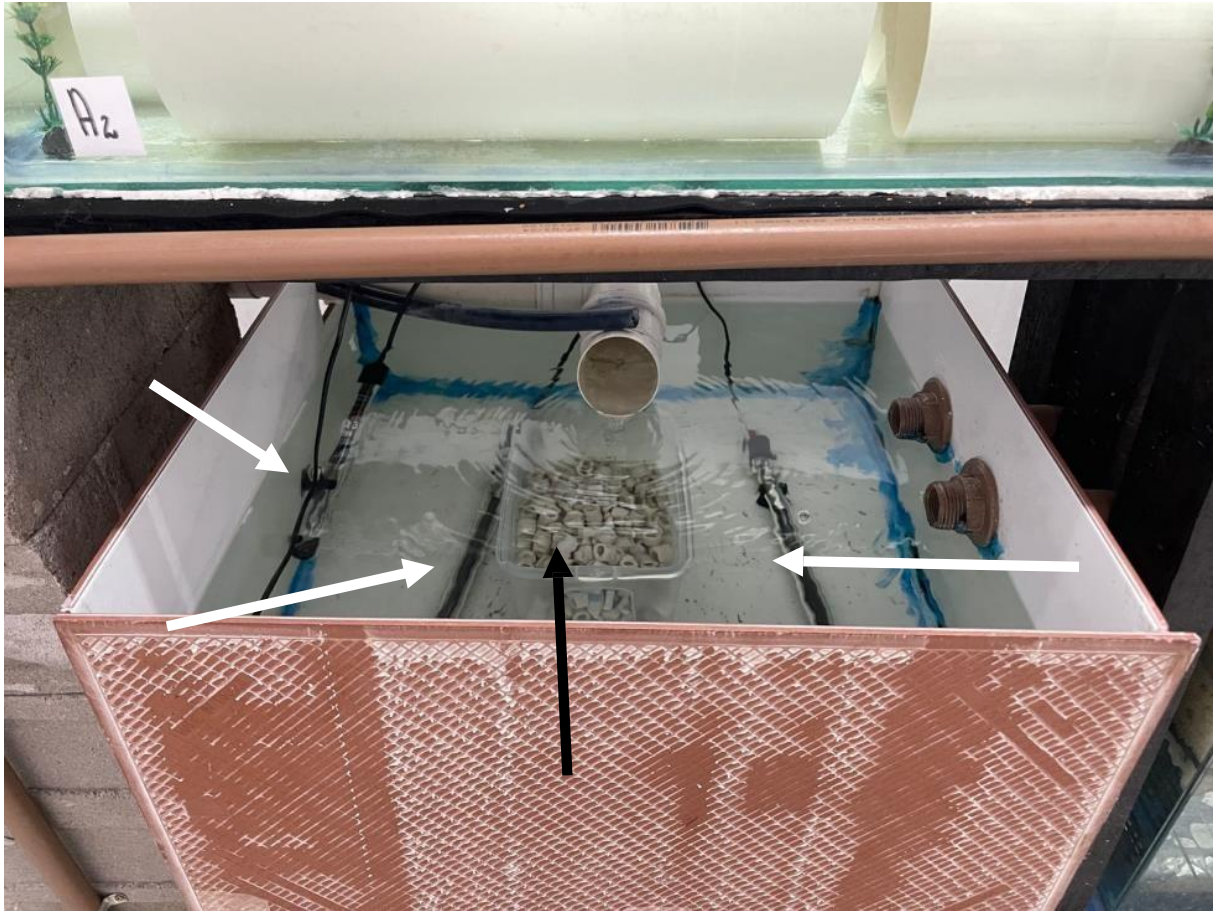


Figura 12 - Aquário de cerâmica com aquecedores (setas brancas) e uma caixa de mídias siporax (seta preta).
Fonte: autor

Salinidade e condutividade

A salinidade é expressa em partes por milhão (ppm), enquanto a condutividade é em microsiemens por centímetro ($\mu\text{S}/\text{cm}$). Essas medidas devem estar em valores que levem um excesso de energia gasto para a osmorregulação (Lawrence e Maison, 2012). A condutividade deve estar entre 300-1.500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, enquanto a salinidade deve se manter entre 0,5-1,0 ppm (Avdesh et al, 2012).

Nas condições do LaBex, a salinidade é medida com refratômetro manual e a condutividade com multiparâmetro Hanna HI9811-51, sendo adicionado sal marinho em caso de uma água com salinidade menor que 0,5 e TPA para diluição da água em caso de salinidade acima de 5 ppm conforme descrito em Lawrence e Maison (2012).

pH

O *zebrafish* é encontrado em águas naturais com pH variando de 5,9-8,1 (Engeszer, 2007). Em condições laboratoriais a variação de parâmetros deve ser evitada, sendo que o ideal para peixes de água doce é manter o pH entre 7,0-8,0 (Alabaster et al 1980).

Especificamente para o LaBex, a água de cultivo se mantém entre as faixas de 7,5 a 8,1, já houve tentativas de manter a água com um pH entre 7,0-7,5, porém por razões desconhecidas o pH se estabiliza em 7,9 muito rapidamente após troca intensa de água com adição de HCl a 3%. Para identificar o pH são usados testes colorimétricos da Labcon e medidor multiparâmetro Hanna HI9811-51.

Oxigênio dissolvido

Na piscicultura, o oxigênio dissolvido é um dos parâmetros limitantes para o desenvolvimento dos peixes, sendo necessário para culturas com densidades de até 45 kg/m³ a adição de oxigênio puro (Ebeling e Timmons, 2002).

Para uma cultura de *zebrafish* o ideal é manter os níveis de oxigênio acima de 4 ppm (Dammski et al., 2011), sendo a circulação da água do próprio sistema suficiente para manter esses níveis, podendo ser adicionado um aerador com pedra porosa no compartimento de filtragem biológica devido ao alto consumo de oxigênio ou em caso de falta de energia, onde bombas de aeração a pilha são adicionadas aos aquários individualmente.

No LaBex o oxigênio dissolvido é controlado por teste Labcon, e está em níveis adequados, visto a constante circulação de água do sistema. Também é adicionado mangueiras de aeração no compartimento das mídias para manutenção delas e intensificar a oxigenação.

Dureza

A alcalinidade serve para tamponar a água contra as oscilações do pH (Boyd, 2013), representando a medida de todas as bases tituláveis presentes na água, sendo necessário a manutenção entre 50-150 mg de CaCO₃/L (Avdesh, 2012).

A água utilizada no LaBex apresenta esse parâmetro com variações de causas desconhecidas. Por meio de teste padrão de dureza total GH Labcon, a água do sistema sempre foi classificada como muito mole. Porém, a partir do mês de janeiro de 2025 a dureza começou a aumentar e se encontra como semi-dura, uma boa condição para a espécie. Não se sabe

exatamente o motivo para essa variação, mas supõe-se que seja pela adição de sal marinho, para controle da salinidade, ao sistema.

Compostos Nitrogenados

Compostos nitrogenados são substâncias que contêm nitrogênio em sua estrutura química, sendo comumente produzidos em sistemas aquícolas por meio da excreção dos peixes, restos de alimento e matéria orgânica em decomposição. Em aquários de recirculação, esses compostos afetam diretamente a qualidade da água e o bem-estar dos organismos, podendo se acumular rapidamente se não houver filtragem e manutenção adequadas.

A amônia, um dos principais compostos nitrogenados, se apresenta em duas formas: a amônia não ionizada (NH_3) e a amônia ionizada ou amônio (NH_4^+). A proporção entre essas formas depende de fatores como pH, temperatura e salinidade da água (Ebeling e Timmons, 2002). A amônia não ionizada é a forma mais tóxica e deve ser mantida abaixo de 0,02 ppm para evitar danos aos peixes.

Durante o processo de nitrificação, a amônia é convertida em nitrito (NO_2^-), que também é tóxico em concentrações superiores a 0,1 ppm. Em seguida, o nitrito é oxidado a nitrato (NO_3^-), que é menos prejudicial, mas pode se tornar nocivo em níveis acima de 50 mg/L. O nitrato é removido periodicamente por meio das trocas parciais de água (TPAs) e da limpeza do fundo do aquário (Avdesh, 2012).

A identificação da quantidade de amônia e nitrito diluídos no sistema do LaBex é feita por teste colorimétrico Labcon, sendo que, após instalação do sistema de recirculação, o controle desses parâmetros não chegou a níveis em que foi necessária uma TPA intensa. A limpeza regular de filtros e aquários é eficaz para manutenção da qualidade da água, pois assim é possível reduzir a quantidade de material em decomposição no sistema.

Tabela 2 - Parâmetros a serem medidos, periodicidade, faixa a aceitável e ação corretiva a ser realizada para o cultivo de *D. rerio* nos sistemas da circulação e aquários individuais. Fonte: autor.

Parâmetro/atividade	Periodicidade	Faixa aceitável	Ação corretiva
Alimentação dos animais	3X ao dia Ração – 9h Alimento vivo- 12h Ração – 15h	-	-
pH	Diária	7,0 - 8,0	HCl ou NaHCO ₃
Salinidade e Condutividade	Diária	300 - 1500 µS/cm	Adição de sal marinho ou diluição da água do sistema
Temperatura	Diária	26 - 28,5 °C	Ajustar os aquecedores
Amônia	Diária	<0,02 ppm	Limpeza adicional de tanques por sifonamento e troca manual de água
Nitrito	Diária	<0,1 ppm	Limpeza adicional de tanques por sifonamento e troca manual de água
Oxigênio dissolvido	Semanal	> 6 ppm	Verificação de abertura dos tanques para a circulação de água
Dureza	Semanal	50 - 150 ppm de CaCO ₃	Dureza > 100 mg/L CaCO ₃ – Adição de água deionizada no Sistema
			Dureza < 50 mg/L CaCO ₃ – Adição de sais de carbonato e magnésio
Verificação de Mortalidade	Diária	-	-
Checagem de fluxo de água nos tanques	Diária	-	-
Limpeza de fundo de tanque (por sifonamento)	Diária	-	-
Limpeza total tanques	Semanal	-	-
Troca/Limpeza de lã de Perlon	2x por semana		
Limpeza de filtro de carvão ativado	Mensal	-	-
Troca de filtro UV	Anual	-	-
Fotoperíodo (14C:10E)	Diária	-	-

Biossegurança

A adoção de protocolos de segurança biológica se faz necessário em qualquer biotério de criação de animais, pois, o ambiente laboratorial já apresenta certo risco a saúde humana, decorrente de possibilidade de acidentes físicos ou produtos químicos. Em um biotério ainda existe o risco de contaminação biológica por bactérias, fungos, vírus ou parasitas (Kent et al, 2012). Para minimizar os possíveis riscos são necessários alguns cuidados, abordados individualmente a seguir.

Limpeza e desinfecção de equipamentos

O manuseio de equipamentos de limpeza, puçás, enriquecimento ambiental redes, baldes, mangueiras, peneiras e tudo o que envolve o cuidado e manipulação com os animais representam possíveis fontes de contaminação cruzada caso não sejam desinfetadas da maneira correta. O cloreto de benzalcônio associado ao azul de metileno são utilizados em produtos comerciais de desinfecção, além disso, uma alternativa mais barata e acessível é o hipoclorito de sódio a 1,98% por uma hora (Garcia e Sanders, 2011).

A adoção de baldes de uso contínuo com um cronograma de substituição do sanitizante é de eficiente ajuda no controle microbiano dos equipamentos. Embora ainda não utilizada, essa medida entra em vigor a partir desse ano.

Doenças e anomalias

Primeiramente, ressalta-se que a utilização de animais para experimentação deve ser feita com animais em bom estado. A falta dessa avaliação e seleção prévia pode acarretar vieses na pesquisa. Tendo isso em vista, em caso de doença visível ou algum sintoma de anormalidade, o animal deve ser eutanasiado.

Kutter et al. (2023) apresenta os sintomas clínicos associados a doenças em *zebrafish*, são eles: nado anormal; emaciação; protrusão 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. Tais sintomas indicam uma

infecção, que pode se proliferar em todo o sistema, logo, os animais que apresentam esses quadros devem ser eutanasiados.

Quarentena

Em uma criação de peixes, o monitoramento diário com atenção confere uma segurança em relação à saúde dos espécimes, quando um biotério adquire novos peixes, larvas ou embriões, há o risco de existirem patógenos nesses animais que podem levar a perdas no plantel original. Para que isso não ocorra, é necessário que haja um período de observação a esses novos animais (Matthews, 2002).

A unidade de quarentena deve atender alguns requisitos:

Ser mantida isolada das demais áreas;

Preferencialmente em uma sala separada;

Todos os equipamentos utilizados nessa unidade devem ser de uso exclusivo e identificados, evitando qualquer contato com materiais da instalação principal;

No LaBex, os animais podem ser mantidos em observação durante a quarentena, aguardando a manifestação de sinais clínicos ou mortalidade. É recomendável dedicar um tanque com sistema de circulação de água independente como unidade de quarentena, minimizando o risco de disseminação de patógenos durante a introdução de novos indivíduos. A quarentena pode durar de 3 a 4 semanas, sendo realizados testes por amostragem nos animais recebidos para garantir a saúde da colônia original. (Kutter et al, 2023)

Eutanásia

De acordo com a última edição do Dicionário Novo Aurélio Século XXI, eutanásia significa “1. Morte serena, sem sofrimento. 2 Prática sem amparo legal, pela qual se busca abreviar, sem dor ou sofrimento, a vida de um doente reconhecidamente incurável”. Para a realidade de um biotério, no qual a utilização de animais está sempre em ciclos de vida diferentes, sejam eles embriões, juvenis ou adultos, a forma como se deve tratar animais que estão doentes ou no fim de sua vida se torna um ponto a ser discutido sempre que necessário,

visto que técnicas são constantemente atualizadas e quanto menor for o sofrimento no fim da vida do animal, mais ético será esse momento. De acordo com Castro (2013), em cinco casos é necessário realizar eutanásia em peixes, sendo eles:

Término do experimento;

Obtenção de material como sangue e outros tecidos para fins científicos;

Quando os níveis de estresse, dor e sofrimento estão excedendo o previsto;

Quando os animais não estão mais aptos à reprodução;

Animais apresentando características não desejáveis ao biotério.

A RN nº 37 do CONCEA informa que “Um método adequado de eutanásia deve garantir a perda da consciência de forma rápida, irreversível e desprovida de experiência emocional ou física desagradável, ou seja, o animal não deve apresentar dor, estresse, apreensão ou ansiedade”. O Conselho Federal de Medicina Veterinária no Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais (2016), indica a imersão em doses elevadas de anestésico para peixes e anfíbios, sendo empregado no uso a benzocaína como principal substância usada no Brasil, e etomidato, metomidato e o 2-fenoxietanol. Para eutanásia em *zebrafish* é importante considerar o tamanho, como em peixes menores que 0,2g e larvas com menos de 72 h, o método utilizado pode ser a imersão em nitrogênio líquido, sendo maior o animal, ele deve ser anestesiado e congelado rapidamente, como indicado pelo CONCEA.

Para o LaBex, a utilização da benzocaína é a mais viável, sendo de fácil acesso e utilização, mas outros métodos podem ser adotados se necessário.

Descarte

As carcaças dos animais que são potencialmente um meio de contaminação que pode gerar danos à saúde pública e ao meio ambiente, como é no caso de animais usados em estudos de ecotoxicologia.

Cardoso (2002) indica que alguns destinos possíveis são aterros sanitários, autoclavação e incineração. O uso da compostagem como método alternativo também é possível em aves, por exemplo, visto que representa uma maneira econômica e ambientalmente correta de destinação da carcaças (Costa et al., 2006)

As carcaças devem ser mantidas sobre refrigeração, ensacoladas e devidamente identificadas (material biológico e contaminante se tiver) em freezer até o momento de seu descarte, seja ele qual for. Para animais que foram expostos a contaminantes, esses devem ser encaminhados ao destino correto de descarte de material biológico feito por empresas responsáveis. No LaBex essas medidas são seguidas.

ANEXO I

MANEJO E MANUTENÇÃO DE *Danio rerio* (ZEBRAFISH) NO LABORATÓRIO DE BIOEXPERIMENTAÇÃO-DCAB-UFES

Contatos de Emergência

Coordenação: Juliana Castro Monteiro Pirovani – julianacmonteiro@gmail.com (27) 98856 3510

Rogério Oliveira Faleiros – rogerio.o.faleiros@ufes.br (27) 99888 8746.

Equipe técnica: Carolina (27) 99631 8428; Ian (27) 99607 5187

Referência Normativa

CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. -- 1. ed. -- Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2023. 1107 p. ISBN: 978-65-5471-037-4

CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa CONCEA nº37, de 15 de fevereiro de 2018. Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – Concea. Diário Oficial da União. 2018; seção I, p. 5.

CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa CONCEA nº61, de 02 de maio de 2023. Dispõe sobre as condições que deverão ser observadas para a criação, a manutenção e a experimentação com peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União. 2023; seção I, p. 12.

OECD, Organization For Economic Co-operation and Development. 2000. OECD Fish, Juvenile Growth Test. Test Guideline No. 215.

OECD, Organization For Economic Co-operation and Development. 2013. OECD Fish Embryo Toxicity (FET) Test. Test Guideline No. 236.

OECD, Organization For Economic Co-operation and Development. 2019. OECD Fish Acute Toxicity Test. Test Guideline No. 203.

Sistemas de Criação e checagem de equipamentos

Sistema de criação: Os peixes são mantidos em sistema com recirculação de água (SUMP) que é continuamente filtrada e em aquários individuais. A capacidade do rack artesanal é de aproximadamente 380l (Figura 13). A água utilizada para o sistema é a mistura de água da torneira (poço artesiano) e água proveniente do SAAE (após repouso para decloração). A água deve ser estocada em um reservatório onde se adiciona sal marinho e solução de bicarbonato de sódio e carbonato de cálcio até que se atinja os valores ideais de condutividade e pH. Um conjunto de diferentes tipos de filtros são utilizados no sistema de recirculação de água: 1) mecânico: manta de lã acrílica (perlon) e espumas para retenção de partículas mais grosseira; 2) biológico: biocerâmicas e material plástico para fixação e crescimento de bactérias nitrificantes; 3) químico: filtro de carvão ativado para retenção de partículas finas (medicamentos, azul de metileno, primer); 4) filtro UV: possui ação bactericida. A água passa por esses quatro filtros, sequencialmente, durante o processo de recirculação. O excesso de alimento e fezes dos animais ficam retidos no filtro mecânico e no fundo dos aquários. O filtro biológico é responsável pela metabolização de compostos nitrogenados com o objetivo de manter níveis de amônia e nitrito em concentrações não tóxicas aos animais. A temperatura da água do sistema de recirculação e dos aquários individuais é mantida com aquecedores.



Figura 13 - Sistema de criação com recirculação de água. Fonte: autor

Checagem dos equipamentos

Ar-condicionado, aquecedores, timer (claro/escuro) e oxigenadores.

Procedimento de limpeza sistema recirculação

Os aquários devem ser limpos em etapas para não sobrecarregar a inserção de água no sistema. Para tanto seguir os seguintes passos: a) fechar o fluxo de água (entrada e saída) para o tanque a ser limpo; b) drenar o excesso de água por sifonamento; c) remover o tanque cuidadosamente; d) retirar os peixes com um puçá e repassar para um tanque/compartimento reserva preenchido com água do sistema; e) retirar a água do tanque e lavar o mesmo com a parte macia da esponja e água corrente; f) voltar o tanque para o sistema e abrir o fluxo de água; g) assim que o tanque estiver cheio colocar os animais novamente. Atenção: A esponja e o puçá devem ser exclusivos e ambos devem ser lavados em água corrente e desinfetados após o uso. Ou pode-se usar outro método. A) inserir no sistema uma quantidade de água, pensando na quantidade de TPA que vai ser realizada; b) desligar o overflow para que o aquário fique acima do nível de água estabilizado e fechar as torneiras; c) sifonar com mangueira o fundo tomando cuidado para que o primeiro furo do overflow não entre em contato com ar; d) por fim, ligar o overflow e as torneiras e) verificar se o sistema estará em equilíbrio de entrada e saída de água; f) verificar se a bomba está submersa.

Procedimento de limpeza dos tanques individuais

Este sistema pode ser limpo na sua totalidade, pois não há troca total de água dos aquários. Para tanto, seguir os seguintes passos: a) sifonar o tanque com mangueira exclusiva, retirando do tanque de 30 a 50% da sua água; b) completar com água nova. A limpeza desse sistema não requer a retirada dos aquários e nem dos animais, entretanto é recomendado que os aquários sejam completamente limpos quando houver acumulação de resíduos nas paredes. A limpeza dos aquários é feita com a parte macia da esponja. Atenção: A esponja e o puçá devem ser exclusivos e ambos devem ser lavados em água corrente e desinfetados após o uso.

Manutenção dos filtros

Os filtros do sistema devem ser verificados regularmente e trocados se necessário para garantir o abastecimento adequado de água para todos os aquários de peixes.

Filtro perlon: retirar a manta e lavar com um esguicho de água corrente, apertando e enxaguando em um balde até a água ficar transparente. Importante não esfregar o saco para não danificar a malha. Substituir a almofada de perlon por uma nova.

Filtros de carvão e biocerâmica: a) desligue o bombeamento de água sistema; b) remova as unidades de filtro (biocerâmica) do sistema sump; c) lave a biocerâmica nova com água declorada antes de inserir no aquário; d) ligue novamente o bombeamento de água do sistema. Obs: as mídias biológicas Ocean Tech k1 são autolimpantes, portanto só a passagem de água por elas é suficiente para sua limpeza.

Importante: Em um sistema aclimatado, as mídias serão o lar de várias bactérias nitrificantes. Estes microrganismos são essenciais para a manutenção do ciclo de nitrificação no interior do sistema, e remover o compartimento principal do filtro biológico (a biocerâmica suja) pode resultar em um pico de amônia grave, acompanhada por um pico de nitrito, enquanto o novo filtro biológico é restabelecido. Ambos estados intermediários do ciclo do nitrogênio podem ser tóxicos para os organismos aquáticos. Portanto, é importante manter sempre algumas biocerâmicas velhas no filtro biológico ao realizar a troca para permitir o repovoamento rápido destes microrganismos.

Filtro UV: utilizado para controlar os contaminantes biológicos como bactérias. Deve ser substituído anualmente. A dose de UV filtro para desinfecção é de ~ 110 mJ/cm² no início da vida da lâmpada. Por isso, é necessária a substituição do globo, mesmo quando ele ainda parece estar funcional. Para a troca da lâmpada, a) desligue o bombeamento de água do sistema e o filtro UV; b) remova a unidade de filtro UV cuidadosamente; c) retire toda água do encanamento; d) desconecte a lâmpada UV e substitua pela nova; e) coloque novamente a unidade filtrante no sistema; f) ligue a bomba para verificar se a água está fluindo para o filtro, sem vazamentos, e por fim ligue o filtro UV.

Retirada de peixes do Sump

peixes que escaparam dos tanques podem aparecer no sump. Esta inspeção deve ser feita diariamente e para a retirada dos animais deve-se: a) desligar o sistema; b) capturar os animais com puçá; c) alojar os peixes em um tanque identificado como “Peixes SUMP”. Importante cuidar para não misturar estes peixes com outros que têm o lote identificado.

Obs: A utilização do sistema de saída de água via Overflow Reverso Sifonado impede que acidentes assim aconteçam.

Compostos nitrogenados

Em relação aos compostos nitrogenados, as medidas de amônia total e nitrito devem ser verificadas utilizando-se kit Amônia Total água doce (*Alcon Labtest*) e Kit Nitrito (*Alcon Labtest*). Em caso de povoamento inicial do sistema ou quando chegar um lote grande de peixes, deve-se adicionar STABILITY® conforme as instruções do fabricante. Em casos de pico de amônia/nitrito, deve-se fazer renovação parcial da água de todo o sistema. Se este procedimento não reduzir a concentração dos compostos, ou caso estes parâmetros estejam com valores muito altos, deve-se adicionar AMGUARDTM ou PRIME® conforme as instruções do fabricante.

Limpeza dos utensílios

Cada sistema deve conter seu conjunto de utensílios (esponjas, mangueiras e baldes). Após a higienização dos aquários, todos os utensílios devem ser higienizados, a saber:

- a) Materiais que não absorvem e deterioram com cloro (vidraria, plásticos resistentes): lavar com água destilada, mergulhar em solução de hipoclorito de sódio (1,98%), enxágue com água destilada e secar naturalmente.
- b) Redes e puçás: água destilada, imersão em solução desinfetante para aquarismo (cloreto de benzalcônio e azul de metileno) e novo enxágue com água destilada.
- c) Quando possível, autoclavar os utensílios utilizados no manejo e criação dos peixes.

Troca Parcial de Água (TPA)

Quando necessário a realização de troca de uma grande quantidade de água, preferencialmente essa água deve ser retirada dos aquários que não possuem peixes. Uma troca maior de água se faz necessária em caso de altos níveis de compostos nitrogenados ou para manutenção do pH ideal. Essa TPA deve ser feita retirando a água por sifonamento e preenchendo com água nova, se atentando a temperatura da água.

Obs: Existe um compartimento no tanque de cerâmica onde estão os aquecedores, estes nunca devem ficar fora d'água e ligados na tomada ao mesmo tempo, desligue-os antes de qualquer troca de água em seu compartimento. Caso ocorra algum acidente ou ele esteja ligado sem estar submerso, não coloque o aquecedor na água nem deixe respingar água nele, apenas deixe-o esfriar em contato com o ar e após seu resfriamento ligue-o dentro d'água como de costume e observe.

Alimentação

O Peixe-zebra deve ser alimentado com ração seca (tamanho de alimento a partir de 100 micra para as larvas e 300/400 micras para peixes adultos).

A alimentação regular dos animais é essencial para sua saúde e reflete diretamente na capacidade reprodutiva deles, portanto, é **IMPORTANTE** que a escala de responsável pela alimentação seja respeitada e, caso ocorram imprevistos, os demais membros da escala sejam avisados para que outra pessoa ofereça a alimentação aos animais.

Para a alimentação é importante observar a quantidade de animais nos aquários, e se há animais para serem alimentados. Isso previne o acúmulo de sujeira no aquário pelo fato de ter mais ração do que o necessário, o que é prejudicial aos animais e aumenta a frequência de manutenção (limpeza) dos tanques. Desta forma recomenda-se os seguintes procedimentos: a) verificar se o tanque tem peixe alojado; b) reduzir o fluxo de água no tanque; c) abrir a tampa do tanque e fornecer a ração com uma colher, sem encostar a mesma na água; d) fechar a tampa do tanque; e) aumentar o fluxo de água novamente.

A quantidade de ração a ser fornecida, diariamente, é aproximadamente 5% do peso do peixe. Assim, é importante estimar o número de indivíduos por aquário e calcular a quantidade a ser ofertada ou disponibilizar aos poucos até a saciedade dos animais, identificada pela falta de interesse pela ração.

ANEXO II

ECLOSÃO DE *ARTEMIA SALINA*

Protocolo de eclosão

Os cistos de Artêmia são adquiridos comercialmente e podem ser mantidos em temperatura ambiente até o momento da abertura de seus recipientes. Posteriormente, devem ser armazenados a 4°C.

a) Para a eclosão, inserir 2-3 gramas de cisto em um litro de água deionizada misturada a sal marinho comercial (15g/L).

Como recipiente pode ser utilizado um béquer de 1 litro ou garrafa pet de 2 litros com o gargalo em V, facilitando assim a recolha, cortada a aproximadamente 2/3 a contar do topo.

b) O recipiente deve ser mantido em incubadora em uma temperatura de 24 a 27°C com luz constante e forte aeração.

c) Após 24 horas, os náuplios terão eclodidos e se encontrarão no fundo do recipiente.

Coleta

a) No caso da utilização do recipiente béquer, retirar os náuplios do fundo do recipiente com pipeta Pasteur, e no caso de garrafa invertida abrir a mesma e retirar o conteúdo do fundo.

b) Retirar os cistos presentes com auxílio de pipeta Pasteur e disponibilizar apenas os náuplios na ressuspensão para alimentação dos animais.

c) Lavar os náuplios em peneira de 25 µm para retirar o sal e resíduos e ressuspender em 20 ml de água do sistema ou água deionizada.

d) Disponibilizar aos organismos conforme protocolos alimentares para cada estágio de vida

e) Todos os procedimentos referentes à eclosão dos náuplios de Artêmia devem ser registrados no Caderno de Registro – Cultivo Alimento Vivo.

ANEXO III

CULTIVO DE MICROVERME DA AVEIA *PANAGRELLUS REDIVIVUS*

Meio de cultivo

O cultivo de microverme deve ser realizado em água deionizada (pH entre 7,5 – 8,5) enriquecida com farinha de aveia, formando uma pasta semissólida onde a cultura irá se desenvolver.

- a) Em um recipiente fundo (ex. pote de sorvete), inserir a farinha de aveia até cobrir todo o fundo e permanecer em uma altura de aproximadamente 1 cm. Não é necessário mais do que isso, tendo em vista que os microvermes se acumulam na superfície desta mistura.
- b) Inserir água deionizada com auxílio de uma pisseta até obter uma mistura homogênea com a consistência de uma pasta semissólida.
- c) Aguardar um minuto até que a aveia absorva o máximo de água. A consistência final da pasta não deve ser rala, porém deve ser menos densa que a consistência de um creme dental, por exemplo.
- d) Adicionar a cultura inicial em um volume de 0,5 a 2 g. A cultura pode ser espalhada pelo recipiente para facilitar a colonização dos microvermes no novo meio de cultivo.
- e) Em poucos dias, a cultura irá colonizar todo o recipiente e estará pronta para ser utilizada.

ATENÇÃO: O tempo médio entre os repiques de novas culturas é de 14 dias. Entretanto, a cultura deve ser renovada se forem observadas manchas marrons no meio de cultivo (que representam alta quantidade de excretas/alta densidade) ou a cultura se apresentar ressecada. Observar as características do cultivo 3 vezes por semana no mínimo;

Parâmetros físico-químicos

A água deionizada utilizada para realizar a mistura com aveia deve ter pH entre 7,5 – 8,5.

O cultivo deve ser mantido abrigado da luz, com tampa contendo pequenos furos ou perlon para a troca de oxigênio.

O cultivo deve ser mantido em uma temperatura de 24 – 27°C e como não é sensível às mudanças de temperatura dentro desta faixa, pode ser mantido na sala de cultivo de peixes em bancada, apenas com o cuidado de permanecer em local isolado, evitando contaminação ou contato com água.

Coleta dos microvermes e disponibilização para alimentação

- a) Retirar entre 2-3g do cultivo com o meio, de preferência das paredes do recipiente que é a parte do cultivo que contém menos aveia. Lavar o conteúdo em peneira de 25 μm para descartar o pouco de aveia ainda contida, que não é consumida pelos animais.
- b) Ressuspender o cultivo de microverme concentrado em 20ml de água deionizada e disponibilizar aos animais esse concentrado de acordo com as quantidades estabelecidas em cada protocolo alimentar.
- c) Todos os procedimentos referentes ao cultivo de microverme devem ser registrados no Caderno de Registro – Cultivo Alimento Vivo.

ANEXO IV

CULTIVO DE *PARAMECIUM*

Meio de cultivo

O meio de cultivo do *Paramecium* consiste em água deionizada enriquecida com leite em pó em uma concentração de 0,05 g/100ml e 0,0015g de spirulina em pó/100ml (fonte de nutrição essencial para esses organismos).

O cultivo deve ser realizado preferencialmente em frascos do tipo Erlenmeyer ou alternativamente em placas de Petri, respeitando as proporções dos nutrientes do meio.

Após preparado o Erlenmeyer com os nutrientes, inserir 10 ml de uma cultura concentrada de *Paramecium* ssp. (de até 200 organismos/ml). Para realizar a contagem utilizar microscópio óptico e câmara de Neubauer.

O cultivo chegará na fase Log em duas semanas e se manterá até um mês, onde deve ser feito um novo repique para meio de cultura novos.

Atenção: Recomenda-se o repique quinzenal das culturas, a fim de manter os organismos em fase de crescimento. Caso encontre alguma contaminação no cultivo, representada pela presença de outros organismos zooplancctônicos (ex. rotíferos), realizar uma renovação do cultivo selecionando apenas *Paramecium* ssp. realizando dessa maneira, a purificação gradual da cultura.

Parâmetros físico-químicos

O cultivo de *Paramecium* ssp. deve ser mantido em incubadora no escuro a 28°C.

A água de cultivo utilizada é água deionizada e deve estar em pH 8,0 e o cultivo deve ser mantido preferencialmente em Erlenmeyer com tampa de gaze ou papel alumínio com pequenos furos para a troca de oxigênio.

Coleta

- a) Disponibilizar diretamente 1 ml do cultivo em fase concentrada para cada 100 larvas nos cinco primeiros dias pós eclosão (5-10 dpf).
- b) Todos os procedimentos referentes ao cultivo de *Paramecium* ssp. devem ser registrados em Caderno de Registro – Cultivo Alimento Vivo.

CAPÍTULO 3 - REPRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O peixe-zebra (*D. rerio*), uma espécie de pequeno porte e fácil manejo, destaca-se como um modelo experimental ideal em biotérios devido à sua rápida maturação sexual alcançada em aproximadamente três meses, elevada taxa de fecundidade e produção de centenas de ovos por acasalamento. Com fecundação externa, seus embriões podem ser facilmente coletados e observados, o que facilita a manipulação experimental em estágios precoces do desenvolvimento (Kutter et al., 2023).

Apesar de seu amplo uso, os mecanismos de determinação sexual no *zebrafish* ainda não são completamente compreendidos. Diferente de muitas espécies, ele não apresenta cromossomos sexuais heteromórficos visíveis, sugerindo a ausência de um cromossomo sexual definido. Além disso, fatores ambientais como densidade populacional, níveis de oxigênio e disponibilidade de alimento podem influenciar a proporção entre machos e fêmeas em populações mantidas em cativeiro, reforçando o papel do ambiente na diferenciação sexual (Lawrence et al., 2008; Shang et al., 2006; Amores & Postlethwait, 1999; Pijnacker & Ferwerda, 1995).

Graças às suas características biológicas singulares e à constante evolução das tecnologias aplicadas à pesquisa, o peixe-zebra mantém-se como um organismo modelo poderoso e versátil, com grande potencial para impulsionar avanços significativos na biologia e na medicina. Seu uso continuará a moldar o futuro da ciência, contribuindo de forma decisiva para a compreensão dos processos relacionados à saúde e às doenças humanas (Mahanayak, 2024).

Nesse contexto, a reprodução em laboratório tem dois principais objetivos: garantir a reposição contínua de indivíduos para a realização de experimentos futuros e assegurar a manutenção de matrizes reprodutivas saudáveis, fundamentais para a sustentabilidade das colônias.

MATERIAL E METODOS

O estudo foi desenvolvido com o objetivo de padronizar os protocolos de cultivo, reprodução e desenvolvimento embrionário do peixe *D. rerio* (*zebrafish*), visando sua futura aplicação em bioensaios. A metodologia foi baseada em protocolos estabelecidos na literatura científica, adaptados à realidade estrutural e operacional do LaBex.

- O delineamento experimental incluiu:
- Seleção de reprodutores
- Observação de comportamentos sexuais e reprodutivos
- Coleta e incubação de ovos
- Registro e acompanhamento do desenvolvimento embrionário e larval
- Controle de variáveis ambientais como temperatura, fotoperíodo, densidade e qualidade da água.

O guia técnico elaborado também contemplou os protocolos específicos para reprodução da espécie, considerando aspectos como o isolamento prévio dos casais, as condições ambientais ideais e a estrutura física dos aquários do tipo *ZebClean* utilizados para a desova. O manejo foi planejado de modo a simular o ambiente natural da espécie, favorecendo o comportamento reprodutivo e otimizando a taxa de fecundidade.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Dimorfismo sexual

O *zebrafish* (Figura 14) é um peixe dioico, o macho apresenta aparência mais amarelada na parte ventral e com o corpo mais esguio, enquanto a fêmea possui uma protuberância ventral, sendo esse um dos fatores preponderantes para o dimorfismo sexuais e a coloração mais prateada (Spence et al., 2006).

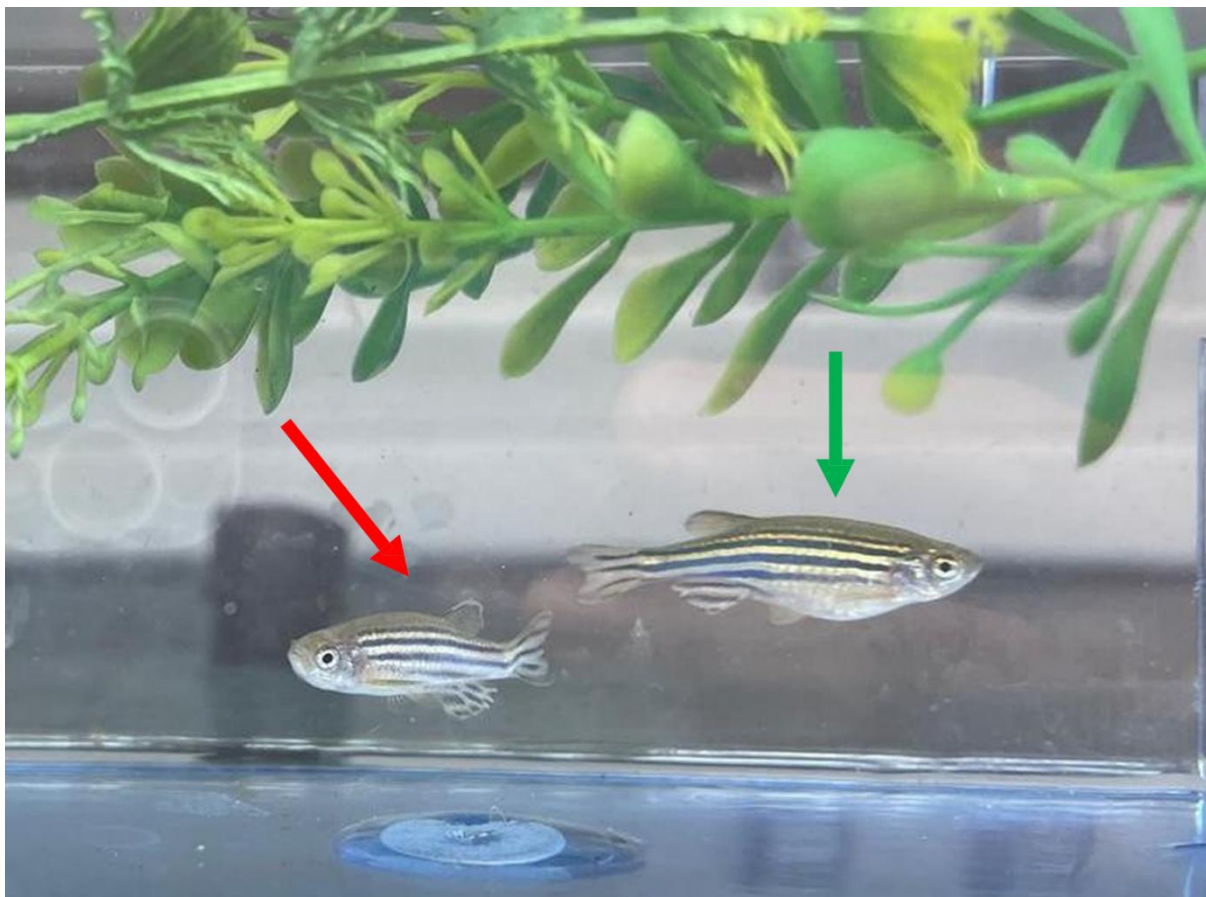


Figura 14 - *Zebrafish* macho com corpo esguio a esquerda, sinalizado por seta vermelha, e fêmea com protuberância ventral a direita, sinalizado por seta verde. Fonte: autor

Comportamento reprodutivo

Na natureza, a escolha do parceiro sexual pode se dar pela dominância de um gênero ou por competição macho-macho. No caso da espécie ocorrem os dois tipos de escolha, podendo uma se sobrepor a outra (Spence, Ashton e Smith, 2007). Segundo Spence et al (2006), existem evidências de uma fraca seleção sexual na espécie, constatado pela equivalência no sucesso reprodutivo entre fêmeas e machos.

O comportamento de cortejo envolve o macho perseguindo rapidamente a fêmea, frequentemente tocando a lateral de seu corpo com a parte frontal da cabeça e tentando guiá-la até um local de desova. Ele pode nadar ao redor ou à frente dela em círculos fechados ou em formato de oito e com as nadadeiras erguidas. Caso a fêmea não o acompanhe, o macho pode alternar entre circundá-la e nadar de um lado para o outro entre ela e o local de desova. Ao alcançar esse local, o macho nada próximo à fêmea, expandindo as nadadeiras dorsal e caudal para alinhar seus poros genitais.

Em seguida, ele pode oscilar o corpo em alta frequência e baixa amplitude, isso é, movimentos de forma rápida, porém com pequenos deslocamentos, como se estivesse tremendo levemente. Esses movimentos estimulam a fêmea a liberar os oócitos, enquanto o macho libera o esperma simultaneamente. Esse ciclo se repete ao longo do período de desova, com a fêmea liberando entre 5 e 20 oócitos por vez (Spence et al, 2008).

Em seu habitat natural, a desova dos peixes está limitada a um curto período pela manhã (Spence, Ashton & Smith, 2007), no qual ocorre a oviposição em um lugar onde existe menor risco de canibalismo ou ataque aos ovos por outros organismos aquáticos.

Desenvolvimento embrionário

Os ovos de zebrafish (Figura 15) são telolécitos transparentes, demersais e indivíduos adultos não apresentam cuidado parental com suas proles. Eles são depositados em zonas de vegetação rasas e com pouca movimentação da água.

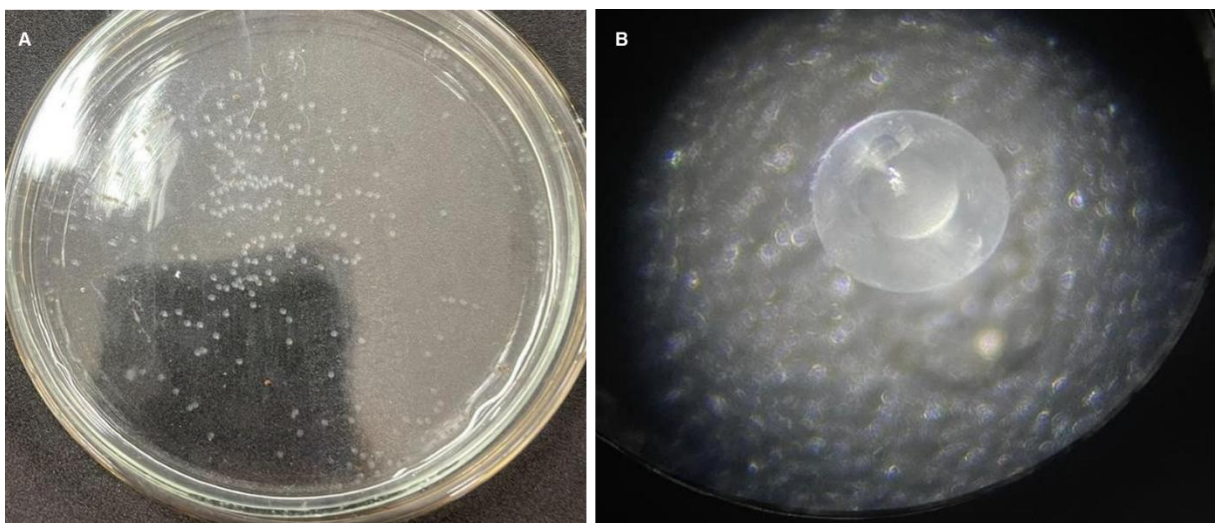


Figura 15 - Ovos em placa de Petri a esquerda na figura a; vista sob lupa (4x) de um ovo recém fertilizado na figura b. Fonte: autor.

O desenvolvimento de *D. rerio* tem duração de aproximadamente 96 horas e passa por oito estágios principais, representados nas imagens a seguir, que ilustram a sequência do desenvolvimento embrionário desde a fertilização até a eclosão e, em seguida, a larva recém-eclodida.

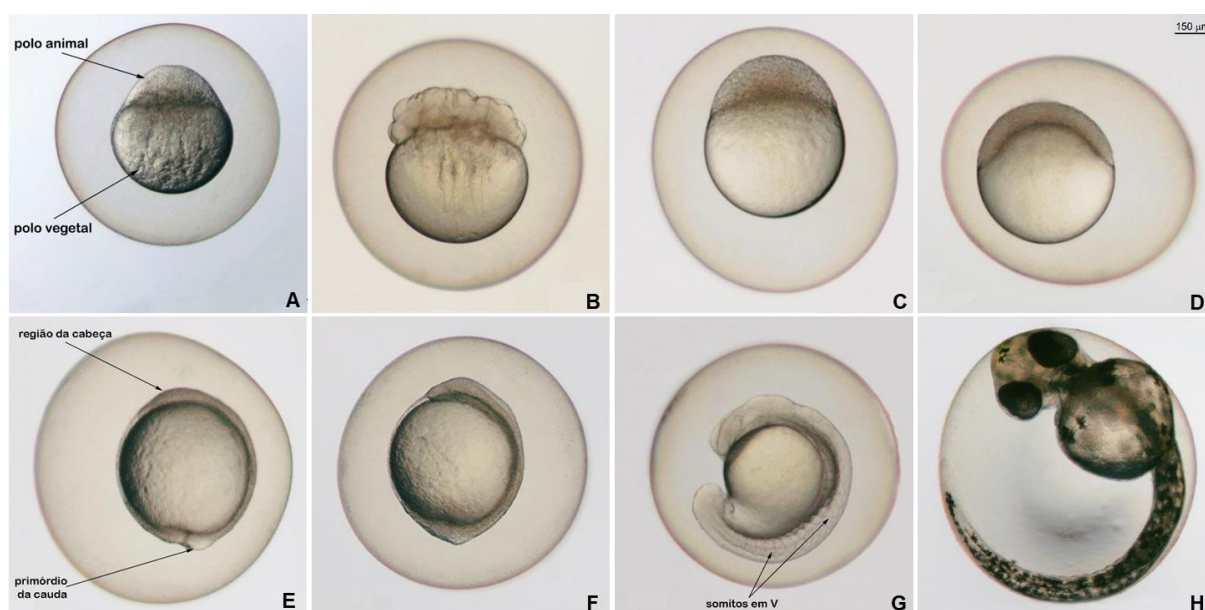


Figura 16 – Embriões de *Danio rerio* (A) Após a fertilização, ocorre a primeira divisão celular. O zigoto apresenta o polo animal na região superior e o polo vegetal ocupando a maior parte inferior da célula; (B) Fase de clivagem, caracterizada pela ocorrência de 2 a 7 ciclos celulares rápidos e sucessivos; (C) Fase de blástula oblonga, na qual ocorrem de 8 a 9 ciclos celulares, com o início do processo de epibolia; (D) Fase de blástula esférica, também com 8 a 9 ciclos celulares; (E) Fase de gástrula, estágio em que têm início os movimentos morfológicos de involução, convergência e extensão, que levam à formação do epiblasto, hipoblasto e do eixo embrionário, finalizando o processo de epibolia; (F) Fase de segmentação inicial (1 somito), marcada pelo início do desenvolvimento dos somitos, dos primórdios dos arcos branquiais e dos neurômeros; (G) Fase de segmentação avançada (14 somitos), com formação de estruturas embrionárias mais definidas; (H) Fase de eclosão no estágio long-pec sob vista dorsal, quando os principais sistemas de órgãos já estão formados e se observa o desenvolvimento da cartilagem cefálica e das nadadeiras peitorais. Fonte: Modificado de Quintaneiro et al., 2022.

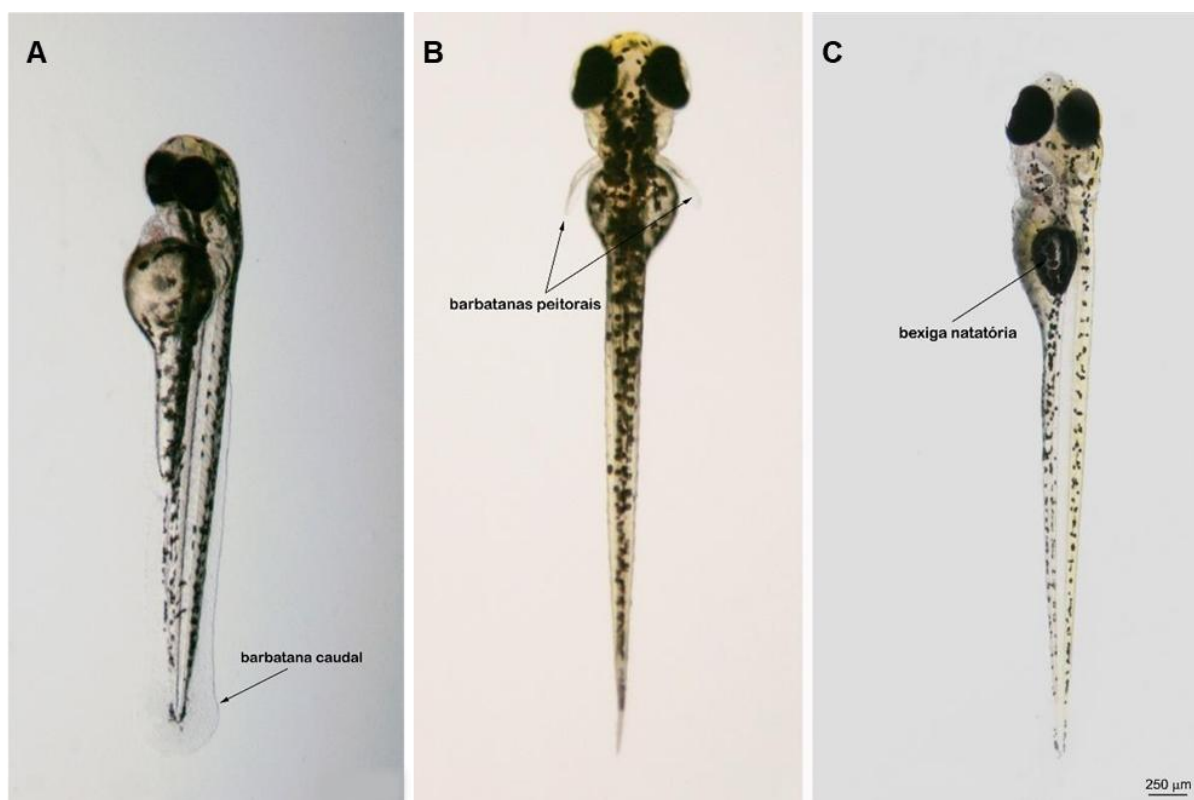


Figura 17 – Embriões de *D. rerio*. (A) Fase de eclosão, com a larva no estágio pec-fin, vista lateralmente; (B) Período da larva inicial, quando a bexiga natatória começa a se inflar e a larva inicia comportamentos como alimentação e evitamento; (C) Larva inicial, observada sob vista lateral. Fonte: Modificado de Quintaneiro et al., 2022.

O mecanismo genético de diferenciação sexual na espécie ainda permanece desconhecido. Porém, sabe-se que a diferenciação sexual de machos se inicia aproximadamente entre cinco a sete semanas após a eclosão da larva, de um estágio de gônadas intersexuais para um testículo normal por volta do terceiro mês de desenvolvimento, a depender de sua linhagem e das condições de manutenção dos animais (Devlin e Nagahama, 2002; Maack e Segner, 2003).

Reprodução em biotério

A reprodução feita em ambiente laboratorial visa simular as condições e aspectos naturais do ambiente do organismo para que exista uma boa fecundação, alta viabilidade de ovos e condições para que se possam utilizar os novos peixes em futuros bioensaios em suas fases de desenvolvimento, sejam eles embriões, larvas, juvenis ou adultos. Para realização de uma reprodução eficiente é necessário que os fatores ambientais de fotoperíodo, volume de água no aquário, temperatura, densidade de peixes e enriquecimento ambiental como plantas e

substratos sejam respeitados (Blanco-Vive e Sánchez-Vázquez, 2009; Lawrence. 2007; Goolish et al.1998; Sessa et al. 2008).

Essa espécie apresenta maior volume de desova no período da manhã, sendo essencial o contato físico entre macho e fêmea logo após o acender das luzes. Por esse motivo, os casais são separados na tarde anterior à oviposição, sendo reunidos apenas no momento da reprodução.

A reprodução ocorre em aquários do tipo ZebClean, contendo de dois a três litros de água do sistema de recirculação. O volume de água não representa uma limitação, pois os aquários utilizados sempre ultrapassam o volume mínimo de 200 ml, identificado por Goolish et al. (1998) como crítico para a baixa produção de ovos. Além da água, são adicionadas plantas plásticas e esferas de vidro (popularmente conhecidas como bolinhas de gude ou petecas de vidro) para simular o ambiente ideal para a desova (Figura 17).



Figura 18- Aquários de reprodução montados sob bandeja de plástico com água e aquecedor a 28°Cm (vista de cima). Nos aquários estão os peixes, placas de separação, plantas de plástico e bolinhas de gude (vista de cima).
Fonte: autor.

Os aquários são postos em banho-maria a 28°C em bandejas de plástico com aquecedores com termostato (Figura 18) e no dia seguinte ao acender das luzes a placa de separação é retirada e os peixes dão início ou continuidade ao comportamento de corte, sendo também necessário retirar um pouco de água do aquário para simular o ambiente mais raso. Cerca de 30 minutos a 1 hora após o acender das luzes, é possível observar se houve postura de ovos ou não, caso ainda haja comportamento de corte recomenda-se deixá-los por mais tempo até no máximo 2 horas.

O tempo pode variar a depender da finalidade que os ovos serão utilizados. Em caso de uma reprodução para manutenção de matrizes ou experimento com juvenis/adultos esse tempo de 2 horas é aceitável, mas em casos de experimentação com embriões ele é reduzido.

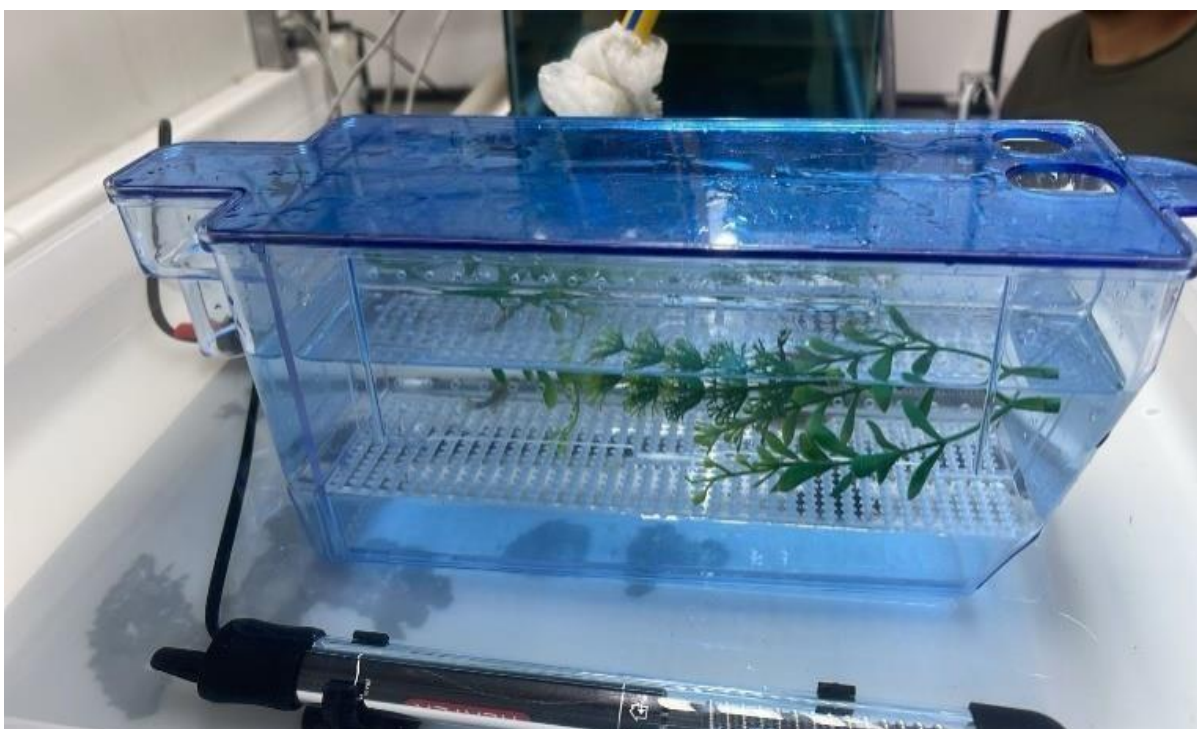


Figura 19- Aquário de reprodução com peixes tampado sob bandeja de plástico com água e aquecedor com termostato a 28°C (vista lateral). Fonte: autor.

Com auxílio de uma pipeta Pasteur, os ovos são retirados do fundo dos aquários (Figura 19) para serem lavados em peneira de inox, de forma delicada, com água destilada ou Meio Embriônico E3 (sua preparação está descrita no Anexo VI). O meio E3 é uma solução salina composta por NaCl, KCl, CaCl₂ e MgSO₄, que simula as condições ideais para o desenvolvimento embrionário do *D. rerio*, mantendo a estabilidade dos parâmetros físico-químicos e prevenindo contaminações. Após a lavagem, os ovos são realocados em placas de Petri preenchidas com meio E3, mantidas a 28 °C em BOD, com densidade máxima de 50 ovos por placa.



Figura 20- Ovos no fundo de aquário de reprodução, mostrando que são demersais e sendo sinalizados por setas vermelhas. Fonte autor.

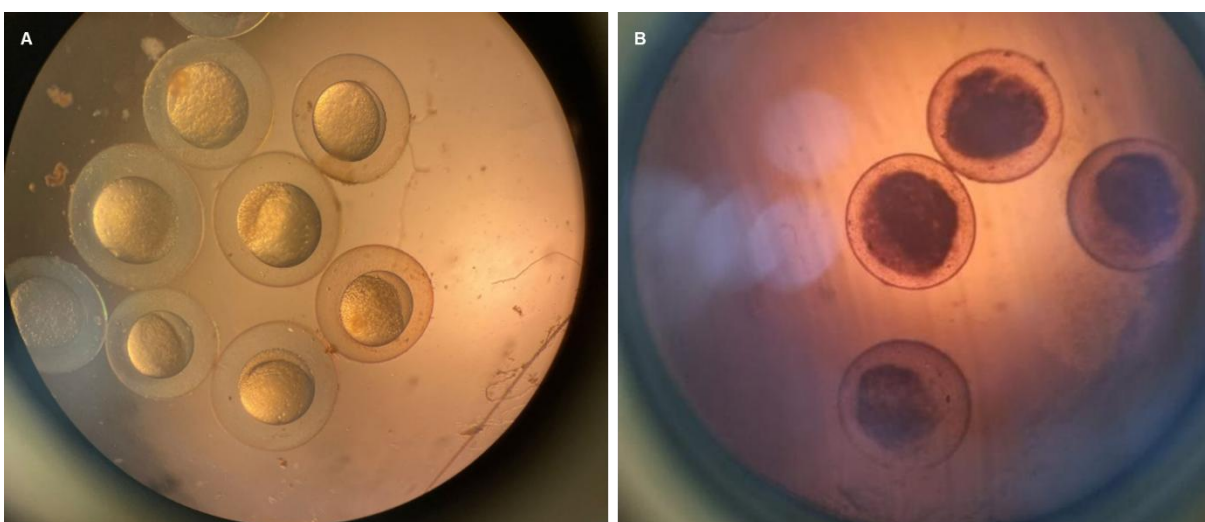


Figura 21 – (a) Ovos de *D. rerio* vistos sob microscópio (4x); (b) Ovos coagulados vistos sob microscópio (4x).
Fonte: autor.

Após 24 horas, é possível identificar a olho nu embriões que não estão viáveis pela sua coloração esbranquiçada devido à coagulação das células (Figura 15b), esses ovos devem ser retirados da placa e descartados. O restante dos ovos com desenvolvimento viável deve ficar em repouso e seu meio deve ser trocado diariamente até o terceiro dia (Figuras 16), momento em que as larvas devem ser transferidas a um aquário na proporção de 100 larvas por litro. Essa metodologia de reprodução e larvicultura foi adaptada para a realidade do LaBex com base no Manual de Criação em Biotério (Dammski et al, 2011).

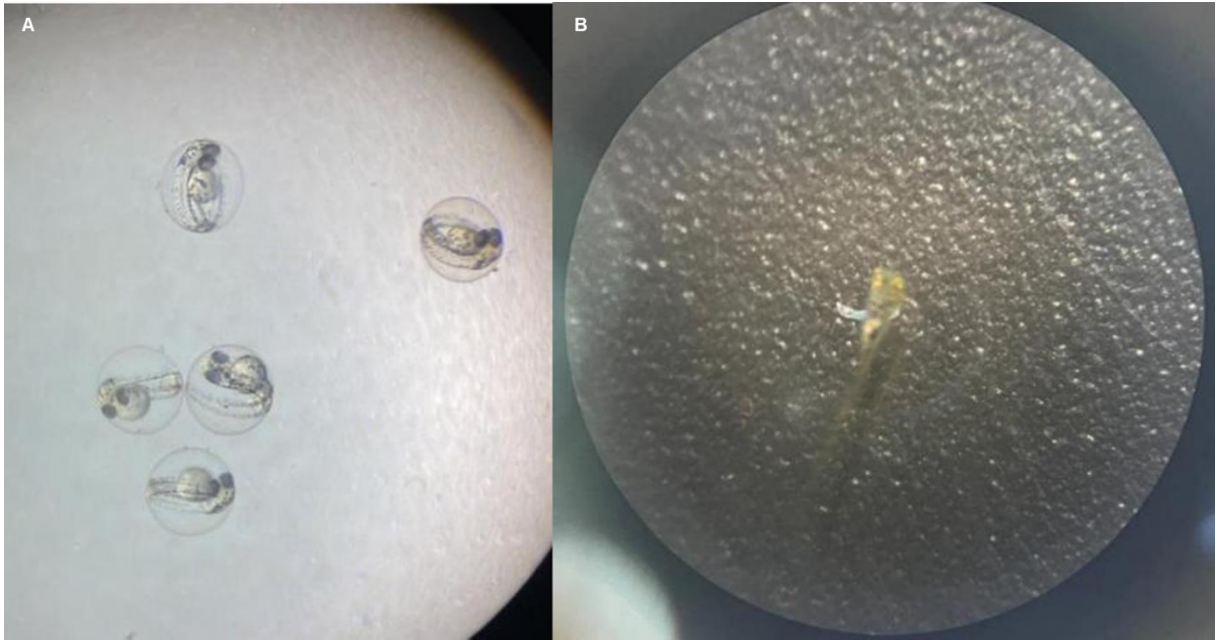


Figura 22 - Larvas em fase de eclosão na figura a, vista sob lupa (4x); larva recém eclodida na figura b, vista sob lupa (4x). Fonte: autor.

ANEXO V
REPRODUÇÃO E LARVICULTURA

Controles e referências: Para validar a reprodução e dar continuidade a criação de juvenis até o tamanho utilizado para os testes de toxicidade aguda referentes à normativa OECD 203 – Fish Acute Toxicity Test usar como referência os dados da Tabela 04.

Tabela 3 - Referências dos parâmetros para a reprodução. Fonte: autor

Descrição	Mínimo de
Número de ovos por matriz	100
Viabilidade da desova (porcentagem de ovos fecundados)	80%
Sobrevivência de larvas (4 dpf – 21 dpf)	70%

Viabilidade de desova ou sobrevivência larval menores que 80% e 70%, respectivamente, indicam que a prole não está em condições saudáveis para a manutenção da criação e posterior utilização destes animais em testes de toxicidade. Caso os animais apresentem, portanto, valores de referência abaixo dos recomendados neste item, realizar primeiramente uma investigação da qualidade da água. Os parâmetros físico-químicos passíveis de investigação e suas faixas aceitáveis estão contidos na Tabela 2. Caso os parâmetros não estejam em conformidade, verificar na mesma tabela a ação corretiva. Caso os parâmetros estejam em conformidade, solicitar a presença do médico veterinário para a investigação de possível patologia no lote de matrizes.

Todos os registros referentes à etapa reprodutiva, assim como o histórico de desovas de cada matriz, devem ser mantidos no Caderno de Registro – Reprodução.

Todos os registros referentes à larvicultura devem ser registrados no Caderno de Registro – Larvicultura.

Matrizes reprodutivas

A maturação sexual do *zebrafish* ocorre em aproximadamente 90 dias após a fertilização (dpf), e a partir de então, se mantidas condições adequadas de qualidade da água e nutrição, a reprodução se mantém em níveis ótimos em um período de 06 meses a um ano após a primeira desova. Assim, para ser considerada matriz reprodutiva, os animais devem possuir mais de 90 dpf e um tamanho que varia entre 2,5 e 4 cm. Antes dos testes reprodutivos, é essencial que o animal esteja com sua saúde e bem-estar atestados pelo médico veterinário responsável.

As matrizes reprodutivas podem ser adquiridas de fornecedores externos cadastrados e devem passar por aclimação padrão antes de serem utilizadas nos primeiros testes reprodutivos. Sempre que adquiridas novas matrizes, além da aclimação à sala de cultivo, esses animais devem passar no mínimo 15 dias, em grupo misto (machos e fêmeas), sendo alimentados em regime específico para a otimização da reprodução, descrito nos próximos tópicos e na Tabela 3. Após a aclimação, os peixes devem ser transferidos para o Sistema de Recirculação.

Alimentação das matrizes

Para alimentação das matrizes é disponibilizado como alimento-base a ração SuperVit® e como alimento complementar a ração OVOVit®. A alimentação com rações secas comerciais se dá pela manhã e pela tarde em horários e quantidades especificados na Tabela 5. O horário de alimentação possui uma tolerância de 30 minutos para mais ou para menos. Uma vez ao dia, obrigatoriamente, deve-se retirar a comida ao fundo dos aquários onde estão presentes os animais, através de sifonamento sutil com mangueira fina. O horário recomendado para essa limpeza é às 10h, uma hora após a primeira alimentação dos animais. As rações secas devem permanecer bem fechadas e devem ser administradas aos animais com pás específicas para tal. Evitar utilizar as mãos ou objetos molhados que favoreçam o contato com a umidade e, conseqüente, contaminação do alimento. Um resumo do regime alimentar dos adultos reprodutores está presente na Tabela 5.

Tabela 4- Regime alimentar das matrizes reprodutoras. Fonte autor.

Horário	Tipo de alimento	Especificação	Quantidade
9h	Ração comercial seca	Mistura 1:1 ração Supervit® e Ração OVOvit®	~ 0,05 g por aquário pequeno (3 litros)
12h	Alimento vivo	Náuplios de artêmia recém eclodidos	2 ml de náuplios (ver Apendice D)
17h	Ração comercial seca	Mistura 1:1 ração Supervit® e Ração OVOvit®	~ 0,05 g por aquário pequeno (3 litros)

Monitoramento dos parâmetros físico-químicos

Uma série de parâmetros físico- químicos e atividades devem ser monitorados no Sistema para que se mantenha a qualidade da água, essencial para o sucesso reprodutivo. Estes parâmetros estão descritos na Tabela 2. Todas as informações sobre qualidade da água deverão ser registradas no Caderno de Registro – Qualidade da água Sistema.

Sexagem dos animais

A sexagem deve ser realizada no momento da montagem da matriz e a diferenciação dos animais em machos e fêmeas ocorre da seguinte maneira: os machos possuem o corpo mais alongado, barbatanas anais mais amareladas e maiores. Por outro lado, a fêmea possui um tamanho de corpo maior, é mais escura e são identificadas principalmente pela forma do corpo mais arredondada e pela presença de uma pequena papila genital a frente da zona de implementação anal.

OBS: As duas diferenças principais entre fêmeas maduras e aptas para a reprodução e fêmeas com ovos obstruídos são: 1) as fêmeas maduras logo após o cortejo na manhã seguinte tendem a desovar e perdem um pouco a característica do abdômen proeminente; 2) As fêmeas com ovidutos obstruídos não desovam e vão ficando cada vez mais inchada e, muitas vezes, se observa um edema na região do início do oviduto. Nesse caso, é possível fazer uma massagem abdominal para desobstrução do oviduto ou apenas descartar a fêmea das matrizes reprodutivas.

Montagem dos aquários de reprodução

As matrizes devem ser montadas, preferencialmente, em proporção um macho para uma fêmea (1:1) em aquários menores (capacidade de 3 litros). Alternativamente, as matrizes podem ser montadas com proporção de dois machos para uma fêmea (2:1) ou outra proporção devidamente identificada.

Uma das características da espécie é a ingestão dos ovos quando se sentem ameaçados. Portanto, para evitar esse comportamento e aumentar os estímulos durante a reprodução, é necessário implementar aparatos reprodutivos para a coleta de ovos (peneiras ou divisória de acrílico).

Alguns tipos de aparatos reprodutivos possuem divisórias, para que os machos sejam separados das fêmeas até o dia seguinte, quando ocorre a corte e a desova.

Os animais devem ser inseridos nos aparatos reprodutivos, preferencialmente, ao final da tarde, entre 16h e 17h30.

Para montar os aquários para reprodução, realizar o seguinte procedimento:

- a) com auxílio de um aquecedor com termostato, montar um “banho-maria” a 28°C em uma bandeja (40 X 30 X 7,5cm) e inserir o aquário de reprodução;
- b) inserir água no aquário;
- c) Medir pH, condutividade e oxigênio dissolvido da água antes de inserir os animais e fazer os ajustes necessários de acordo com a Tabela 2;
- d) Inserir vegetação (artificial ou Elodea) no aquário para enriquecimento ambiental;
- e) Retirar matriz do tanque e inserir no aquário de reprodução;

A sobrevivência, bem-estar e reprodução do *zebrafish* são totalmente dependentes de fotoperíodo, dessa forma, a sala de cultivo deve obrigatoriamente ter um fotoperíodo programado de 12 a 16 horas de luz (12 a 8 horas escuro).

Os animais pernoitam no aparato reprodutivo e a desova ocorre através de estímulo luminoso, no início da manhã, em um intervalo de uma a duas horas após o acionamento das luzes. O acionamento automático das luzes na sala de cultivo de peixes ocorrerá às 7:00 da manhã.

Imediatamente antes do acionamento das luzes, deve-se retirar as divisórias do aparato reprodutivo, se for o caso, e realizar também a retirada de um volume de água com mangueira fina, a fim de manter uma coluna d'água mais rasa, de aproximadamente três centímetros. A coluna d'água rasa também é um estímulo para a liberação de ovos pela fêmea. Alternativamente, pode inclinar o aquário para que um dos lados fique com uma coluna d'água mais rasa.

Realizar o processo de retirada da divisória e sifonamento de água de forma delicada e silenciosa para evitar o estresse dos animais. Preferencialmente manter a sala de cultivo vazia após esse momento, e voltar a realizar as atividades apenas após a retirada dos ovos.

A fertilização dos ovócitos é externa, e cada fêmea produz aproximadamente de 100 a 300 ovos por reprodução, não havendo cuidado parental dos embriões.

Manejo das matrizes

As matrizes devem ser mantidas em aquários do sistema de recirculação com uma etiqueta (fita crepe) contendo o nome que é representado pela letra M e o número do grupo (ex. M1, M2, M3), a data da última desova e o número de ovos produzidos pela última desova (ex. M1 - 15/05/24 - 200 ovos).

O tempo mínimo de descanso da matriz reprodutiva é de uma semana, podendo, portanto, voltar a ser utilizada para a produção de ovos na semana seguinte à última desova.

O tempo máximo de descanso da matriz reprodutiva é vinte dias, devendo ser estimulada novamente para que não haja entupimento de ovidutos e, conseqüente, prejuízo a reproduções futuras.

Reposição de matriz reprodutiva pode ser realizada através de obtenção de animais através de fornecedores locais ou utilização de adultos crescidos da própria criação no laboratório. Entretanto, é importante uma entrada mínima de animais (20% a cada reposição de nova matriz) vindo de cultivos externos (fornecedores locais), para evitar viés genético e perda de variabilidade genética no cultivo.

Coleta e manutenção dos ovos:

Os ovos de *zebrafish* são demersais e não adesivos, e permanecem ao fundo do tanque ou do aparato artesanal, protegidos através das telas contidas nos aparatos.

Após 1-2 horas do acionamento das luzes, é possível realizar a coleta dos ovos:

a) Retirar as matrizes para outro recipiente e despejar delicadamente o conteúdo do tanque e/ou aparato em uma peneira redonda de 100-200 μM .

b) Após coletar os ovos através peneira, lavar os mesmos (ainda na peneira) com auxílio de uma pisseta com água deionizada, para a retirada de restos de ração, alimento vivo e/ou fezes contidas nos ovos.

c) Os ovos fecundados são característicos a olho nu pelo seu formato esférico e coloração transparente, mas podem ser confirmados em lupa ou microscópio (ampliação 20 e 40X, respectivamente) através da observação

d) de divisão celular. A Figura 23a e 23b demonstra a diferença macroscópica de ovos não fecundados e ovos fecundados, além de uma visualização do ovo fecundado na lupa;

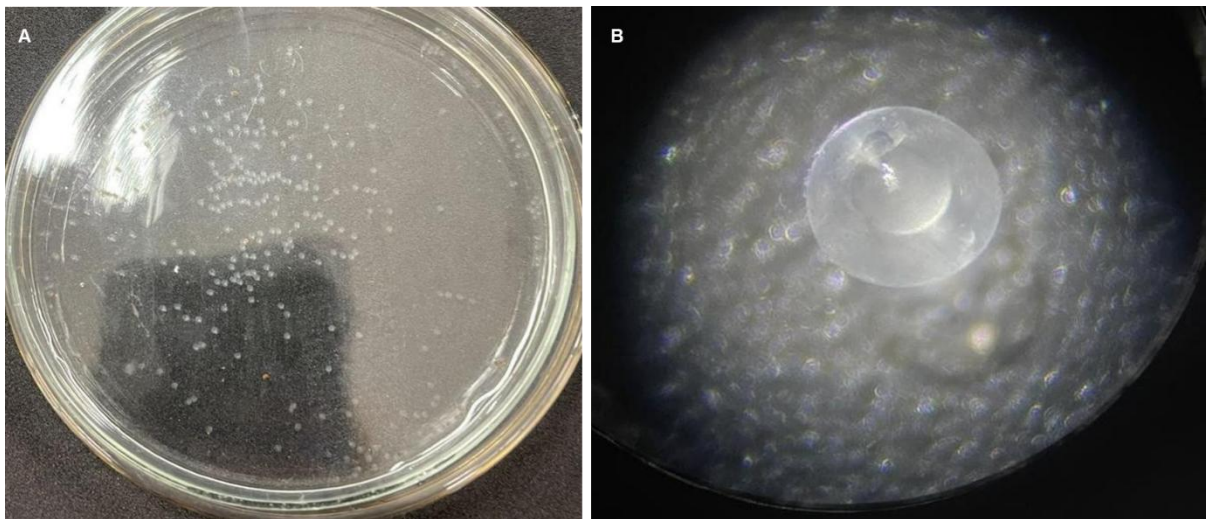


Figura 23 – (a) Ovos fecundados, em formato esférico e coloração transparente (visão macroscópica); (b) Ovo fecundado (microscópio lupa) com coloração transparente. Fonte: autor

e) Após a confirmação dos ovos fecundados, transferi-los, com auxílio da pipeta, para uma placa de Petri (autoclavada) contendo 30 ml de meio E3 (50 ovos por placa). O protocolo para a produção de solução estoque e solução trabalho do meio E3 está presente no anexo VI. Nomear as placas de Petri com o nome da matriz, que é representado pela letra M e o número do grupo (ex. M1, M2, M3), a data e o número de ovos (50 ou menos).

f) Anotar no Caderno de Registro – Reprodução o nome da matriz utilizada, data, número de ovos totais e número de ovos fertilizados, para manter o histórico de utilização e rendimento das matrizes reprodutivas.

g) Manter os ovos em Incubadora a 28°C no escuro, até o momento da eclosão (3 dpf). Para a incubação dos ovos, não é necessário nenhum tipo de aeração, somente a troca do meio diariamente.

h) De quatro a seis horas após incubação dos ovos, observar as placas e retirar possíveis ovos não fecundados e/ou coagulados. Após essa limpeza, manter os ovos na incubadora escura até 3 dpf, que é o momento da eclosão.

Larvicultura

A partir do momento da eclosão (3 dpf), inicia-se o processo de larvicultura e os registros de sobrevivência larval, que é um valor de referência para a viabilidade do lote de organismos criados. Todos os dados referentes à sobrevivência larval, regime de alimentação, troca de aquários, qualidade da água da larvicultura devem ser anotados no Caderno de Registro – Larvicultura.

A partir de 3 dpf os animais já são considerados vertebrados e cobertos pelas normativas referentes à CEUA. Dessa forma, inicia-se o acompanhamento do lote pelo médico veterinário responsável.

Os seguintes procedimentos devem ser seguidos:

- a) As larvas devem ser mantidas em incubadora a 26°C, com fotoperíodo 14C:10E.
- b) No primeiro dia de eclosão (3dpf), as larvas permanecem imóveis e com baixa capacidade de resposta a estímulo. Dessa forma, é recomendado que elas permaneçam na placa de Petri e sejam remanejadas para aquários maiores no dia posterior (4dpf).
- c) Preparar os recipientes (aquários menores) com água de cultivo (água desclorada) com mesmas condições físico-químicas exigidas para o Sistema de recirculação e Paramecium. Colocar aeração fraca no recipiente e deixá-lo overnight na mesma incubadora das larvas.

d) No dia seguinte (4dpf), observar as larvas nas placas de Petri. Será evidente a movimentação, resposta ao estímulo e resposta à luz dos animais. A partir daí, inserir as larvas nos recipientes, delicadamente, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, em uma densidade de 100 larvas por litro. A fixação das larvas nas paredes do recipiente nos primeiros dias é normal, visto que o animal tem esse comportamento dias após a eclosão, antes de começar o nado livre na coluna d'água.

e) As larvas até 5dpf se alimentam apenas do vitelo remanescente no ovo, não sendo necessária alimentação até esse momento. Dessa forma, o primeiro dia das larvas no recipiente (4dpf) não deve ser acompanhado de alimentação.

f) A partir do primeiro dia de alimentação, já nos recipientes, é realizada, diariamente, a limpeza, através da retirada de 50% do volume de água com auxílio de uma mangueira fina.

g) A retirada da água deve ser realizada com auxílio de um pote para a retenção da água descartada, para a posterior verificação da presença de larvas no balde de descarte. Caso haja larvas, retirar delicadamente com auxílio de pipeta Pasteur e colocar de volta no recipiente.

h) Com 50% do volume de água, ainda com auxílio da pipeta Pasteur, retirar o excesso de fermento e ração do fundo do recipiente;

i) Inserir 50% de água nova (desclorada em temperatura de 26° C e condições físico- químicas presentes na Tabela 2) e voltar os recipientes para a incubadora.

j) Ajustar a aeração dos recipientes na incubadora.

k) Em 5 dpf, iniciar o protocolo de alimentação larval 1 (Tabela 6), que é disponibilizado aos animais nos cinco primeiros dias de alimentação externa, ou seja, dos 5 aos 10 dpf (três alimentações por dia, nos horários recomendados de 8h, 12h e 17h):

i. Pela manhã (9h) e pela tarde (15h) oferecer: a) Fermento biológico diluído em água, em uma concentração de 1ml/100 larvas e b) ~ 0,2 g de ração Alcon Alevinos peneirada/100 larvas;

ii. As 12h, oferecer alimento vivo, que consiste em a) 1ml de *Paramecium* ssp. /100 larvas e b) 1ml do microverme *Panagrellus redivivus* / 100 larvas;

OBS: Detalhes sobre as quantidades e proporções dos alimentos estão especificados na Tabela 6 e os cultivos de microverme e *Paramecium* estão especificados nos anexos III e IV, respectivamente.

l) Após 10 dpf os animais devem passar por troca total de água, e para uma densidade de 50 animais por litro (novos recipientes). A passagem dos animais é realizada com auxílio de pipeta Pasteur.

m) De 10 a 21 dpf é iniciado o protocolo de alimentação 2 (Tabela 6), onde a quantidade de alimentação é modificada para 1 ml de fermento/50 larvas, e ração Alcon alevinos não precisa mais ser peneirada, podendo ser misturada diretamente no fermento (0,2g).

n) A partir de 10 dpf os animais passam a se alimentar apenas de microverme, não sendo necessária a alimentação com *Paramecium ssp*. A quantidade de microverme passa a ser 1 ml/50 larvas.

o) Com 21 dpf, os animais são retirados do recipiente das incubadoras e são inseridos nos aquários do Sistema de recirculação, em uma densidade de 10 animais por litro. Considerando que os juvenis têm um peso médio de 0,05g os animais permanecem em uma densidade inicial de 0,5g/L. A capacidade máxima permitida é de 0,8 gramas de animais por litro.

p) Para a alimentação dos juvenis oferecer: ração Alcon Alevinos (0,2 g por aquário de 3 litros) e alimento vivo (1 ml de náuplios de artêmia recém eclodidos).

Tabela 5 - Condições de acomodação e alimentação de ovos, larvas e juvenis de *D. rerio*. Fonte: autor

Idade	Recipiente	Acomodação	Densidade	Alimentação	Quantidade	Horário	Limpeza do Recipiente
0-3 dpf	Placa de Petri (com capacidade para 30 ml)	Incubadora 28°C – escuro	50 ovos por placa	Sem alimentação	-	-	-
4dpf	Placa de Petri (com capacidade para 30 ml)	Incubadora 26°C com fotoperíodo	50 ovos por placa	Sem alimentação	-	-	-
5-10 dpf	Recipiente	Incubadora 28°C com fotoperíodo	100 animais por litro	1ml fermento/100 larvas 0,2 g ração peneirada/100 larvas	1ml fermento/100 larvas	8h	Diária (manhã)
				Microverme e Paramecium ssp.	0,2 g ração	12h	
				1ml fermento/100 larvas 0,2 g ração peneirada/100 larvas	peneirada/100 larvas	17h	
10-21 dpf	Recipiente	Incubadora 28°C com fotoperíodo	50 animais por litro	Fermento diluído em água + ração Alcon	1 ml da mistura/100 larvas	8h	Diária (manhã)
				Microverme e Paramecium ssp.	1ml/50 larvas	12h	
				Fermento diluído em água + ração Alcon	1 ml da mistura/100 larvas	17h	
21-30dpf	Tanque Sistema 3 litros	Incubadora 28°C com fotoperíodo	10 animais por litro	0,02 g/ 15 animais	0,2 g/ 15 animais	8h	Sifonamento Diário (manhã) e limpeza total quinzenal
				1 ml cultivo/15 animais	1ml fermento/100 larvas	12h	
				0,02 g/ 15 animais	0,2 g/ 15 animais	17h	

ANEXO VI
PRODUÇÃO DE MEIO E3

Solução estoque (50X)

Dissolver em um 1 litro de água destilada:

- 14,6 g de NaCl
- 0,65 g de KCl
- 2,20 g CaCl ou 1,85 g de CaCl₂
- 4,05 g de MgSO₄

Acondicionar em geladeira, etiquetar com nome, responsável pela produção e data de produção.

ATENÇÃO: A solução estoque tem uma validade de seis meses em geladeira, e após isso deve ser descartada e outra solução estoque produzida.

Solução de trabalho (1X)

- a) Adicionar 20 ml da solução estoque (50X) em 1 L de água destilada.
- b) Para ajuste de pH, tamponar o meio com NaHCO₃ (bicarbonato de sódio) ou NaOH (hidróxido de sódio). O pH da solução trabalho do meio E3 deve estar entre 7,2 e 7,4.
- c) Aquecer a 28 °C.
- d) Adicionar 10 µL de azul de metileno (solução 1%).
- e) A solução trabalho pode ser acondicionada a temperatura ambiente.
- f) Etiquetar com nome, responsável pela produção e data de produção.

ATENÇÃO: A solução trabalho tem validade de sete dias. Após isso, a solução deve ser descartada e uma nova solução trabalho deve ser produzida, a partir da solução estoque

CAPÍTULO 4 - BIOEXPERIMENTAÇÃO

INTRODUÇÃO

O *zebrafish* (*D. rerio*) é um modelo animal amplamente utilizado na pesquisa biomédica. Essa espécie apresenta uma série de características que a tornam particularmente vantajosa para uso laboratorial: pequeno porte, ciclo de vida curto, alta fecundidade, além de embriões transparentes que se desenvolvem externamente, facilitando observações e manipulações experimentais. Do ponto de vista genético, o *zebrafish* compartilha cerca de 70% de homologia genômica com os seres humanos. (Português et al., 2022)

As propostas iniciais dos estudos com *zebrafish* começaram nos anos 1930, passando a ser central nos estudos de mutagênese e genética nos anos 1980 e se consolidando como modelo biomédico na década de 1990 e, a partir dos anos 2000, tornou-se referência em toxicologia, neurociência e farmacologia (Kutter et al., 2023).

A espécie é amplamente abordada na literatura científica em diferentes áreas do conhecimento, como toxicologia, neurociência, farmacologia e biologia do comportamento (Costa-Silva et al., 2018; Nunes et al., 2019). É também promissor na investigação de deficiências neurológicas, possibilitando a identificação dos mecanismos envolvidos na neurotoxicidade e na degeneração celular, além de servir como ferramenta para a avaliação de fármacos e terapias corretivas (Português et al., 2022).

Os ovos de peixe-zebra são amplamente usados em ecotoxicologia por serem transparentes, permitindo observação fácil do desenvolvimento embrionário. Possuem rápido desenvolvimento, alta taxa reprodutiva e são baratos de manter e até os 5 dias pós-fertilização, não estão sujeitos à legislação de bem-estar animal. (Riveiro et., 2022; CONCEA, 2024), sendo uma alternativa a experimentação animal em adultos e outros modelos animais.

O uso de embriões de *D. rerio* em testes toxicológicos permite avaliar os efeitos de compostos químicos durante o desenvolvimento embrionário, incluindo letalidade, malformações, retardo no crescimento e alterações bioquímicas. O modelo também detecta efeitos genotóxicos e histopatológicos, mesmo em baixas concentrações, sendo uma ferramenta sensível e eficiente na triagem toxicológica (Asrar et al., 2024).

Alterações como o retardo no desprendimento da cauda, curvatura corporal e anormalidades oculares indicam distúrbios no crescimento e na morfogênese. Já malformações cardíacas e batimentos irregulares sugerem cardiotoxicidade. A formação irregular dos somitos,

por sua vez, indica comprometimento na organização mioestrutural do embrião. Esses parâmetros são essenciais na avaliação da toxicidade embrionária em testes com *Zebrafish* (Chen et al., 2025; Asrar et al., 2024)

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização dos testes de embriotoxicidade, foi realizada a padronização de práticas experimentais, incluindo o manejo reprodutivo dos exemplares adultos de *D. rerio* e o controle rigoroso das condições ambientais. O protocolo experimental foi conduzido de modo a assegurar a qualidade da água e o bem-estar dos embriões durante todas as etapas do ensaio.

Foram utilizados os seguintes instrumentos e equipamentos para garantir as condições adequadas ao experimento:

- Meio embrionário E3
- Placas de Petri autoclavadas
- Pipeta Pasteur nova
- Microscópio e/ou lupa
- Placas de 24 poços
- BOD
- Molécula ou composto a ser testado

RESULTADO E DISCUSSÃO

A elaboração desse protocolo é baseada no Test N°. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, da OECD. O teste consiste na exposição de ovos de *D. rerio* (*zebrafish*) recém-fertilizados a um determinado composto químico, com o objetivo de avaliar possíveis efeitos tóxicos durante o desenvolvimento embrionário. Os embriões são alocados individualmente em placas de 24 poços, contendo diferentes concentrações da substância em análise, e permanecem sob observação por um período de 96 horas pós-fertilização (hpf). Durante esse tempo, são monitorados parâmetros como taxa de mortalidade, anomalias morfológicas, atraso no desenvolvimento e alterações comportamentais, possibilitando a identificação de potenciais efeitos embriotóxicos do composto testado.

O uso de embriões em substituição aos peixes adultos representa uma abordagem eficiente e ética na experimentação animal. Isso se deve ao fato de que os embriões apresentam características que favorecem estudos voltados à biologia do desenvolvimento, além de permitirem a avaliação de efeitos tóxicos de contaminantes em estágios iniciais do ciclo de vida, que são frequentemente mais sensíveis do que os organismos adultos. Essa alternativa também está alinhada aos princípios dos 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição), promovendo a minimização do uso de animais vertebrados em fases mais avançadas de desenvolvimento. Algumas considerações a respeito do teste são (OECD, Test N°. 236):

- É importante conhecer propriedades da substância testada (peso molecular, solubilidade, estabilidade);
- Se a substância for metabolizada no organismo, os embriões podem não representar a toxicidade total;
- As substâncias de alto peso molecular (>3kDa) ou de estrutura volumosa podem não ser bem absorvidas pelos embriões;
- A sobrevivência dos embriões no controle negativo deve ser $\geq 90\%$ após 96 horas.
- O controle positivo com 3,4-dicloroanilina (4,0 mg/L) deve ter pelo menos 30% de mortalidade.

Para validação do teste, alguns critérios devem ser atendidos:

- A taxa de fertilização das amostras deve ser $\geq 70\%$.
- A temperatura da água deve permanecer em $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

- A sobrevivência dos embriões no controle negativo deve ser $\geq 90\%$ após 96 horas.
- O controle positivo com 3,4-dicloroanilina (4,0 mg/L) deve ter pelo menos 30% de mortalidade.
- A taxa de eclosão no controle negativo deve ser $\geq 80\%$ ao final do teste.

O teste é realizado em placas de 24 poços, onde os embriões são expostos a substância em água reconstituída com dureza entre 100-300 ppm de CaCO_3 , com pH entre 6,5 e 8,5. O método adotado pode ser estático, onde não há troca de água, ou semi estático com trocas periódicas de água.

Os ovos coletados após a reprodução devem estar saudáveis, livres de doenças e partículas e mantidos em condições controladas. Com no máximo de 3hpf, devem ser distribuídos aleatoriamente nos poços das placas previamente condicionadas a temperatura ideal 24 horas.

O teste é realizado expondo 20 embriões em cada concentração, totalizando ao todo 5 concentrações mais os controles positivo e negativo. Essas concentrações devem ser pensadas para permitir análise estatística posterior. Deve ser realizado registro diário das observações de letalidade.

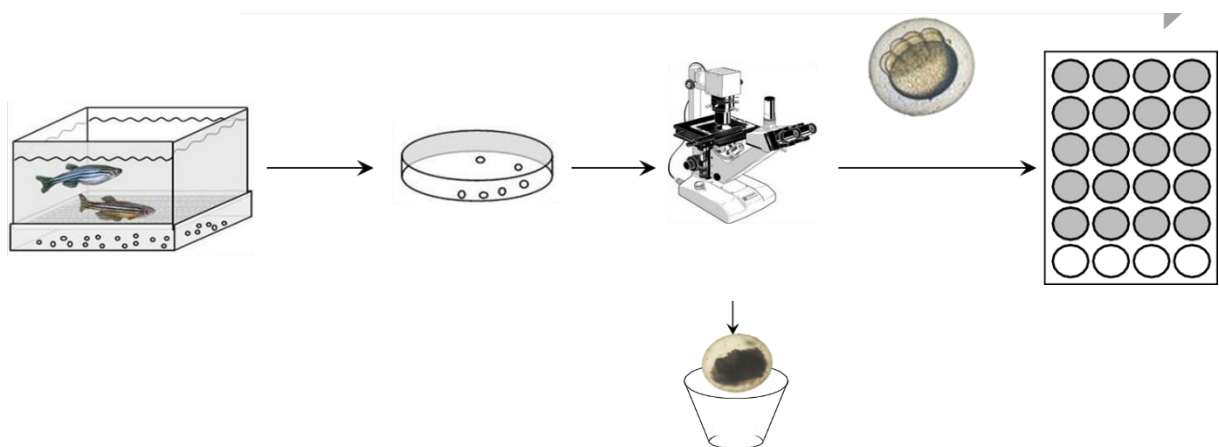


Figura 24 - Processo de teste de embriotoxicidade aguda. Os ovos de *Zebrafish* são coletados do aquário de reprodução e postos em placa de Petri para observação no microscópio ou lupa para seleção. Os ovos inviáveis são descartados e os viáveis postos em placas de 24 poços acimatadas. Fonte: OECD/ Teste FET

As observações devem ser realizadas a cada 24 horas contando da hora zero do experimento. Os critérios de letalidade, ou endpoints são:

- Coagulação do embrião - Embriões coagulados apresentam coloração esbranquiçada.
- Falta de somitos - Indica falha no desenvolvimento muscular.
- Não separação da cauda - Falha na morfogênese do embrião.
- Ausência de batimentos cardíacos (Assistolia) - Considerado um critério definitivo de letalidade.

A taxa de eclosão também é monitorada durante os testes, embora não constitua um critério obrigatório para a determinação da LC50, sendo possível adotar outros parâmetros conforme os objetivos do estudo. Além disso, a concentração da substância testada deve ser confirmada tanto no início quanto ao final do experimento. No relatório, é essencial incluir informações detalhadas sobre as características da substância, as condições experimentais, a mortalidade observada em cada concentração e os dados estatísticos referentes à curva concentração-resposta.

A LC50, ou Concentração Letal 50, é um parâmetro amplamente utilizado em testes de toxicidade, como aqueles realizados com peixes, incluindo o *zebrafish*. Este índice representa a concentração de uma substância capaz de provocar a morte de 50% dos organismos expostos dentro de um intervalo de tempo específico.

Em testes de toxicidade embrionária em peixes (FET – *Fish Embryo Toxicity*), a LC50 é empregada para avaliar o potencial tóxico de compostos químicos durante o desenvolvimento embrionário. A determinação dessa concentração é feita por meio de experimentos controlados, nos quais embriões ou larvas são submetidos a concentrações progressivamente maiores da substância em teste, identificando-se, assim, o ponto em que ocorre a mortalidade de metade dos indivíduos avaliados.

ANEXO VII

TESTE DE TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES DE *Danio rerio*

Título do procedimento: Autor:

Data do início:

Toxina:

Concentração 1:

Endpoints	24 horas			48 horas			72 horas			96 horas			Total
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Embrião Coagulado													
Ausência de Somitos													
Não Separação Caudal													
Assistolia	-	-	-										
Controle Placa													

Concentração 2:

Endpoints	24 horas			48 horas			72 horas			96 horas			Total
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Embrião Coagulado													
Ausência de Somitos													
Não Separação Caudal													
Assistolia	-	-	-										
Controle Placa													

Concentração 3:

	24 horas			48 horas			72 horas			96 horas			
Endpoints	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	Total
Embrião Coagulado													
Ausência de Somitos													
Não Separação Caudal													
Assistolia	-	-	-										
Controle Placa													

Concentração 4:

	24 horas			48 horas			72 horas			96 horas			
Endpoints	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	Total
Embrião Coagulado													
Ausência de Somitos													
Não Separação Caudal													
Assistolia	-	-	-										
Controle Placa													

Concentração 5:

	24 horas			48 horas			72 horas			96 horas			
Endpoints	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	Total
Embrião Coagulado													
Ausência de Somitos													
Não Separação Caudal													
Assistolia	-	-	-										
Controle Placa													

Concentração Negativo:

	24 horas			48 horas			72 horas			96 horas			
Endpoints	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	Total
Embrião Coagulado													
Ausência de Somitos													
Não Separação Caudal													
Assistolia	-	-	-										
Controle Placa													

Concentração Positivo:

	24 horas			48 horas			72 horas			96 horas			
Endpoints	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	Total
Embrião Coagulado													
Ausência de Somitos													
Não Separação Caudal													
Assistolia	-	-	-										
Controle Placa													

Observações ao longo do experimento

CONCLUSÃO

No cenário internacional, a consolidação dos princípios dos 3Rs (Russell & Burch, 1959) impulsionou a criação de legislações voltadas à ética no uso de animais em pesquisa, como o *Animal Welfare Act* (EUA) e o *Animals (Scientific Procedures) Act* (Reino Unido), culminando na Diretiva Europeia 2010/63/EU. Essas normativas reforçam critérios éticos rigorosos que têm influenciado legislações em diversos países. No Brasil, a Lei nº 11.794/2008, conhecida como Lei Arouca, e seus dispositivos complementares, como o Decreto nº 6.899/2009 e as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), também se fundamentam nos princípios dos 3Rs, buscando assegurar o bem-estar animal e a responsabilidade científica.

Nesse contexto, destaca-se a recente publicação da Resolução Normativa nº 61/2023 e da Nota Informativa nº 01/2024, que representam avanços significativos na regulamentação específica para o uso de peixes e embriões, como o *D. rerio* (*zebrafish*), em experimentação científica. No entanto, ainda existem desafios práticos na aplicação e interpretação dessas normas, especialmente no que diz respeito à clareza dos critérios éticos aplicáveis às fases embrionárias e à adequação da infraestrutura dos biotérios para espécies aquáticas. Apesar da consonância nos fundamentos éticos e nas diretrizes gerais, observa-se uma variação no nível de detalhamento e na aplicabilidade técnica entre as legislações, o que pode gerar insegurança ou ambiguidade para pesquisadores e instituições.

Visando atender às exigências legais e garantir a reprodutibilidade dos experimentos com *D. rerio*, foram implantadas no LaBex medidas como o sistema de recirculação de água, controle rigoroso dos parâmetros físico-químicos e padronização da alimentação, assegurando um ambiente adequado ao cultivo da espécie e promovendo seu bem-estar. A adoção de protocolos de biossegurança e de enriquecimento ambiental também contribuiu significativamente para a conformidade com as normas estabelecidas pelo CONCEA. Ainda que desafios persistam, como a necessidade de melhorias no sistema de abastecimento de água e no monitoramento remoto das condições ambientais, as ações corretivas já em andamento demonstram o comprometimento da equipe técnica com a ética e a qualidade na experimentação animal.

Paralelamente, a elaboração de um guia técnico adaptado à realidade local da Universidade Federal do Espírito Santo *campus* São Mateus, contribui para a qualificação da pesquisa com esse modelo animal e para o fortalecimento institucional em experimentação com

vertebrados. A reprodução do *D. rerio* em seu ambiente natural ocorre em locais rasos, com vegetação e baixa movimentação de água, geralmente durante o início da manhã. Esse comportamento está diretamente associado a estímulos luminosos, à segurança do local de desova e à interação física entre os sexos. Portanto, a simulação dessas condições em ambiente laboratorial é essencial para garantir o sucesso reprodutivo da espécie, respeitando tanto seu comportamento natural quanto os requisitos técnicos da experimentação.

No LaBex, os protocolos reprodutivos adotados buscam replicar essas condições por meio de fotoperíodo controlado, temperatura ideal, enriquecimento ambiental e uma estrutura física semelhante ao habitat natural da espécie. Diante desse panorama, o *zebrafish* consolida-se como uma ferramenta versátil e eficiente na investigação de efeitos tóxicos em organismos vertebrados. Sua aplicação em testes toxicológicos permite não apenas a avaliação de malformações embrionárias, mas também a identificação precoce de compostos com potencial risco à saúde humana e ambiental, fortalecendo sua relevância como modelo experimental nas ciências biomédicas e ambientais.

REFERÊNCIAS

AFFANDI, I.; IKHWANUDDIN, M.; SYAHNON, M.; ABOL-MUNAFI, A.-B. Growth and survival of enriched free-living nematode, *Panagrellus redivivus* as exogenous feeding for larvae of blue swimming crab, *Portunus pelagicus*. **Aquaculture Reports**, v. 15, p. 100211, 2019.

ALABASTER, J. S.; LLOYD, R. S. Water quality criteria for fresh waterfish. 3117. Amsterdam: **Elsevier**, 2013.

ALESTRÖM, P., D'Angelo, L., Midtlyng, P. J., Schorderet, D. F., Schulte-Merker, S., Sohm, F., & Warner, S. (2020). *Zebrafish*: Housing and husbandry recommendations. *Laboratory Animals*, 54(3), 213-224.

AMORES, A.; POSTLETHWAIT, J. H. Banded chromosomes and the *zebrafish* karyotype. **Methods in Cell Biology**, v. 60, p. 323-338, 1999.

ASRAR, Pasala et al. A Review on Unlocking Toxicity: How *Zebrafish* Embryos Help Ensure Safe Chemicals. **Universal Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 1, p. 5–10, 2024.

AVDESH, A.; CHEN, M.; MARTIN-IVERSON, M. T.; MONDAL, A.; ONG, D.; RAINEY-SMITH, S.; TADDEI, K.; LARDELLI, M.; GROTH, D. M.; VERDILE, G.; MARTINS, R. N. Regular Care and Maintenance of a *Zebrafish* (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction. **Journal of Visualized Experiments**, n. 69, p. 4196, 2012.

BLANCO-VIVES, B.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in *zebrafish*. **Physiology & Behavior**, v. 98, n. 3, p. 268–275, 2009.

BOYD, C E. Manejo do ciclo do pH para manter a saúde animal. **Aquaculture**, v. 20, n. 3, p. 20-30, jul./ago. 2013.

BRAGA, A. P. A.; SOUZA, L. R. D.; LIMA, M. G. F.; CRUZ, J. M.; SOUZA, A. C. Z. D.; COSTA, M. S.; CASTRO, V. L. S. S. D.; MARIN-MORALES, M. A. The *Zebrafish* as an Alternative Animal Model for Ecotoxicological Research and Testing. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 67, p. e24220968, 2024.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de**

ensino ou pesquisa científica. Brasília: MCTI, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/mcti/pt-r/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/publicacoes-do-concea/guia_concea_led_animais-_ensino_ou_pesquisa_2023.pdf. Acesso em: 11 mar. 2025.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018.** Estabelece diretrizes para o uso de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 fev. 2018. Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_CONCEA_n_37_de_15022018.html. Acesso em: 13 mar. 25.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Resolução Normativa nº 49, de 20 de dezembro de 2021.** Altera a Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018, que estabelece diretrizes para o uso de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 dez. 2021. Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_CONCEA_n_49_de_07052021.html. Acesso em: 15 mar. 25

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Resolução Normativa nº 50, de 20 de dezembro de 2021.** Altera a Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018, que estabelece diretrizes para o uso de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 dez. 2021. Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_CONCEA_n_50_de_13052021.html. Acesso em: 15 mar. 25

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Resolução Normativa nº 61, de 20 de dezembro de 2021.** Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 dez. 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-concea-n-61-de-2-de-maio-de-2023-480851998>. Acesso em: 15 mar. 25.

BRASIL. **Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009.** Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais – CIUCA, mediante a regulamentação da Lei nº 11.794, de 8 de outubro

de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, p. 2, 16 jul. 2009. Disponível em: planalto.gov.br. Acesso em: 16 mar. 2025.

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. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 9 out. 2008. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm. Acesso em: 16 mar. 2025.

BRASIL. **Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998**. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 13 fev. 1998. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19605.htm. Acesso em: 13 mar. 25

BURDEN, Natalie et al. Advancing the 3Rs in regulatory ecotoxicology: A pragmatic cross-sector approach. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 12, n. 3, p. 417-421, 2015.

CANEDO, A.; SAIKI, P.; SANTOS, A. L.; CARNEIRO, K. D. S.; SOUZA, A. M. D.; QUALHATO, G.; BRITO, R. D. S.; MELLO-ANDRADE, F.; ROCHA, T. L. *Zebrafish (Danio rerio)* meets bioethics: the 10Rs ethical principles in research. **Ciência Animal Brasileira**, v. 23, p. e-70884, 2022.

CARDOSO, C. V. P. Destino de carcaças. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 280-288, 2002.

CARVALHO, A. P.; ARAUJO, L.; SANTOS, M. M. Rearing *zebrafish (Danio rerio)* larva without live food: evaluation of a commercial, a practical and a purified starter diet on larval performance. **Aquaculture Research**, v. 37, n. 11, p. 1107–1111, 2006.

CASSAR, S.; DUNN, C.; RAMOS, M. F. *Zebrafish* as an animal model for ocular toxicity testing: a review of ocular anatomy and functional assays. **Toxicologic Pathology**, Thousand Oaks, v. 49, n. 1, p. 143–154, 2021. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0192623320964748>. Acesso em: 25 mar. 2025.

CASTRO, V. L. S. S. **Uso de animais de experimentação e legislação correlata: orientações sobre estudos com peixes e roedores**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2013. 27 p.

CHEN, Y.; ZHAO, J.; CHEN, X.; ZONG, L.; LU, X.; PAN, Y. et al. Molecular insights into developmental toxicity induced by PCB77 exposure on zebrafish via integrating transcriptomics with adverse outcome pathway. **Science of The Total Environment**, [S.l.], v. 907, 2025. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969725001366>. Acesso em: 27 mar. 2025.

CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). **Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais – Conceitos e Procedimentos Recomendados**. Brasília: CONCEA, 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/arquivos-publicacoes-bem-estar-animal/guia-brasileiro-de-boas-praticas-para-a-eutanasia-em-animais.pdf/view>. Acesso em: 01.mar. 2025

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). Nota Informativa nº 01, de 1º de fevereiro de 2024. Recomendações sobre a necessidade de avaliação pelas CEUAs em projetos com embriões, fetos e formas larvais. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/nota-informativa-concea-no-01-2024>. Acesso em: 26 mar. 2025.

COSTA, M. S. S. de M., et al. "Desempenho de quatro sistemas para compostagem de carcaça de aves." **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v. 10, p. 692- 698. 2006.

COSTA, Tânia Luísa Cabral da. **História do Zebrafish na pesquisa científica: uma breve revisão**. 26 f. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Especialização em Biotérios do Programa de Pós-graduação Lato Sensu da Escola Superior do Instituto Butantan), Instituto Butantan, São Paulo, SP, 2022.

COSTA-SILVA, D. G. et al. N-acetylcysteine inhibits Mancozeb-induced impairments to the normal development of *zebrafish* embryos. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 68, p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.04.003>. Acesso em: 26 mar. 2025.

CURRIE, P. D.; LIESCHKE, G. J. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 8, p. 353–367, 2007. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrg2091>. Acesso em: 25 mar. 2025.

DAMMSKI, A. P.; MÜLLER, B. R.; GAYA, C. **Manual de Criação em Biotério**. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, 20-1. 2011.

DELONG, D. P.; LOSORDO, T. M. **How to start a biofilter**. 2012.

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, n. 3–4, p. 191–364, 2002.

Dicionário Aurélio da língua portuguesa. 3. ed. rev. e ampl. Curitiba: Positivo, 2010. Disponível em: <https://www.aurelio.com.br>. Acesso em: 15 mar. 2025.

DUARTE, G. I. B. P. Utilização de animais na pesquisa científica—breve histórico. In: OLIVEIRA. **Bioética e manejo de animais de laboratório**. Paraná: Editora Atena, ano 2022.

EBELING, J. M.; TIMMONS, M. B. Recirculating aquaculture systems. **Aquaculture production systems**, p. 245-277, 2012.

ELIZALDE-VELÁZQUEZ, G. A. Zebrafish as model organism in aquatic ecotoxicology: current trends and future perspectives. In: **Zebrafish Research – An Overview**. IntechOpen, 2023. [S. 1.]. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/1158775>. Acesso em: 25 mar. 2025.

ENGESZER, R. E.; PATTERSON, L. B.; RAO, A. A.; PARICHY, D. M. Zebrafish in The Wild: A Review of Natural History And New Notes from The Field. **Zebrafish**, v. 4, n. 1, p. 21–40, 2007.

FERDOWSIAN, Hope; BECK, Neal. Ethical and scientific considerations regarding animal testing and research. **PLOS ONE**, [S. 1.], v. 6, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024059>. Acesso em: 25 mar. 2025.

FONSECA, S. R. **Exposição de embriões e larvas de Zebrafish a compostos bisfenólicos para elucidação de mecanismos neurotoxicológicos**. 2018. 94 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

GALLAS-LOPES, M.; BENVENUTTI, R.; DONZELLI, N. I. Z.; MARCON, M. A systematic review of the impact of environmental enrichment in zebrafish. **Lab Animal**, v. 52, n. 12, p. 332–343, 2023.

GARCIA, R. L.; SANDERS, G. E. Efficacy of cleaning and disinfection procedures in a zebrafish (*Danio rerio*) facility. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 6, p. 895-900, nov. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3228927/>. Acesso em: 15. Mar. 2025

GATTO, E.; BRUZZONE, M.; MASCHIO, M. D.; DADDA, M. Effects of environmental enrichment on recognition memory in zebrafish larvae. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 247, p. 105552, 2022.

GEISLER, Robert et al. Maintenance of zebrafish lines at the European Zebrafish Resource Center. **Zebrafish**, v. 13, n. S1, p. S-19-S-23, 2016.

GHENO, E. M.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, D. O.; CALABRÓ, L. Zebrafish in Brazilian Science: Scientific Production, Impact, and Collaboration. **Zebrafish**, v. 13, n. 3, p. 217–225, 2016.

GOMES, V. D. S.; AMÂNCIO, A. L. D. L.; CAVALCANTI, C. R.; ARAÚJO, M. H. C. D.; MEDEIROS, V. D. S.; BATISTA, J. M. M.; MASCARENHAS, N. M. H. Microverme da aveia como estratégia alimentar na larvicultura do *Betta splendens*. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e10411124534, 2022.

GOOLISH, E. M.; EVANS, R.; OKUTAKE, K.; MAX, R. Chamber Volume Requirements for Reproduction of the Zebrafish *Danio rerio*. **The Progressive Fish Culturist**, v. 60, n. 2, p. 127–132, 1998.

GRIMM, Herwig; BERINGER, Tim; LEWEJOHANN, Lars; KREYENHOP, Hans-Georg; REINHARDT, Tina; SCHÜTZ, Adrian; SCHÜTZ, Eva; SCHOLZ, Beate; WÜRBEL, Hanno. Advancing the 3Rs: innovation, implementation, ethics and society. **Frontiers in Veterinary Science**, [S. l.], v. 10, p. 1185706, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1185706>. Acesso em: 25 mar. 2025.

HARPER, C.; LAWRENCE, C. **The Laboratory Zebrafish**. CRC Press, 2016. 2016. (Laboratory Animal Pocket Reference). Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=05zMBQAAQBAJ>.

KENT, M. L.; SPITSBERGEN, J. M.; MATTHEWS, J. M.; FOURNIE, J. W.; MURRAY, K. N.; WESTERFIELD, M. **Zebrafish health: Disease manual**. Zebrafish International Resource Center, 2022 Disponível em: https://zebrafish.org/wiki/health/disease_manual/start. Acesso em: 08.mar 2025.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253–310, 1995.

KIRK, Robert G. W.; MYELNIKOV, Dmitriy. Governance, expertise, and the ‘culture of care’: the changing constitutions of laboratory animal research in Britain, 1876–2000. **Studies in History and Philosophy of Science**, [S. l.], v. 93, p. 107–122, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.shpsa.2022.03.004>. Acesso em: 25 mar. 2025.

KÜTTER, M. T.; BARCELLOS, L. J. G.; BOYLE, R. T.; MARINS, L. F.; SILVEIRA, T. Boas práticas na criação e manutenção de *zebrafish* (*Danio rerio*) em laboratório no Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 24, p. e-74134, 2023

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1–4, p. 1–20, 2007.

LAWRENCE, C.; MASON, T. Zebrafish Housing Systems: A Review of Basic Operating Principles and Considerations for Design and Functionality. **ILAR Journal**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 179–191, 2012.

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

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

MAHANAYAK, B. Zebrafish as a Model Organism in Bio-Medical Research. **International Journal of Research Publication and Reviews**, Vol 5, no 10, pp 3637-3646 October 2024

MATTHEWS, Monte, TREVARROW Bll, and MATTHEWS .Jennifer "A virtual tour of the guide for zebrafish users." **Resource** 31.3: p 34-40. 2002.

NUNES, M. E. et al. Acute exposure to permethrin modulates behavioral functions, redox, and bioenergetics parameters and induces DNA damage and cell death in larval

zebrafish. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/9149203>. Acesso em: 26 mar. 2025.

OECD, Organization For Economic Co-operation and Development. **OECD Fish Embryo Toxicity (FET) Test**. Test Guideline No. 236. 2013.

PIJNACKER, L. P.; FERWERDA, M. A. Zebrafish chromosome banding. **Genome**, v. 38, p. 1052-1055, 1995.

PORTUGUÊS, V. R.; HERMES, V. W.; PAULINO, I. M.; MENDONÇA, B. L.; MARTINS, C. E. C.; PRADO FILHO, C. E. D.; MARGIOTI, N.; CAMPOS, V. F.; CARMO, V. P. D.; CARMIGNAN, F.; RIVERO-WENDT, C. L. G. Avaliação acerca do *Zebrafish* (*Danio rerio*) como modelo biomédico para determinação da toxicidade do dimesilato de lisdexanfetamina. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, p. e50911528491, 2022.

QUINTANEIRO, C., GAGLIARDI, M., CAPONE, L., e DOMINGUES, I. **Desenvolvimento embrionário do peixe-zebra**. Captar, Portugal, 1, e20. 2022.

RIBEIRO, O. M. R.; UTAD; PINTO, M. Q. P.; UTAD; FÉLIX, L.; UTAD; MONTEIRO, S.; UTAD; FERNANDES, A.; UTAD; CARROLA, J. S. C.; UNIVERSIDADE DO PORTO. O peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo emergente na ecotoxicologia. **Revista de Ciência Elementar**, v. 10, n. 2, 2022. Disponível em: <http://rce.casadasciencias.org/art/2022/021>. Acesso em: 26 mar. 2025.

RIBEIRO, O. M. R.; UTAD; PINTO, M. Q. P.; UTAD; FÉLIX, L.; UTAD; MONTEIRO, S.; UTAD; FERNANDES, A.; UTAD; CARROLA, J. S. C.; UNIVERSIDADE DO PORTO. O peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo emergente na ecotoxicologia. **Revista de Ciência Elementar**, [s. l.], v. 10, n. 2, 2022. Disponível em: <http://rce.casadasciencias.org/art/2022/021>. Acesso em: 13 mar. 2025.

ROLLIN, Bernard. The regulation of animal research and the emergence of animal ethics: a conceptual history. **Theoretical Medicine and Bioethics**, [S. l.], v. 27, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11017-006-9007-8>. Acesso em: 25 mar. 2025.

ROPER, C., TANGUAY, R. L. Zebrafish as a model for developmental biology and toxicology. In: **Handbook of developmental neurotoxicology**. Academic press, 2018. p. 143-151.

RUSSELL, W. M. S., & BURCH, R. L., **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen, 1959.

SCHNEIDER, A. C. SANTOS, J. L. D., PORAWSKI, M., SCHAEFER, P. G., MAURER, R. L., MATTE, U. D. S., e SILVEIRA, T. R. D. Implementação de um novo modelo de experimentação animal: *zebrafish*. **Revista HCPA**. Vol. 29, n. 2 (2009), p. 100- 103, 2009.

SESSA, A. K.; WHITE, R.; HOUVRAS, Y.; BURKE, C.; PUGACH, E.; BAKER, B.; GILBERT, R.; THOMAS LOOK, A.; ZON, L. I. The Effect of a Depth Gradient on the Mating Behavior, Oviposition Site Preference, and Embryo Production in the Zebrafish, *Danio rerio*. **Zebrafish**, v. 5, n. 4, p. 335–339, 2008.

SHANG, E. H. H.; YU, R. M. K.; WU, R. S. S. Hypoxia affects sex differentiation and development, leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 3118-3122, 2006.

SORGELOOS, P.; DHERT, P.; CANDREVA, P. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. **Aquaculture**, v. 200, n. 1–2, p. 147–159, 2001.

SPENCE, R.; ASHTON, R.; SMITH, C. Oviposition decisions are mediated by spawning site quality in wild and domesticated zebrafish, *Danio rerio*. **Behaviour Ecology**, p. 953-966, 2007.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The Behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 83, n. 1, p. 13–34, 2008.

SPENCE, R.; SMITH, C. Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance. **Behavioral Ecology**, v. 17, n. 5, p. 779–783, 2006.

SPENCER, A.; LAUD, P.; ALLEN, C.; BULL, J.; STILLMAN, E.; HILDITCH, S. Statistical considerations for the breeding of zebrafish and their use in experiments. Em: ALLEN, Claire; MOCHO, Jean-Philippe (org.). **Zebrafish**. GB: CABI, 2024. p. 251–300. Disponível em: <http://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/9781800629431.0009>. Acesso em: 13 mar. 2025.

STREISINGER, G.; WALKER, C.; DOWER, N.; KNAUBER, D.; SINGER, F. Production of clones homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**, v. 291, n. 5813, p. 293–296, 1981.

TRIGUEIRO, N. S. D. S.; CANEDO, A.; BRAGA, D. L. D. S.; LUCHIARI, A. C.; ROCHA, T. L. Zebrafish as an Emerging Model System in the Global South: Two Decades of Research in Brazil. **Zebrafish**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 412–425, 2020.

TSANG, B.; ZAHID, H.; ANSARI, R.; LEE, R. C. Y.; PARTAP, A.; GERLAI, R. Breeding zebrafish: a review of diferente methods and a discussion on standardization. **Zebrafish**, v. 14, n. 6, p. 561-573, 2017. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1466>.

WESTERFIELD, M. **The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)**. 5. ed. Eugene: University of Oregon Press, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development**. Geneva: World Health Organization, 2009.

YANG, Lixin et al. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 245-253, 2009.

ZORTÉA, N. B. **O uso do peixe-zebra em modelos de obesidade e diabetes: alterações comportamentais e bioquímicas**. 2020. 33 f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2020.