

Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Especialização em Biotérios

Pedro Angella Neto

Manejo e cuidado no Biotério de *Zebrafish* (*Danio rerio*)

São Paulo
2023

Pedro Angella Neto

Manejo e cuidado no Biotério de *Zebrafish* (*Danio rerio*)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotérios do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotérios.

Orientador (a): Dr^a Monica Valdyrce dos Anjos Lopes
Ferreira

São Paulo

2023

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Angella-Neto, Pedro

Manejo e cuidado no Biotério de Zebrafish (Danio rerio) / Pedro Angella-Neto ; orientador(a) Monica Valdyrce dos Anjos Lopes-Ferreira - São Paulo, 2023.

40 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Especialização em biotérios.

1. Zebrafish 2. Biotério. 3. Manejo. 4. Cuidados I. Lopes-Ferreira, Monica Valdyrce dos Anjos. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Especialização em biotérios. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Pedro Angella Neto, aluno do Curso de Especialização em Biotérios, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- () Imediato
(X) 06 meses
() 12 meses
() Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 23 de Janeiro de 2023



.....

aluno(a)

De acordo:.....

Orientador(a):

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de me inscrever, ser selecionado no processo seletivo e poder realizar e concluir este curso. Ele traçou este caminho, e O agradeço por me permitir caminhá-lo e concluir esta jornada com tantos intercursos.

Ao colaborador da Plataforma Zebrafish e colega de curso de especialização Wilton Queiroz de Souza pelo auxílio, apoio, cuidado, ensino e incentivo durante o período de estágio no biotério, bem como aos demais colegas estagiários.

À orientadora Dr^a Monica Lopes Ferreira, representando todos os demais colaboradores da Plataforam Zebrafish, pelo acolhimento e confiança no trabalho executado.

Ao Prof. Dr. Celso Marino, assessor da Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe) da Unesp, e à Direção do Grupo Administrativo do Campus (GAC) da Unesp de Botucatu, nos nomes do Presidente Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida e ao Diretor Técnico Juliano Contin Ventrella pelo auxílio financeiro para meu transporte semanal até o Instituto Butantan.

À Direção do IBTEC Unesp, Prof. Dr. Paulo Ribolla e Prof. Dr. Deilson Elgui pelo incentivo ao aprimoramento dos meus conhecimentos.

Aos colegas de trabalho do CPPA IBTEC, Dr^a Silvia Pedrini, Lilian Amaral, Vitor de Souza, Edson José, Leisliane Lopes e Telma Norato, pelo incentivo à realização do curso e pela compreensão e esforço executados em minha ausência durante a realização do curso.

À minha família: aos sogros Sr. Antônio Carlos Almeida e Angelina Bursi, pelas “ajudinhas” financeiras semanais que contribuíram para a realização das primeiras viagens e por várias refeições; à cunhada Jaqueline Aparecida de Almeida, pela acolhida semanal em seu apartamento em São Paulo, incentivando sempre o meu progresso profissional. Aos meus pais, Dorival e Silvia Angella, minha irmã Aline Angella Martins, meu cunhado Thomaz Martins, meus sobrinhos Thiago e Alice, que nas idas e vindas às vans e à rodoviária, sempre me apoiaram incondicionalmente.

À minha esposa Patrícia Angella, minha base, que permitiu, incentivou com risos e lágrimas, suportou minhas ausências e me apoiou desde o primeiro dia até o último, para que obtivesse progresso, e sempre acreditou em meu potencial. Te amo!

"Por meio de tudo que Ele fez desde a criação do mundo, podem perceber claramente seus atributos invisíveis: seu poder eterno e sua natureza divina [...]."

Romanos 1.20 (Nova Versão Transformadora)

"Deus disse: 'Façamos os seres humanos à nossa imagem, de forma que reflitam a nossa natureza, para que sejam responsáveis pelos peixes no mar, pelos pássaros no ar, pelo gado e, claro, por toda a terra, por todo animal que se move na terra'".

Gênesis 1.26 (A Mensagem)

RESUMO

ANGELLA-NETO, Pedro. **Manejo e cuidado no Biotério de Zebrafish (*Danio rerio*)**. 2022. 39 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotérios) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

Danio rerio (zebrafish), oriundo das águas rasas asiáticas, é um modelo experimental em grande ascensão na comunidade científica por sua vantagem e velocidade reprodutivas; com seu genoma completamente sequenciado e grande similaridade genética com o ser humano, além do cuidado e manejo facilitado em ambientes fechados, tornam o *zebrafish* uma opção extremamente viável para a pesquisa científica. Esta revisão bibliográfica busca expor e esclarecer os meios e principais parâmetros para o estabelecimento de uma instalação de produção, manutenção ou utilização de *zebrafish*, bem como as resoluções normativas e requerimentos legais que regem o estabelecimento destas instalações; também reunimos as condições de instalação necessárias para a construção e implantação da instalação, seus parâmetros para a manutenção, criação, reprodução e manejo dos peixes-zebra na instalação animal.

Palavras-chave: diretrizes, alojamento, criação, ciência dos animais de laboratório. Peixe-zebra, *zebrafish*, técnicos em manejos de animais, bem-estar do animal.

ABSTRACT

ANGELLA-NETO, Pedro. **Husbandry and care in zebrafish housing**. 2022. 39 p. Monograph (Specialist in Animal Facility) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

Danio rerio (zebrafish), originating from the Asian shallow waters, is a high-rise experimental model in the scientific community for its reproductive advantage and speed; with its completely sequenced genome and great genetic similarity with humans, in addition to the care and management facilitated indoors, *make zebrafish* an extremely viable option for scientific research. This literature review seeks to expose and clarify the means and main parameters for the establishment of a *zebrafish production, maintenance or use facility*, as well as the normative resolutions and legal requirements governing the establishment of these facilities; we also meet the installation conditions necessary for the construction and implementation of the installation, its parameters for maintenance, breeding, reproduction and management of zebrafish in the animal installation.

Keywords: guidelines, housing, husbandry, laboratory animal science, zebrafish. animal technicians. animal welfare.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Aquário com peixes-zebra (<i>Danio rerio</i>)	13
Figura 2 - Peixes-zebra machos.....	26
Figura 3 - Peixes-zebra fêmeas	26
Figura 4 – Sistema comercial de reprodução de peixes-zebra de alta densidade com separador e fundo gradeado.....	27
Figura 5 - Sistema comercial de reprodução de peixes-zebra de baixa densidade com rampa	27
Figura 6 - Ovos fertilizados e coletados, imersos em meio de manutenção em placa de Petri.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 7 - Ovos fertilizados viáveis, sob aumento da lupa	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Origem e Biologia	12
1.2 Do rio ao laboratório	13
1.3 Importância como modelo animal experimental	13
2 OBJETIVOS	14
3 METODOLOGIA	14
4 RESULTADOS	15
4.1 Legislação sobre Instalações Animais	15
4.1.1 Estabelecimento da Comissão de Ética no Uso de Animais	15
4.1.2 Estabelecimento do Tipo de Biotérios ou Instalação Animal	16
4.2 Começando uma instalação animal de <i>Danio rerio</i>	17
4.2.1 Espaço Físico.....	17
4.2.2 Abastecimento de água	19
4.2.3 Qualidade e fluxo da água	20
4.2.4 Aquários	20
4.2.5 Densidade de peixes por aquário	21
4.2.6 Temperatura.....	21
4.2.7 Iluminação.....	21
4.2.8 Ruídos.....	22
4.2.9 Umidade.....	22
4.2.10 pH.....	23
4.2.11 Salinidade e Dureza.....	23
4.2.12 Alimentação	24
4.2.13 Reprodução.....	25
4.2.14 Eutanásia	30
4.2.15 Descarte de Carcaças.....	32
4.2.16 Uso de Equipamentos de Proteção Individual	33
4.2.17 Checagem na Instalação ou Biotério	33

4.2.18 Limpeza e Desinfecção do Biotério.....	33
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÕES	34
7 REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Conhecido como peixe-zebra, paulistinha, *zebrafish* o *Danio rerio* é uma espécie que tem chamado a atenção da comunidade científica como um modelo não-convencional para a experimentação animal. Sua utilização como modelo experimental está se expandindo rapidamente. Além de suas aplicações tradicionais em biologia e genética vem sendo utilizado em vários outros campos, incluindo ecotoxicologia, triagem de drogas, câncer, xenotransplante e comportamento (LAWRENCE, MASON, 2012).

1.1 Origem e Biologia

Peixe tropical, originário dos principais rios da Índia, Bangladesh e Nepal, tem como nome científico *Danio rerio*, e é um peixe da família Cyprinidae, Ordem Cypriniformes, classificado como um peixe ósseo. Ocupa uma variedade de habitats, incluindo plantações de arroz, lagoas, valas e fluxos, e tolera uma ampla gama de flutuações na temperatura e das condições da água (LEE, PAULL & TYLER, 2020).

É uma espécie gregária, encontrada em cardumes de 5 a 20 indivíduos; além disso, apresenta características como estratégias reprodutivas diversas, comportamento, dietas, tolerância a fatores abióticos e habilidades sensoriais (como emissão de som, produção e detecção de eletricidade, dentre outras (LAWRENCE, 2007).

O peixe adulto mede aproximadamente 4-5cm de comprimento, tem um corpo cilíndrico e um padrão de coloração muito distinta, alternando em faixas horizontas claras e escuras (Figura 1). As fêmeas adultas podem desovar a cada 2-3 dias, com cada desova produzindo centenas de ovos. O embrião de *zebrafish* desenvolve-se rapidamente, com a formação de órgãos primários no primeiro dia pós-fertilização e irá alcançar maturidade sexual em torno de 2-3 meses (TEOH, 2020).

Figura 1 - Aquário com peixes-zebra (*Danio rerio*)



Fonte: próprio autor

1.2 Do rio ao laboratório

O *zebrafish* tornou-se conhecido na comunidade científica através do biólogo e pesquisador norte-americano George Streisinger, da Universidade de Oregon. Ao ter um artigo publicado na prestigiada revista científica Nature, em 1981, Streisinger teve o reconhecimento da comunidade científica em seu modelo de pesquisa. Desde então observamos uma aceleração no crescimento de publicações em artigos científicos usando peixe como modelo biológico.

1.3 Importância como modelo animal experimental

A luta pela diminuição do uso de animais na experimentação científica tem sido longa e alvo constante dos olhares dos órgãos de proteção animal, de grandes indústrias que visam modelos alternativos para testes diversos; a própria comunidade científica, consciente de sua responsabilidade pela vida animal, vem esforçando-se em buscar modelos alternativos não-vivos. Infelizmente, ainda não é possível eliminar totalmente a vida animal da pesquisa científica; portanto, partindo da premissa que não há um modelo alternativo ao animal, a ciência faz o possível para aproveitar o máximo da vida que está sendo alvo de estudo, através dos 3R's:

Reduction (Redução), *Replacement* (Substituição) and *Refinement* (Refinamento) (RUSSELL & BURCH, 1959).

A utilização do *zebrafish* na ciência é parte de um esforço da aplicação dos 3R's, pois é considerado um modelo de substituição parcial, onde todas as fases de seu desenvolvimento são aproveitadas, desde o embrião, fase larval e o peixe adulto.

O genoma do *zebrafish* foi totalmente sequenciado, e foi constatado que 70% de seus genes são homólogos aos genes humanos; se associarmos estes genes às doenças em humanos, esta porcentagem sobe para 84% de homologia (HOWE *et al.*, 2013; WHITE, 2015). Além do fator genético, contamos também com a facilidade de criação, baixo custo de manutenção e estrutura compacta, não exigindo grandes espaços ou adaptações prediais onerosas.

O *zebrafish* está tornando-se rapidamente um modelo vertebrado popular para pesquisas em farmacogenética, toxicologia, obesidade, doenças cardiovasculares, hematologia, neurociência, câncer e biologia desenvolvimento da biologia (TEOH, 2020), consolidando-se como um bom modelo biológico em estudos e abordagens experimentais em laboratório (RESOLUÇÃO NORMATIVA nº 34).

2 OBJETIVOS

O crescimento na utilização de *zebrafish* como modelo animal nos traz muitos desafios quanto ao cuidado e manejo nas instalações animais. Não há formação profissional qualificada para profissionais que irão trabalhar com os peixes, e a demanda pela pesquisa dos mesmos só tem aumentado. Portanto, o objetivo deste trabalho é reunir, através de uma revisão bibliográfica, a maior quantidade de informação para facilitar o cuidado e manejo nas instalações animais de peixes para o pesquisador, professor, técnico e/ou estudante que porventura venha a trabalhar com *zebrafish*.

3 METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho, utilizamos as ferramentas de pesquisa em artigos científicos como as bases dados *PubMed*, *Web of Science* e *Google Acadêmico*. A coleta de dados foi realizada durante os meses de outubro, novembro

e dezembro de 2022. Para a seleção dos artigos, priorizamos a busca e a utilização de publicações e artigos de língua inglesa e que fossem o mais recente possível até o período de coleta deste trabalho. Utilizamos para a coleta as palavras chaves “*zebrafish*”, “*zebrafish welfare*” (bem-estar em zebrafish), “*zebrafish housing*” (alojamento de zebrafish), “*zebrafish husbandry*” (criação de zebrafish), “*zebrafish care*”(cuidados em zebrafish); a coleta de dados também envolveu a legislação vigente brasileira e o conteúdo equivalente em língua portuguesa. A coleta de dados abrangeu artigos publicados no intervalo de 30 a 40 anos, que estivessem em concordância com as resoluções normativas brasileiras que regulam tais procedimentos e/ou que propusessem o que as resoluções não abrangem.

4 RESULTADOS

4.1 Legislação sobre Instalações Animais

Antes de revisarmos os cuidados e manejos do *zebrafish* nos biotérios, é importante conhecer a legislação que regula e norteia todo o trabalho científico da experimentação animal no Brasil.

A Lei Arouca, de nº 11.794, de 08 de Outubro de 2008, sancionou a criação e a utilização de animais de laboratório em atividades de ensino e pesquisa científica em todo o território nacional, posteriormente regulamentada pelo Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. O Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (Concea) é um órgão integrante do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, que tem a responsabilidade de formular as normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica, bem como estabelecer os procedimentos para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal no Brasil.

4.1.1 Estabelecimento da Comissão de Ética no Uso de Animais

Para que o biotério ou instalação animal esteja dentro da lei é preciso:

1. Constituir uma Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) na instituição. A CEUA é condição indispensável para que qualquer instituição

legalmente estabelecida em território nacional, que produza, mantenha ou utilize animais para ensino ou pesquisa científica, possa requerer o credenciamento no Concea;

2. Registrá-la no Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA);

3. Solicitar o credenciamento institucional junto ao Concea. Todo o passo-a-passo do credenciamento está descrito no site do Concea: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea>

A CEUA deve ser constituídas por cidadãos brasileiros e serem integradas por: médicos veterinários e biólogos, docentes (para instituições de ensino) ou pesquisadores (para instituições de pesquisa), representantes de sociedades protetoras de animais legalmente constituídas e estabelecidas no País.

Os médicos veterinários, biólogos, docentes e pesquisadores deverão, obrigatoriamente, ter nível superior, com ou sem pós-graduação, com competência técnica reconhecida e já exercer atividade profissional nas áreas relacionadas à ciência de animais de laboratório (CAL). Os docentes e pesquisadores, além das qualificações anteriores, deverão possuir formação em uma das áreas relacionadas ao escopo da Lei no 11.794, de 2008, e os representantes de sociedades protetoras de animais deverão ter atuação na defesa do bem-estar animal; e ser indicados por sociedades protetoras de animais legalmente constituídas e estabelecidas no País.

Todo o funcionamento de uma instalação animal, desde sua construção física até às práticas diárias estão reguladas pelas Resoluções Normativas nº 50, 51 e 52 do Concea, disponíveis em <https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/paginas/publicacoes-legislacao-e-guia/legislacao-do-concea>.

4.1.2 Estabelecimento do Tipo de Biotérios ou Instalação Animal

Segundo a Resolução Normativa nº 51 do Concea, o biotério ou instalação animal é um local onde são criados ou mantidos animais para serem usados em ensino ou pesquisa científica, que possua controle das condições ambientais, nutricionais e sanitárias.

Para criarmos um biotério ou instalação animal, além de cumprir com a legislação, é importante definirmos a finalidade desta instalação: produção, manutenção ou de utilização.

A instalação animal ou biotério de produção é o ambiente ou local que ofereça as condições necessárias à manutenção do bem-estar animal, compatíveis com as atividades a serem desenvolvidas na reprodução e criação de animais para fins de ensino ou de pesquisa científica.

Uma instalação ou biotério de manutenção é aquele onde os animais permanecem durante o crescimento ou logo após sua saída da instalação animal ou biotério de produção, aguardando a entrada em protocolos experimentais.

A instalação ou biotério de utilização é o ambiente ou local que vai oferecer as condições adequadas para a realização dos protocolos requeridos nos projetos científicos e que contemplem os cuidados necessários para a manutenção do bem-estar animal até a finalização das atividades de ensino ou da pesquisa científica.

4.2 Começando uma instalação animal de *Danio rerio*

Estabelecido o tipo de instalação, podemos começar a delinear nossa instalação, a começar pelo sistema de recirculação de água dos aquários em que manteremos nossos peixes.

4.2.1 Espaço Físico

Uma das vantagens da criação de *zebrafish* é a capacidade de adequar-se em espaços físicos dos mais variados. Não há recomendação em lei sobre requisitos que devem ser contemplados em sua construção, porém podemos seguir parâmetros indicados em diretrizes internacionais, como a encontrada no Guia de Cuidado e uso de peixes na pesquisa, ensino e testes do Conselho Canadense de Cuidado Animal (CCAC, 2022).

Para um projeto de instalação animal de peixes, é necessária uma contribuição significativa de pessoal operacional especializado durante a fase de projeto e construção para garantir que ela atenda aos requisitos dos peixes que

estão sendo mantidos e às necessidades dos pesquisadores e coordenadores da instalação.

Em instalações aquáticas, é particularmente importante garantir que o piso seja suficientemente forte para suportar o peso do total de aquários pretendidos na instalação, somados ao peso da água.

A manutenção de serviços de água, ar, energia elétrica etc., geralmente aumentam depois que a instalação é construída; portanto é necessário incluir no projeto a flexibilidade para futuras intervenções físicas na instalação.

O projeto da instalação deve garantir fácil acesso a todos os sistemas de operação e manutenção, incluindo a limpeza. Fluxos de abastecimento, fluxos de drenagem e outros componentes críticos não devem ser enterrados ou em condições inacessíveis. A construção modular é desejável para permitir a fácil remoção de componentes com o mínimo de interrupção das operações.

As instalações devem ter em seu planejamento áreas de quarentena, separadas para o isolamento de novas unidades populacionais, conforme adequado. As instalações convencionais devem incluir estações de limpeza de pés e mãos, acesso restrito e outras medidas sanitárias comuns para evitar a introdução e propagação de patógenos de animais aquáticos preocupantes.

Os fluxos de abastecimento de água devem ser seguros, protegidos contra interrupções. Sempre que possível, os fluxos de água que vem e vão para os tanques de abastecimento devem ser tubos duros e permanentemente fixos para evitar problemas devido ao achatamento da mangueira, fechaduras de ar, incrustação etc. Isso pode não ser possível em uma instalação de pesquisa onde a flexibilidade da instalação é de suma importância, mas o uso de linhas de encanamento duros antes da bomba de água principal é altamente recomendado.

Todos os fluxos devem ser identificados, para evitar confusão e efeitos potencialmente letais sobre os peixes. Os fluxos de abastecimento de água e de drenagem devem ser planejados de modo a facilitar a limpeza através de métodos simples e de baixa tecnologia. Manômetros e medidores de vazão podem ser instalados em pontos de todo o sistema para monitorar a condição das linhas e o desempenho das bombas e filtros.

Os sistemas que provem o fluxo de ar para a instalação devem ser localizados de modo que apenas seja utilizado ar limpo, isento de gases de motor, fumo de tabaco ou outros contaminantes que venham do ar.

É importante ressaltar que os drenos principais devem ser superdimensionados para lidar com grandes fluxos transitórios de água. As calhas devem ter coberturas niveladas com o chão e que permitam que a água escorra rapidamente. Os drenos e as calhas devem ser planejados para que permitam a limpeza mecânica, para remover qualquer acúmulo de resíduos nos fluxos. Sempre que possível, os drenos de todos os tanques devem ter armadilhas e portas de limpeza facilmente acessíveis. Também importante é incluir o tratamento adequado de efluentes, seguindo os requisitos regulamentares para o efluente, no projeto da instalação. Na maioria das vezes, a descarga para um esgoto municipal proporcionará tratamento adequado dos efluentes do laboratório de peixes.

Outro fator que deve ser incluído no planejamento predial uma bancada grande com pia para limpeza dos utensílios e aquários, bem como espaço para o armazenamento de materiais sobressalentes de aquários, alimentação, equipamentos de proteção individual e coletivo, etc.

4.2.2 Abastecimento de água

O local onde os aquários de *zebrafish* serão mantidos deve apresentar um sistema de abastecimento de água, que pode ser da própria rede de tratamento; no entanto, deve ser previsto um reservatório de armazenamento de água que mantenha pelo menos entre 12h e 24h de abastecimento emergencial. É ideal que este reservatório esteja localizado em um nível acima do nível do alojamento dos aquários, para que eles possam ser abastecidos através da gravidade. Se não for possível, deve-se instalar uma bomba para distribuição da água, de acordo com as necessidades de renovação e abastecimento dos aquários. Uma outra opção é a remoção do cloro livre na água através da adição de produtos químicos comerciais específicos para tal fim ou pela utilização de filtros de clorinizadores (RESOLUÇÃO NORMATIVA nº 34).

Os peixes devem ser mantidos em um sistema mínimo que filtra e oxigena continuamente a água de seus aquários, garantindo a qualidade necessária para um ambiente aquático saudável. O sistema de circulação também ajuda a filtrar o excesso de comida e de excretas dos animais (AVDESH, CHEN et al. 2012).

É perfeitamente possível manter uma instalação de *zebrafish* somente com aquários pequenos, bombas de ar e aquecedores individuais para um modelo de

criação ou experimentação pequeno. No entanto, as modalidades mais comuns de alojamento de *zebrafish* são os sistemas de recirculação. Estes sistemas minimizam o uso de água fazendo a reciclagem da água e mantendo a qualidade da água através de uma série de sistemas de filtragem.

4.2.3 Qualidade e fluxo da água

A condições da água nos laboratórios devem ser controladas e monitoradas para reduzir as flutuações e manter a estabilidade ao longo do tempo. O fluxo de água nos aquários de instalações deve ser homogêneo, com fluxo recomendado de 3 a 5 trocas de volume de aquário por hora para *zebrafish* adulto. O fluxo de água através dos aquários de laboratório varia para cada um dos diferentes estágios da vida. O fluxo de água constante no aquário contribui para o bem-estar dos peixes, ajudando a minimizar a micobacteriose, promover o movimento e, possivelmente, estimular o sistema imunológico. O fluxo de água também pode ser negativo para o bem-estar, especialmente em pequenos aquários, como os aquários de 1 a 10 litros usados em unidades de estantes comerciais, onde a incapacidade de se afastar do fluxo pode aumentar o estresse e os custos energéticos para o peixe (LEE, PAULL, TYLER, 2022).

4.2.4 Aquários

A qualidade e características do material dos aquários devem garantir que o impacto de atividades fora do aquário interfira minimamente em seu bem-estar. O *zebrafish* demonstrou preferência por paredes escuras, e demonstrou ansiedade na presença de paredes brancas. No entanto, se todas as paredes forem de cores opacas ou muito escuras, os problemas de higiene podem não ser óbvios e os peixes terão estimulação visual reduzida (GRAHAM. C, et al., 2017).

Recipientes transparentes têm a vantagem de permitir fácil observação e monitoramento dos peixes, mas percebe-se que o *zebrafish* tem aversão aos fundos de aquário transparentes (SCHROEDER et al., 2014). Além disso, o *zebrafish*, quando em um aquário isolado, demonstra exibir comportamentos de medo em

resposta à visão de um semelhante em estresse num aquário adjacente (contágio por medo) (CCAC GUIDELINES, 2020).

Uma alternativa é cobrir a parte de baixo e três das quatro paredes do aquário com um material opaco escuro, para facilitar a observação dos peixes e o monitoramento da higiene do aquário. No caso de sistemas empilhados, uma superfície escura no fundo de um aquário já provoca uma diminuição da intensidade da luz para os aquários posicionados mais baixos. Luzes adicionais acima do aquário serão necessárias para manter a iluminação consistente para todos os aquários.

4.2.5 Densidade de peixes por aquário

Ainda em relação à manutenção, o *zebrafish* é um peixe gregário que pode ser alocado em densidade de 5 peixes adultos por litro em aquários que tenham aeração, biofiltro, renovação de 70% por dia, boa qualidade da água e bom regime de alimentação. Em aquários sem biofiltro, uma boa relação de densidade para esta espécie é 1-2 animais por litro.

4.2.6 Temperatura

O local onde os aquários serão mantidos deverá contar com controle de temperatura, para facilitar a manutenção da temperatura da água (com aquecedores ou *chillers*) (RESOLUÇÃO NORMATIVA nº 34).

Os peixes devem ser mantidos em aquários ou outro sistema de alojamento equipados com termostato e aquecedores para manter a temperatura da água entre 25°C e 31°C, com temperatura ideal de 28,5°C (LOPES-FERREIRA, 2017). A criação em temperaturas tão baixas quanto 22°C ou tão altas quanto 31°C da desova à metamorfose podem distorcer as proporções sexuais. Seja qual for o sistema de troca de água utilizado, a água de substituição recebida deve ter a mesma temperatura que a água que está substituindo (CCAC GUIDELINES, 2020).

4.2.7 Iluminação

A iluminação afeta o comportamento dos peixes de várias maneiras. Os ciclos de dia e noite moldam os horários em que os peixes se alimentam, reproduzem e descansam e os ritmos de luz sazonais influenciam a reprodução e a desova. Um ritmo de atividade e descanso ocorre no *zebrafish* desde o primeiro dia pós-fertilização, refletindo o ciclo claro-escuro na natureza. Na Índia e em Bangladesh, as horas de luz do dia variam de 10h em dezembro a 13h em junho, com os dias mais longos coincidindo com o início da monção, quando se acredita que o *zebrafish* selvagem se reproduza (SPENCE et al., 2007).

A intensidade da luz pode variar dependendo da posição dos aquários na estante ou sala, e pode ser reduzida para inibir o crescimento de algas. Um ciclo de 14 horas de luz e 10 horas de escuridão com transições de fases foi sugerido como apropriado para peixes-zebra de laboratório (REED & JENNINGS, 2011), mas, ao longo do ano, pode ser adicionado de 1h–4h de luz por dia em relação ao ambiente natural. Esse aumento do comprimento do dia pode aumentar o crescimento e o desempenho reprodutivo (ABDOLLAHPOUR, FALAHATKAR & LAWRENCE, 2020). O fotoperíodo também pode ser alterado ou ajustado em casos excepcionais quando justificado para os objetivos de algum experimento (RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 34).

4.2.8 Ruídos

O *zebrafish* pode aparentar acostumar-se com o ambiente externo, e aparentemente habituar-se a certas vibrações, como a das bombas de ar ou água no ambiente, por exemplo. Mas os peixes também podem reagir fortemente a ruídos altos repentinos ou a novas vibrações, portanto, medidas devem ser tomadas para evitar tais ruídos. O ideal é que qualquer equipamento ou agente causador de vibração ou ruído não seja mantido na mesma sala que os peixes. (REED, JENNINGS, 2011)

A reprodução e desova do *zebrafish* pode ser afetada se o ambiente estiver muito barulhento ou se houver muito movimento ou atividade nas proximidades (CCAC GUIDELINES, 2020)

4.2.9 Umidade

A umidade na instalação animal de zebrafish deve ser controlada para evitar a condensação e o crescimento de mofo. Além disso, outros sistemas que estejam em funcionamento colaborando com o suporte e manutenção dos peixes, e outros componentes do sistema relacionados, devem ser adequadamente protegidos da umidade (CCAC GUIDELINES, 2020).

Do ponto de vista de bem-estar dos peixes, há pouca necessidade de controlar os níveis de umidade na sala; no entanto, a umidade ambiente pode ter um efeito sobre a manutenção da temperatura nos aquários: as salas mais secas terão aquários mais frios ou uma variação de temperatura maior nos aquários, devido ao resfriamento evaporativo na superfície (REED, JENNINGS, 2011).

4.2.10 pH

O pH da água deve ser mantido em um nível estável e ótimo, pois as mudanças no pH podem influenciar outras variáveis da qualidade da água, como a amônia. Dentro de um aquário o pH varia de acordo com a respiração dos peixes e a adição de compostos nitrogenados, que podem variar com as práticas de alimentação e a saúde e a idade dos peixes. É importante monitorar o pH da água nos aquários regularmente, usando um kit de teste colorimétrico ou, de preferência, um medidor de pH eletrônico preciso.

É consenso nas instalações de *zebrafish* manter o pH entre 7,0 - 8,0 (LAWRENCE, 2007). Alguns sugerem apontar para 6,8 - 7,5 e não permitir que o pH seja menor que 6 ou superior a 8 (CCAC GUIDELINES, 2020). Se o pH ficar fora desse intervalo, medidas de mitigação devem ser aplicadas para garantir uma mudança lenta no pH à medida que retorna aos níveis anteriores, como soluções de cloreto de sódio para diminuí-lo ou uma solução de carbonato de sódio para aumentá-lo.

4.2.11 Salinidade e Dureza

O *zebrafish* é relativamente resistente a variações em salinidade, ainda que alterações repentinas possam levar a estresse. Embriões na fase pós-gastrulação são mais tolerantes a aumentos na salinidade do que animais mais jovens. Na ausência de estudos experimentais sobre o tema, a manutenção destes animais em

condições de salinidade recomendadas para outras espécies de peixes de água doce (i.e., 0,25-0,75 ppt) é recomendada (Lawrence, 2007).

Em relação à dureza da água, há considerável variação entre instalações laboratoriais devido a características próprias, incluindo origem da água (rede de tratamento, destilador ou osmose reversa), adição de sais de cálcio e magnésio, tamponamento com bicarbonato, etc. Via de regra, os valores de dureza devem manter-se entre 75-200 mg/L CaCO₃, sendo esses considerados adequados para peixes de água doce (WURTS, 2002).

4.2.12 Alimentação

De maneira geral os *zebrafish* podem se alimentar de alimentos vivos que incluem várias espécies de zooplâncton, como *Artemia sp*, rotíferos e *Paramecium spp*, e alimentos processados.

A dieta com alimentos processados pode ser utilizada para substituir a dieta com alimentos vivos, permitindo uma diminuição de custos, maior controle sobre a nutrição dos peixes e a redução do risco de doenças ou toxinas provenientes da alimentação via dieta viva. A dieta processada pode ser usada como fonte exclusiva após a fase larval, se for nutricionalmente balanceada, estável e de boa digestibilidade. Os alimentos das dietas processadas devem ser estocados e administrados corretamente; também é importante lembrar que alimentos processados devem ser ofertados secos e não hidratados previamente. O tamanho dos grãos de ração seca devem ser de 100 microns para larvas a 300/400 microns para peixes adultos. A alimentação pode ser realizada usando um dispensador simples de alimentos para peixes, uma colher simples ou cortando um conta-gotas de plástico diagonalmente com uma tesoura para dar uma aparência de uma colher pequena (AVDESH, CHEN et al., 2012).

A prática da alimentação viva, além de enriquecer a dieta do animal, reforça seu comportamento natural de busca à presa e pode ser considerado um enriquecimento ambiental. Para a alimentação viva, é recomendada a obtenção de ovos de artêmia, por serem acessíveis e estarem disponíveis em lojas de aquarismo e, podendo ser eclodidos em laboratório, seguindo o passo-a-passo descrito abaixo:

- Dissolva 30g de cloreto de sódio vermelho em 1 litro de água filtrada ou destilada. Coloque 10-15g de ovos de artêmia na solução salina.

- Mantenha a solução salina sob intensa luminosidade e arejada por uma bomba de ar, entre 24 a 48h no máximo.
- Após o período de eclosão dos ovos de artêmia, remova o tubo de ar e esvazie o recipiente em um Becker grande, utilizando a torneira abaixo do nascedouro.
- Após a transferência para o *becker*, aguarde a cultura se estabelecer por 4-5 minutos. Retire os ovos eclodidos, que estarão na superfície do recipiente, com uma pipeta ou peneira fina e descarte.
- Realize o processo de filtragem da solução, eliminando o líquido e filtrando as artêmias e os ovos eclodidos restantes de uma peneira ou filtro fino (350 microns).
- Após a filtragem, despeje o conteúdo filtrado em um Becker com água filtrada ou destilada, com a ajuda de uma pisseta. As artêmias eclodidas se concentram no fundo do recipiente, e tem um aspecto alaranjado.
- Com uma pipeta, colete as artêmias no fundo do Becker e distribua entre os aquários com *zebrafish*.

É de suma importância nos atentarmos à qualidade, mas também à quantidade de alimentos dispensados, que depende do tamanho da população de aquários. A proporção comumente aceita para o *zebrafish* é receber 4% do peso corporal em alimentos por dia. O peixe nunca deve ser superalimentado, pois isso pode aumentar o nível de nitrato na água, possivelmente afetando sua reprodução ou viabilidade, pois alguns peixes podem morrer devido a excessos (AVDESH, CHEN et al., 2012).

4.2.13 Reprodução

Os espécimes de *zebrafish* possuem dimorfismo sexual característico, o que permite diferenciar seus indivíduos machos e fêmeas, imprescindível para o processo de reprodução em instalação animal. As fêmeas adultas. Os machos são geralmente mais esbeltos e de cor mais escura do que as fêmeas, aparentando um corpo mais alongado (Figura 2), enquanto as fêmeas adultas têm um abdômen mais cheio devido aos ovos em desenvolvimento nos ovários (Figura 3) (CCAC GUIDELINES, 2020).

Figura 2 - Zebrafish machos



Fonte: próprio autor.

Figura 3 - Zebrafish fêmeas



Fonte: próprio autor.

Acredita-se que a ovulação em *zebrafish* seja induzida através da presença de feromônios masculinos na água (VAN DEN HURK & RESINK, 1992). O peixe descansa durante o ciclo escuro, e o retorno da luz desencadeia a reprodução dos peixes (CCAA GUIDELINES, 2022), permitindo a coleta de embriões compatíveis com a idade.

A eficácia do protocolo de acasalamento irá determinar a quantidade de produção de ovos viáveis. O manejo reprodutivo de *zebrafish* tem sido mais prático e eficaz quando o acasalamento é realizado em locais separados dos aquários onde os animais vivem.

As fêmeas de *zebrafish* liberam ovos diretamente em um substrato nu, mas quando fornecidas com um local de desova artificial, como uma caixa de plástico cheia de cascalho ou mármore, elas o utilizam preferencialmente. Estes substratos têm sido utilizados para impedir que os peixes comam seus ovos (MATTHEWS et al., 2002); no entanto, agora é mais comum o uso de aquários ou câmaras de reprodução em massa com encaixes para fundos perfurados para este fim

(NASIADKA, CLARK, 2012). Alguns sistemas comerciais possuem fundo gradeado que se encaixa em recipientes maiores preenchidos de água (Figuras 4 e 5), mas é possível improvisar utilizando qualquer barreira física que separe os peixes do substrato e ao mesmo tempo permita que os ovos perpassem a barreira e sejam depositados ao fundo do aquário.

Figura 4 – Sistema comercial de reprodução de *zebrafish* de alta densidade com separador e fundo gradeado



Fonte: próprio autor

Figura 5 - Sistema comercial de reprodução de *zebrafish* de baixa densidade com rampa



Fonte: próprio autor

Os animais exibem rituais de acasalamento antes e durante a desova. Os machos competem pelas fêmeas, estabelecendo e defendendo território. Durante a cômte, nadam em círculos para que as fêmeas os percebam. No momento da desova, nadam paralelo com as fêmeas, provocando a liberação dos óvulos e simultaneamente liberando o esperma para que ocorra a fecundação. Os embriões devem ser retirados do sistema de acasalamento o mais rápido possível, evitando possíveis contaminações. Quando ocorre o acasalamento, os ovos passam pelo fundo gradeado e se depositam na parte inferior do recipiente, ficando assim protegidos do canibalismo. Estes sistemas também possibilitam que os ovos sejam facilmente retirados. O tamanho do sistema determinará a quantidade de peixes que podem ser colocados para acasalamento e o cuidado com a manipulação dos embriões após a desova determinará o sucesso da criação (Resolução Normativa nº 34 do Concea).

Em aquários de reprodução, tem sido reportado maior sucesso de reprodução com grupos acima de cinco peixes, comparado a aquários com pares simples (1 peixe macho e 1 peixe fêmea). No entanto, tem sido comum a reprodução 2:1 (2 machos e 1 fêmea); assim como no aquário de alta densidade, a maior quantidade de machos frente às fêmeas gera competição, reforçando característica nativas do comportamento do peixe e retornando em maior sucesso reprodutivo.

Para a realização da reprodução em biotério, realizamos os seguintes procedimentos:

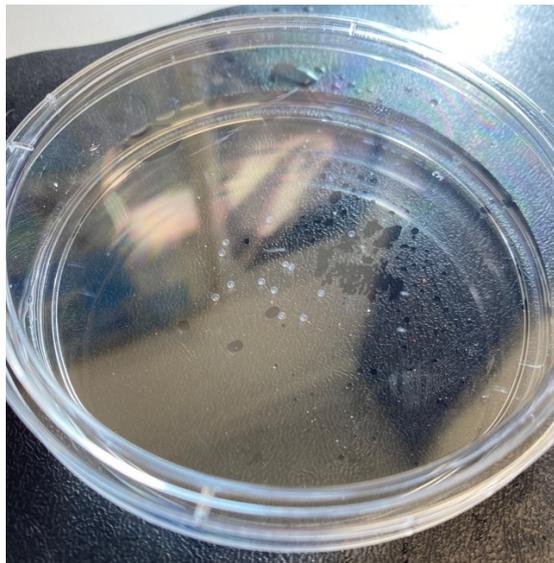
- Prepara-se um aquário de 2 – 3 litros, com um separador (fundo perfurado, malha ou fundo de grelha) que fique próximo ao fundo do aquário, mas não encostado, e então preenche-se com água dos próprios peixes;
- Colocam-se nos aquários os casais reprodutores ou os pequenos grupos de peixes, (de acordo com a escolha e objetivo do usuário), com um separador físico entre os peixes fêmeas e os peixes machos.
- Na manhã seguinte, coloca-se o(s) aquário(s) sob iluminação intensa (lâmpada, abajur ou similar), retira-se o separador de gêneros e aguardamos pela desova e fertilização dos ovos, por cerca de 40 – 60min.
- Durante todo o período da reprodução (desde a separação dos peixes até à desova), é imprescindível que não haja ruídos altos ou movimentações bruscas no

ambiente em que os peixes estiverem, pois é um grande fator de insucesso da reprodução.

- No momento da desova dos peixes, os ovos fertilizados caem através do "chão" do separador, impedindo que os peixes adultos os comam.

- Após este período de espera, é possível observar os ovos fertilizados ao fundo do aquário. Devolve-se os peixes para seus aquários de origem, e os ovos são coletados para contagem e armazenagem. Em seguida, devem ser de maneira cuidadosa lavados com água limpa e transferidos para placas de Petri preenchidas com água (Figura 6 e Figura 7).

Figura 6 - Ovos de *zebrafish* fertilizados e coletados, imersos em meio de manutenção em placa de Petri



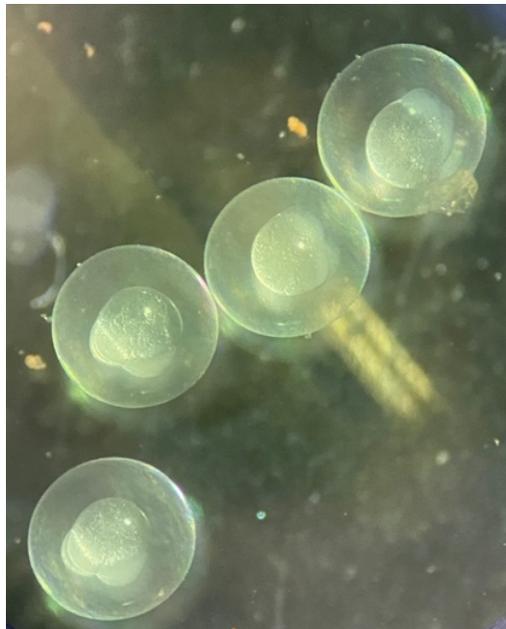
Fonte: próprio autor

Um meio de evitar contaminação dos ovos é utilizar um meio de manutenção, com azul de metileno (0,00003%) dissolvido em água. Após 12 ou 24 horas os embriões não-viáveis são facilmente identificados por sua aparência esbranquiçada e devem ser imediatamente retirados. Os ovos vão permanecer em recipientes de incubação até que as larvas eclodam e inflem a bexiga natatória. Os ovos do *zebrafish* eclodem de 2-3 dias pós-fertilização (dpf). Após esses procedimentos, os ovos ficam em repouso, em recipientes de incubação, até que as larvas eclodam e inflem as bexigas natatórias (LOPES-FERREIRA, 2017). Em condições de laboratório, os *zebrafish* podem reproduzir-se durante todo o ano, com as fêmeas

desovando a cada um a três dias e liberando todos os óvulos maduros dentro de uma única hora (MATTHEWS et al., 2002; SPENCE et al., 2006a).

Os ovos têm um diâmetro de cerca de 1,0 - 1,5 mm (MATTHEWS et al., 2002). Uma fêmea geralmente produz 70-300 ovos transparentes em uma única desova, dos quais pelo menos 80% são fertilizados (CCAC GUIDELINES, 2020); embora o número de ovos possa variar de alguns a mais de 1.000 (REED & JENNINGS, 2011). As fêmeas desovam consistentemente com mais frequência e produzem quantidades maiores de ovos com alguns machos do que outros.

Figura 7 - Ovos de *zebrafish* fertilizados viáveis, sob aumento da lupa



Fonte: próprio autor

Se o acasalamento foi bem-sucedido, os ovos recém-formados estarão depositados no fundo do aquário. Para a retirada dos ovos, passamos a água deste aquário de reprodução sob uma peneira fina, que irá reter os ovos. Com o auxílio de uma pisseta e água esterilizada ou água do próprio aquário, retiramos os ovos da peneira e depositamos em placas de Petri com meio de manutenção, para verificar a viabilidade (separar ovos viáveis de ovos coagulados ou rejeitos) e a contabilidade deles. Após a obtenção dos ovos, deve-se devolver os peixes machos e fêmea do aquário de acasalamento aos seus aquários de origem.

4.2.14 Eutanásia

Segundo a Resolução Normativa nº 37 do Concea, a preparação para o procedimento de eutanásia deve considerar, em primeiro plano, o bem-estar do peixe, mantendo-o dentro da sua zona de conforto. A eutanásia em peixes deve ser realizada em duas etapas: 1º) Uso de anestésico, até a perda do equilíbrio do peixe; 2º) Utilização de método físico / químico que cause a morte cerebral do peixe.

Os métodos recomendáveis, segundo Resolução Normativa nº 37 do CONCEA são:

- Benzocaína (imersão): pode ser usada para imersão e sistema de recirculação para peixes. Sua forma isolada de benzocaína não é hidrossolúvel e deve ser preparada em álcool. O hidrocloreto de benzocaína é hidrossolúvel e pode ser usado diretamente para anestesia ou eutanásia. Os peixes devem ser mantidos imersos na solução por pelo menos 10 minutos após cessar o movimento opercular.
- Sulfonato metano de triclaína (TSS ou MS222) (imersão): a eficiência deste anestésico é variável e pode apresentar alguns efeitos adversos como perda de muco, irritação das brânquias e olhos, bem como danos a córnea. No homem, causa irritação por contato na pele e por inalação, bem como danos na retina.
- Óleo de cravo da Índia ou eugenol (imersão): ambos podem ser utilizados para eutanásia de peixes. É pouco solúvel em água e solúvel em solventes orgânicos, como o álcool.
- Anestésicos gerais via intravenosa: propofol, etomidato ou metomidato.
- Anestésicos inalatórios, seguido de outro método para assegurar a morte.

Os métodos de eutanásia aceitos com restrição pela legislação são: atordoamento; atordoamento ou anestesia geral e decapitação; atordoamento e destruição do cérebro (perfuração craniana); atordoamento e secção da medula espinhal; atordoamento por eletronarcole, seguido de exsanguinação ou de outro método que assegure a morte. O atordoamento ou concussão só devem ser utilizados após a anestesia, a não ser que os animais se encontrem sob estresse

extremo, e o tempo até o preparo da anestesia provocar um sofrimento prolongado no animal. A perfuração ou esmagamento do cérebro após atordoamento só é autorizada quando qualquer outro método trouxer incompatibilidade no experimento, e ainda diante da impossibilidade total de uso de outros métodos que possam interferir nos resultados da pesquisa, e o uso de anestésicos não for possível.

Também é aceito: 2-fenoxietanol (imersão). Este método é aceito desde que os outros métodos interfiram nos resultados da pesquisa. Utilizado em concentrações de 0,5 a 0,6 ml/l ou 0,3 a 0,4 mg/l para causar a morte em peixes; estes devem ser mantidos imersos na solução por pelo menos 10 minutos após o movimento opercular ter cessado.

Os métodos considerados inaceitáveis pela legislação do CONCEA são: deslocamento cervical; decapitação ou secção da medula espinhal; maceração; CO₂ e Hipotermia. A hipotermia pode ser aceita com restrição, desde que os outros métodos aceitos cientificamente comprometam os resultados da pesquisa e que a justificativa seja detalhada na proposta submetida a análise pela CEUA da Instituição. Métodos diferentes dos descritos, ou novos métodos que sejam lançados, só podem ser utilizados desde que comprovados os mecanismos de ação de forma científica, em literatura de impacto internacional e respeitados os preceitos aqui estabelecidos, ou seja, se forem rápidos e não causarem dor ou sofrimento. Em casos de dúvida, é necessária a consulta ao anexo da Resolução Normativa nº 37, ou solicitar auxílio à CEUA, que deve consultar o CONCEA.

4.2.15 Descarte de Carcaças

As carcaças dos peixes são consideradas um risco à saúde pública e ao meio ambiente, tornando-se meios de cultura e de disseminação de doenças e/ou contaminantes. Portanto, suas carcaças, bem como os restos de tecidos, devem ser acondicionadas em sacos plásticos de classe II, específicos para descarte de material biológico, de cor branca leitosa, identificado com a simbologia de substância infectante e risco biológico.

Após embalado, o material pode ser mantido em câmaras frias (ou freezers a -18 °C) por um período de até 24 horas, devendo então ser recolhido por empresas especializadas e transferido ao seu destino. Alguns destinos possíveis são aterros sanitários, autoclavação e incineração (RESOLUÇÃO NORMATIVA nº 37).

4.2.16 Uso de Equipamentos de Proteção Individual

Recomenda-se o uso de EPIs ao adentrar um biotério de peixes. O uso de propé, jaleco ou avental, touca e luvas faz-se necessário para evitar a contaminação e o carregamento de sujidades do ambiente externo ao ambiente de criação e/ou experimentação.

4.2.17 Checagem na Instalação ou Biotério

É extremamente importante que qualquer pessoa que trabalhe, pouco ou muito frequente, em um biotério esteja atento à checagem. Checagem diária de temperatura do biotério, iluminação, parâmetros da água dos aquários (pH, temperatura, dureza, etc), estado dos aquários (limpeza), estado dos animais (agitados, parados, ocorrência de óbitos), organização e limpeza do ambiente, reunião de todos os recursos necessários antes de começar um procedimento específico.

4.2.18 Limpeza e Desinfecção do Biotério

A agenda de limpeza e desinfecção do biotério de *zebrafish* deve ser projetada e implementada para manter condições adequadas à saúde do animal e ao ambiente onde está instalado, evitando o acúmulo de resíduos e a contaminação cruzada de água e bens recém-tratados.

Os aquários são trocados ou desinfetados de forma que sempre garanta a qualidade da água e permita a visualização e o monitoramento dos peixes. Os componentes do sistema que acumulam partículas de alimentos, como o fundo dos aquários, devem ser higienizados regularmente. É recomendada a troca de tampas e higienização de aquários semanalmente, e a troca dos aquários trimestralmente. Aquários e outros componentes podem ser lavados com desinfetante ou água quente, desde que não permita o acúmulo de resíduos destas substâncias nos componentes. As redes e puçás podem ser higienizadas por desinfetante, autoclavagem, sistema automatizado de lavagem de gaiolas ou água quente.

Salas e macroambiente (estantes, bancadas, carrinhos) podem ser higienizados conforme necessário. Mas pode-se definir uma limpeza trimestral para as estantes; bancadas e espaços de trabalho são limpos após o uso, diariamente, e carrinhos de transporte e pisos são limpos semanalmente, sempre com materiais neutros, que não exalem odores fortes no ambiente.

5 DISCUSSÃO

Observamos que o *zebrafish* possui uma ótima adaptabilidade para ambientes de cativeiro. Embora não haja ampla literatura científica nacional corroborando técnicas e procedimentos, os parâmetros para a criação destes animais em instalações de produção, manutenção ou experimentação são bem claros e específicos, sem maiores discordâncias.

É necessário salientar que, embora existam grandes modelos de instalações em grandes instituições, com imenso aporte para investimento em equipamentos específicos e automatizados para facilitar o manejo dos peixes, há também um enorme potencial em iniciar uma instalação de *zebrafish* de baixo custo e fácil operabilidade e manutenção.

A contribuição deste modelo experimental para a comunidade científica não deve ser diminuída por fatores extrínsecos como um orçamento limitado para adquirir aparelhos e equipamentos de última geração. Não há dúvida quanto à sua contribuição ao manejo e à padronização de parâmetros e resultados; no entanto, o *zebrafish* vem trazer novas experiências quanto à produção de animais de forma rápida, facilitada e não-dependente de alta tecnologia.

6 CONCLUSÕES

Oriundos de águas selvagens asiáticas, os peixes *zebrafish* possuem uma ótima adaptabilidade para ambientes fechados e controlados, e os cuidados para mantê-lo nestas condições em instalações animais para manutenção ou experimentação tem-se mostrado acessíveis tanto para pesquisadores experientes como para novos pesquisadores engajados em iniciar neste novo modelo de experimentação. Com a devida atenção aos parâmetros de cuidado e manejo destes animais, a observação à legislação prevista, e treinamento técnico para a

manutenção do status sanitário da instalação, o estabelecimento de uma instalação de *zebrafish* ocorrerá com sucesso.

7 REFERÊNCIAS

ABDOLLAHPOUR, H., FALAHATKAR, B., JAFARI, N. & LAWRENCE, C. **Effect of stress severity on zebrafish (*Danio rerio*) growth, gonadal development and reproductive performance: do females and males respond differently?** *Aquaculture* 522, 1–8. 2020. Acesso em: 01 nov. 2022.

AVDESH, A., CHEN, M., MARTIN-IVERSON, M. T., et al.. **Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction.** *Journal of Visualized Experiments*, v.69, e4196, 2012. Acesso em: 01 dez, 2022.

BRASIL. **Decreto Nº 6.899, de 15 de julho de 2009.** Brasília, 2009. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6899.htm. Acesso em: 22 nov. 2022.

BRASIL. **Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.** Brasília, 2008. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm. Acesso em: 22 nov. 2022.

CANADA COUCIL ON ANIMAL CARE. **Guidelines on the care and use of fish in research, teaching and testing.** 2005. 94p. Acesso em 01 dez. 2022

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **CCAC guidelines: Zebrafish and other small, warm-water laboratory fish.** 2020. 111p. https://ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/CCAC_Guidelines-Zebrafish_and_other_small_warm-water_laboratory_fish.pdf Acesso em: 01 de nov. 2022.

GRAHAM, C; VON KEYSERLINGK, M.A.G.; FRANKS, B. **Zebrafish welfare: Natural history, social motivation and behaviour.** *Applied Animal Behaviour Science*, [S. l.], ano 2018, p. 13-22, 26 nov. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.11.005> . Acesso em: 24 out. 2022

HOWE, K.; CLARK M. D.; TORROJA, C. F.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C., MUFFATO M.; COLLINS J. E.; HUMPHRAY S.; MCLAREN K.; MATTHEWS L. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v.496, n. 7446, p. 498-503, abr. 2013. Acesso em: 22 nov. 2022.

LAWRENCE, C. (2007). **The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review**. In *Aquaculture* (Vol. 269, Issues 1–4, pp. 1–20). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>. Acesso em 27 out. 2022

LAWRENCE, C., & MASON, T. (2012). **Zebrafish Housing Systems: A Review of Basic Operating Principles and Considerations for Design and Functionality**. *ILAR Journal*, 23(2), 179–191. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.179>. Acesso em 19 Out. 2022

LEE, C. J., PAULL, G. C., & TYLER, C. R. (2022). **Improving zebrafish laboratory welfare and scientific research through understanding their natural history**. *Biological Reviews*, 97(3), 1038–1056. <https://doi.org/10.1111/brv.12831>. Acesso em 19 Out. 2022

LOPES-FERREIRA, M. Peixe-zebra. *In*: LAPCHICK V.B.V, MATTARAIA V.G.M, KO, G.M,. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**, 2ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2017, p.295-306. Acesso em 17 Out. 2022

MATTHEWS, M.; TREVARROW, B.; MATTHEWS, J. A virtual tour of the guide for zebrafish users. **Lab Animal**, v. 31, n. 3, p. 34-40, mar. 2002. Acesso em: 01 dez. 2022

MCTIC (Brasil). CONCEA. Resolução Normativa nº 34, de 27 de julho de 2017. "Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica para fins de estudo biológico ou biomédico I - Lambari (*Astyanax*), Tilápia (*Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis*) e Zebrafish (*Danio rerio*)", Brasília, 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/resolucao-normativa-no-34-de-27-de-julho-de-2017.pdf/view>. Acesso em: 18 nov. 2022

MCTIC (Brasil). CONCEA. Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. **Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**. Brasília, 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/resolucao-normativa-no-37-de-15-de-fevereiro-de-2018.pdf/view>. Acesso em: 18 nov. 2022.

MCTIC (Brasil). CONCEA. Resolução Normativa nº 44, de 01 de agosto de 2019. **Peixes mantidos em instalações de instituições e ensino ou pesquisa científica**. Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/resolucao-normativa-no-44-de-1o-de-agosto-de-2019.pdf/view>. Acesso em: 01 dez. 2022.

MCTIC (Brasil). CONCEA. Resolução Normativa nº 49, de 07 de maio de 2021. **Obrigatoriedade de capacitação do pessoal envolvido em atividades de ensino e pesquisa científica que utilizam animais**. Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-concea/mcti-n-49-de-7-de-maio-de-2021-318712950>. Acesso em: 18 nov. 2022.

MCTIC (Brasil). CONCEA. Resolução Normativa nº 50, de 13 de maio de 2021. **Critérios e procedimentos para emissão, extensão, revisão, suspensão, reativação, renovação e cancelamento do Credenciamento Institucional para Atividades com Animais em Ensino ou Pesquisa – CIAEP**. Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-gm-n-50-de-13-de-maio-de-2021-320652982>. Acesso em: 18 nov. 2022

MCTIC (Brasil). CONCEA. Resolução Normativa nº 51, de 19 de Maio de 2021. **Instalação e o funcionamento das Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs e dos biotérios ou instalações animais**. Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-normativa-concea-n-51-de-19-de-maio-de-2021-321534226>. Acesso em: 19 nov. 2022.

MCTIC (Brasil). CONCEA. Resolução Normativa nº 52, de 19 de Maio de 2021. **Formulários unificados para solicitação de autorização para uso de animais em**

ensino ou pesquisa científica e sobre a autorização e certificação pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs. Brasília, 2021. Disponível em <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-normativa-concea-n-52-de-19-de-maio-de-2021-321640980>. Acesso em: 19 nov. 2022.

NASIADKA, A.; CLARK, M. D.; **Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment.** ILAR Journal, v. 53, n. 2, p. 161-168, jun. 2012. Acesso em: 01 dez. 2022

REED, B., JENNINGS, M. **Guidance on the housing and care of Zebrafish *Danio rerio*.** Research Animals Department, Science Group, RSPCA, 2011. 64p.

RUSSELL, W. M. S. AND BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique.** London: Methuen, 1959. Acesso em: 17 nov. 2022

SCHROEDER, P., JONES, S., YOUNG, I. S. & SNEDDON, L. U. **What do zebrafish want? Impact of social grouping, dominance and gender on preference for enrichment** (2014). *Laboratory Animals* 48, 328–337. Acesso em: 19 nov. 2022

SPENCE, R.; FATEMA, M. K.; REICHARD, M.; HUQ, K. A.; WAHAB, M. A.; AHMED, Z. F.; SMITH, C. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal Of Fish Biology*, v. 69, n. 5, p. 1435-1448, nov. 2006. Acesso em 01 dez. 2022.

STEVENS, C.H.; REED, B.T.; HAWKINS, P. **Enrichment for Laboratory Zebrafish—A Review of the Evidence and the Challenges.** *Animals*, 2021], p. 698-720, 5 maio 2021. doi.org/10.3390/ani11030698. Acesso em: 19 out. 2022.

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

TEOH, S. L., SAPRI, S. R. BIN, YUSOF, M. R. B. M., YAHAYA, M. F., & DAS, S. (2020). **Construction of an Affordable Open-Design Recirculating Zebrafish**

Housing System. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 59(5), 512–518. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-19-000167>

VAN DEN HURK, R.; RESINK J. W. **Male reproductive system as sex pheromone producer in teleost fish.** Journal Of Experimental Zoology, v. 261, n. 2, p. 204-213, feb 1992. Acesso em 20 out. 2022

WASHINGTON UNIVERSITY IN ST. LOUIS. **Policy for the Housing and Care of Zebrafish and Other Fish Species in Satellite Facilities.** 2022. Acesso em: 18 out. 2022.

WHITE, R. M. Cross-species oncogenomics using zebrafish models of cancer. **Curr Opin Genet Dev.** v. 30, p. 73–79, fev. 2015. Acesso em: 22 nov. 2022