

## Embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*).

Como modelo na avaliação de teratogénese causada por tóxicos.

### CATEGORIA

Artigo

### CITAÇÃO

Ribeiro, O. et al. (2024)

Embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*),

*Rev. Ciência Elem.*, V12(01):003.

[doi.org/10.24927/rce2024.003](https://doi.org/10.24927/rce2024.003)

### EDITOR

João Nuno Tavares

Universidade do Porto

### EDITOR CONVIDADO

Sónia Gouveia

Universidade de Aveiro

### RECEBIDO EM

02 de agosto de 2021

### ACEITE EM

18 de janeiro de 2022

### PUBLICADO EM

15 de abril de 2024

### COPYRIGHT

© Casa das Ciências 2024.

Este artigo é de acesso livre, distribuído sob licença Creative Commons com a designação [CC-BY-NC-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/), que permite a utilização e a partilha para fins não comerciais, desde que citado o autor e a fonte original do artigo.

[rce.casadasciencias.org](https://rce.casadasciencias.org)



**Ondina Ribeiro\*‡, Luís Félix\*‡, Sandra Mariza Monteiro\*‡, Cláudia Ribeiro‡,‡, António Fontainhas-Fernandes\*‡, João Soares Carrola\***

\* CITAB/UTAD | †IH-TOXRUN/CESPU | ‡Inov4Agro | ‡CIIMAR

A utilização de modelos animais vertebrados na investigação tem sido fundamental para a compreensão dos processos fisiopatológicos humanos. No entanto, nas últimas duas décadas, a utilização de modelos vertebrados alternativos tem vindo a aumentar, tendo em conta o princípio dos 3 Rs proposto por William Russell e Rex Burch em 1959. Neste sentido, o uso do peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo na investigação de ciências biomédicas e patologias humanas teve um aumento considerável. De facto, esta espécie apresenta um conjunto de características bioquímicas, fisiológicas, genéticas morfológicas e embriológicas que o tornam um modelo de estudo muito utilizado. Possui um ciclo de vida rápido, reprodução durante todo o ano, fecundidade elevada, e, além disso, o córion é transparente e o embrião semitransparente, o que torna a observação do desenvolvimento embrionário muito fácil usando uma lupa ou microscópio. Acrescem a estas vantagens considerações éticas na avaliação do potencial teratogénico de compostos químicos, como sejam o facto das fases iniciais de vida até às 120 horas após fertilização, não serem consideradas como “animais experimentais”, de acordo com a diretiva da União Europeia 2010/63/EU, transposta para o Decreto-lei 113/2013, respeitante à proteção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos.

Este trabalho pretende fazer uma abordagem geral sobre a utilização do embrião de peixe-zebra como modelo animal para: a) avaliar o potencial teratogénico de compostos; b) analisar algumas das metodologias usadas para avaliação das malformações e c) utilização de diferentes parâmetros como indicadores de toxicidade. São também abordadas as diferentes formas de classificação das malformações e a sua severidade de forma a classificar os compostos químicos como teratogénicos ou não.

### Modelos animais na investigação biomédica.

O uso de modelos animais vertebrados na investigação biomédica remonta ao século VI a.C, na Grécia Antiga, para o estudo da anatomia e fisiologia humana. Apesar das grandes descobertas no período inicial da investigação, ainda havia diversos equívocos e lacunas sobre o funcionamento do corpo humano. Só no Renascimento (séculos XIV a XVI) é que os organismos modelo contribuíram para uma verdadeira mudança na compreensão da histologia e fisiologia humana, o que levou à sua utilização até aos dias de hoje<sup>26,27</sup>.

Desde o século passado, estes modelos animais têm vindo a ser utilizados para entender as doenças humanas e os seus mecanismos fisiopatológicos a nível celular e molecular<sup>43</sup>, bem como para o desenvolvimento de novos fármacos, vacinas, terapias, entre outros<sup>6</sup>.

A investigação biomédica centrou-se muito na utilização de roedores, devido à sua semelhança anatómica, fisiológica, bem como à sua elevada homologia com o genoma humano<sup>16</sup>.

Contudo, diversos outros vertebrados podem ser utilizados, tais como anfíbios, peixes, coelhos, cães, incluindo, em situações excepcionais, primatas não-humanos.

No entanto, a preocupação crescente com o bem-estar animal veio alterar o panorama da utilização de animais como modelos para investigação e para fins pedagógicos<sup>39</sup>. Esta preocupação remonta já a 1959, quando William Russell e Rex Burch publicaram o livro *Os Princípios Humanitários da Técnica Experimental*<sup>55</sup>, pioneiros na formulação do princípio dos 3 Rs (*Replacement, Reduction and Refinement*, em português *Substituição, Redução e Refinamento*). Este princípio é cientificamente aceite e tem sido implementado na legislação mundial relativa à experimentação animal<sup>27,47</sup> e também na legislação portuguesa, em particular o Decreto-lei 113/2013, respeitante à proteção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos.

Com o aumento da investigação a nível global, registou-se também um incremento no número de animais vertebrados utilizados. No entanto, em consonância com a crescente preocupação com o bem-estar animal, tornou-se necessário desenvolver ensaios e metodologias alternativas considerando a necessidade, viabilidade, ética, potencial dano causado e o retorno da investigação realizada<sup>8</sup>. Essas alternativas incluem ensaios *in silico* (simulações computacionais)<sup>57</sup> e *in vitro* (realizados em ambiente controlado de laboratório)<sup>67</sup> contribuindo de forma relevante na substituição e na redução do número de animais utilizados<sup>52</sup>.

Nos últimos anos, tem havido um interesse científico crescente em estabelecer organismos modelo alternativos para substituir mamíferos e vertebrados superiores, em conformidade com o já referido princípio dos 3 Rs. Alguns exemplos de organismos modelo alternativos são a mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*)<sup>35</sup>, o nemátodo terrestre (*Caenorhabditis elegans*)<sup>11</sup> e o peixe-zebra (*Danio rerio*)<sup>2, 33, 38, 53</sup>. Esses organismos oferecem oportunidades valiosas, permitindo avanços científicos sem a necessidade de utilizar animais vertebrados de maior complexidade.

### **Substituição de roedores por Peixe-zebra nos estudos de teratogénese.**

A utilização de testes de toxicidade *in vivo* com roedores tem permitido a avaliação dos efeitos induzidos por tóxicos no seu desenvolvimento embrionário, no entanto, a sua utilização na investigação fundamental e aplicada tem diminuído<sup>9, 19</sup>. Como alternativa, o peixe-zebra tem vindo a ganhar destaque devido à semelhança e conservação dos seus mecanismos moleculares com os mamíferos, durante a organogénese<sup>4</sup>. Adicionalmente, a organogénese da maioria dos órgãos do peixe-zebra é concluída até aos 5 dias após-fertilização, muito mais rápida do que em roedores. Esta rapidez e a comparabilidade dos resultados têm validado o peixe-zebra como um modelo experimental adequado, resultando num aumento considerável da sua utilização em detrimento do rato (*Rattus norvegicus*) e/ou do murgancho (*Mus musculus*). Adicionalmente, o peixe-zebra oferece uma série de vantagens em relação aos modelos roedores (TABELA 1). Como consequência, este organismo tem vindo a ser crescentemente utilizado para estimar o potencial teratogénico de compostos tóxicos em outros vertebrados e em humanos<sup>43, 56, 68</sup>. Num estudo realizado por Jarque *et al.*<sup>34</sup>, foram testados 31 compostos e os resultados mostraram que o peixe-zebra pode ser utilizado para prever a teratogenicidade em mamíferos, apresentando elevada sensibilidade (94,44%), especificidade (90,91%) e precisão (87,10%), de forma similar aos roedores.

Apesar do peixe-zebra não substituir completamente os roedores como modelo para prever a toxicidade durante o desenvolvimento, é útil para fazer uma estimativa preliminar de teratogenicidade para muitos compostos e é um ótimo modelo em ensaios ecotoxicológicos<sup>12, 13, 51, 62</sup>.

TABELA 1. Comparação entre as características do peixe-zebra e roedores<sup>2</sup>.

| Características                           | Peixe-zebra             | Roedores  |
|---|-------------------------|---|
| Tamanho                                   | Pequeno (3-4 cm)        | Relativamente grande em particular o rato (≈ 500gr) |
| Custos de manutenção                      | Relativamente baixos    | Relativamente altos                                 |
| Requisitos de alojamento                  | Menos espaço necessário | Ocupa muito espaço                                  |
| Desenvolvimento                           | Externo                 | Interno   |
| Tempo de vida                             | ≈ 3 a 5 anos            | ≈ 2 a 4 anos  |
| Observação do desenvolvimento embrionário | Fácil usando uma lupa   | Possível com recurso a ultrassons                   |
| Manipulação genética                      | Relativamente fácil     | Processo difícil                                    |
| Ciclo experimental                        | Curto                   | Longo   |
| Restrições éticas                         | Poucas                  | Bastantes   |

### O Peixe-zebra como organismo modelo.

O peixe-zebra emergiu como modelo animal a partir da década de 1980<sup>61</sup>, principalmente na área da biologia do desenvolvimento. No entanto, ao longo dos anos, o peixe-zebra tem-se estabelecido como organismo modelo em diversas áreas de investigação, como evidenciado na TABELA 2. A sua versatilidade e características favoráveis têm impulsionado o seu uso em estudos sobre diversos aspetos biológicos e fisiológicos, tornando-o numa ferramenta valiosa para a compreensão dos mecanismos biológicos e a investigação de doenças.

TABELA 2. Áreas de investigação que usam o peixe-zebra como organismo modelo.

| Áreas de investigação       | Bibliografia  |
|-----------------------------|---|
| Biologia do desenvolvimento | Kimmel et al. (1995); Briggs (2002); Bailey et al. (2013)           |
| Biomédica                   | Valle et al. (2020); Choi et al. (2021); Dubey et al. (2022)        |
| Carcinogénese               | Stoletov e Klemke (2008); White et al. (2008); Gamble et al. (2021) |
| Ecotoxicologia              | Nagel (2002); Braunbeck et al. (2005); Ribeiro et al. (2023)        |
| Genética                    | Bandmann e Burton (2010); Crouzier et al. (2021); Choe e Kim (2023) |
| Neurociência                | Kalueff et al. (2014); Abreu et al. (2020); Gerlai (2022)           |
| Toxicologia                 | Dai et al. (2014); Tanguay (2018); Brito et al. (2022)              |

*D. rerio* compartilha muitas características com outras espécies de vertebrados, apresentando um plano corporal básico de cordados, incluindo notocorda, neurocrânio, células da crista neural, estruturas epidérmicas definidas, placódios sensoriais e estruturas neurológicas distintas<sup>8, 41 44</sup>. Estas semelhanças tornam o peixe-zebra um modelo ideal para estudar uma ampla gama de processos biológicos, desde o desenvolvimento embrionário até à resposta imunológica. Permite ainda fazer a microinjeção celular, uma técnica útil para introduzir tóxicos ou toxinas diretamente no ovo<sup>22</sup>, e mimetizando a transferência parental<sup>58</sup> e que pode ser realizada de forma automatizada<sup>71</sup>.

Adicionalmente, existem outras vantagens para a utilização desta espécie como organismo modelo na investigação, como detalhado na FIGURA 1 e discutido em estudos anteriores<sup>31, 51</sup>.



FIGURA 1. Esquema com as diversas vantagens da utilização do peixe-zebra como organismo modelo, quer como adulto quer na fase de embrião.

O genoma do peixe-zebra foi completamente sequenciado e compartilha elevada homologia genética com os vertebrados superiores, exibindo um grande número de características genéticas comuns a outros vertebrados<sup>33</sup>. Aproximadamente 70% dos genes humanos têm pelo menos um gene ortólogo no peixe-zebra, o que evidencia uma importante semelhança genética entre as duas espécies. Adicionalmente, as vias de desenvolvimento são conservadas entre o peixe-zebra e o ser humano<sup>72</sup>, tornando-o particularmente sensível a compostos que podem causar efeitos teratogênicos. Estas características destacam a adequação do peixe-zebra como um modelo experimental para estudar os efeitos de substâncias tóxicas e sua potencial influência no desenvolvimento embrionário.

Apesar das vantagens do peixe-zebra como organismo modelo na investigação serem muitas e aumentarem com o avanço da manipulação genética, também existem algumas limitações/desvantagens ao seu uso e que devem ser consideradas.

O peixe-zebra é ovíparo e os embriões desenvolvem-se externamente, ao contrário dos organismos placentários como os mamíferos<sup>23</sup>. Isto faz com que a exposição aos compostos seja diferente (exposição direta *versus* indireta), o que pode levar a variações na taxa de absorção, distribuição, metabolização e capacidade de ativação do tóxico no peixe-zebra em comparação com os mamíferos<sup>65</sup>. Adicionalmente, a presença do córion (FIGURA 2) até às 48 ou 72 horas após-fertilização<sup>38</sup> confere uma barreira contra substâncias tóxicas com tamanho molecular superior a 3000 Da, o que pode dificultar a sua entrada e a exposição do embrião. Esta característica pode ser muito útil pois é possível fazer a desinfecção dos ovos antes do início dos ensaios ou antes da sua transferência para outros centros de investigação, permitindo uma melhor segurança sanitária minimizando a transferência de parasitas, bactérias, vírus ou fungos<sup>37,70</sup>.

Esta espécie é evolutivamente mais distante em relação ao Homem do que outros organismos vulgarmente usados como espécies modelo, como por exemplo os roedores<sup>40</sup>. Além disso, não possui alguns órgãos e estruturas comparativamente aos humanos, como por exemplo pulmões, membros, articulações, septo cardíaco, entre outros, o que dificulta a sua utilização em algumas áreas de investigação. Adicionalmente, a determinação sexual do peixe-zebra também difere dos mamíferos, uma vez que esta espécie não possui um cromossoma que define o sexo do organismo e possuem um mecanismo de determinação sexual altamente complexo<sup>3,32</sup>.

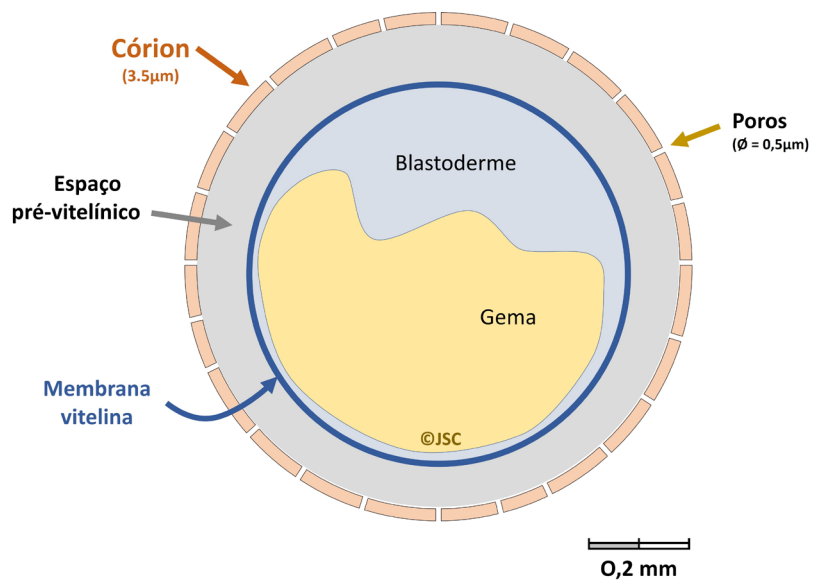


FIGURA 2. Estrutura geral do ovo de peixe-zebra, onde se pode observar um invólucro fino e duro (córion) que confere proteção e que pode ser uma barreira para as substâncias tóxicas presentes na água<sup>30</sup>.

### Teratogênese.

A teratologia é a ciência que estuda as alterações nos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de um embrião ou feto, podendo traduzir-se em modificações estruturais (malformações congénitas) nos organismos vivos. Na maioria dos casos pode estar associada à ação de um agente químico (por exemplo, medicamentos, substâncias psicoativas, tóxicos, entre outros) ou físico (por exemplo, radiação). As definições de teratogênese podem incluir alterações bioquímicas, malformações, além de defeitos subtis no comportamento, memória e aprendizagem<sup>20</sup>. Assim, torna-se importante a avaliação dos efeitos teratogénicos que os diversos compostos podem exercer ao longo das primeiras fases de desenvolvimento do peixe-zebra.

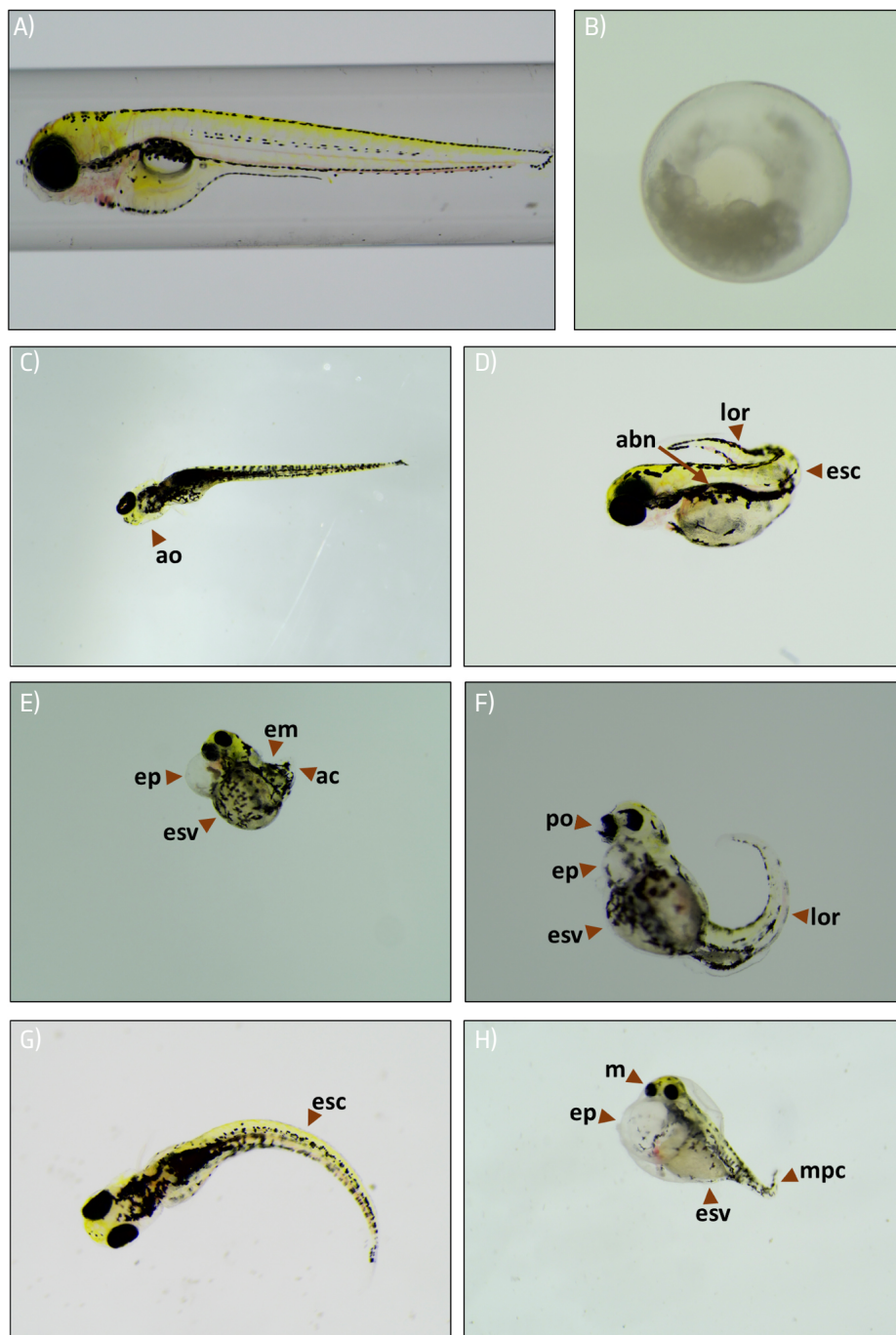
### Tipos de malformações em embriões de peixe-zebra.

Os ensaios alternativos aos testes de toxicidade de desenvolvimento em animais têm sido desenvolvidos ao longo dos anos, incluindo o teste de embriotoxicidade em peixe-zebra (*Zebrafish Embryotoxicity Test* – ZET). Em 2013 foram adotadas e validadas as diretrizes da *Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico* (OCDE) para o teste de toxicidade aguda em embriões de peixe (*Fish Embryo Acute Toxicity* – FET test), o protocolo n.º 236 (OECD, 2013). Este teste encontrou ampla aceitação na comunidade científica como substituto aos ensaios agudos com juvenis e adultos, e até provou ter maior sensibilidade em relação aos seres humanos do que outros organismos modelo<sup>66</sup>.

Alguns estudos têm avaliado a importância do uso de peixe-zebra para prever o potencial teratogénico de numerosos compostos tóxicos<sup>12, 45, 56, 63, 66</sup>. Estes estudos focam-se essencialmente em três alterações durante o desenvolvimento anormal do organismo: mortalidade, malformações e atraso no crescimento<sup>56</sup>.

No entanto, existe uma elevada variabilidade entre os parâmetros avaliados, bem como uma incoerência na nomenclatura utilizada, o que dificulta a comparação dos resultados entre estudos<sup>66</sup>. Assim, torna-se importante padronizar o sistema de classificação para avaliação do desenvolvimento e malformações dos embriões e larvas de peixe-zebra, de forma a melhorar a reprodutibilidade e a comparação entre os diferentes estudos<sup>31</sup>.

Na FIGURA 3, são apresentados exemplos de algumas malformações que podem ser encontradas em larvas de peixe-zebra.



**FIGURA 3.** Fotografias de larvas de peixe-zebra (*D. rerio*) com 96 horas após-fertilização (hpf), com desenvolvimento normal. A) Fotografias que mostram larvas com diversas malformações. B) Embrião coagulado. C) Larva com ausência de um olho (ao). D) Larva com curvatura da cauda (escoliose - esc e lordose - lor) e ausência de bexiga natatória (abn). E) Larva com edema no pericárdio (ep) e edema no saco vitelino (esv), esqueleto malformado (em), ausência de cauda (ac). F) Larva com edema no pericárdio (ep) e no saco vitelino (esv), alterações na pigmentação do olho (apo), curvatura da cauda (lordose - lor). G) larva com curvatura da cauda (escoliose - esc). H) Larva com microftalmia (m), malformação na ponta da cauda (mpc), edema do pericárdio (ep) e do saco vitelino (esv).

Na TABELA 3 são apresentadas algumas das metodologias utilizadas em diferentes estudos para a avaliação de malformações e parâmetros específicos em peixe-zebra durante diferentes fases do desenvolvimento embrionário/larval.

TABELA 3. Comparação entre as características do peixe-zebra e roedores.

| Artigo                                 | Idade           | Malformações/ parâmetros avaliados  |
|--|-----------------|---|
| Weigt et al. (2011)                    | 24, 48 e 72 hpf | Malformações da cabeça, dos olhos, dos otólitos, na notocorda, na cauda, e na ponta da cauda, escoliose, deformações no saco vitelino e atraso no crescimento |
| Van den Bulck et al. (2011)            | 96 hpf          | Medição do corpo e de todos os órgãos, formato, posição e aparência dos tecidos   |
| Panzica-Kelly et al. (2010)            | 120 hpf         | Formato do corpo, somitos, notocorda, cauda, barbatanas, coração, cabeça, cérebro e mandíbula   |
| Padilla et al. (2011) e Padilla et al. | 144 hpf         | Barbatanas, coração/tórax, cabeça, olhos, órgãos, cauda/espinha e posição na coluna de água   |

### Classificação da teratogênese dos compostos.

Além da inexistência de padronização do sistema de avaliação dos parâmetros de teratogênese, muitos estudos não consideram a severidade dos efeitos avaliados. De forma a ultrapassar este problema, foi proposto um método quantitativo por Brannen *et al.* (2010)<sup>12</sup>, com a atribuição de uma pontuação de severidade aos diversos parâmetros de peixe-zebra. No entanto, este método foi considerado relativamente trabalhoso e moroso.

Panzica-Kelly *et al.* (2010)<sup>50</sup> categorizaram cada parâmetro avaliado entre 5 e 0,5 (diminuição do valor com o aumento da severidade da malformação), à exceção do formato do corpo que foi classificado como normal ou anormal. Contudo, esta gradação foi considerada inadequada para a análise das malformações nas fases iniciais do desenvolvimento de peixe-zebra, uma vez que no início do ensaio o córion dos embriões foi removido. Teixidó *et al.* (2013)<sup>63</sup> classificaram as características morfológicas entre 1 e 4. O valor de 4 foi atribuído a características desenvolvidas como no período de eclosão, o valor de 3 às características que atingiram o estágio de desenvolvimento do período faríngeo e o valor de 2 para as características que mostram um estágio de desenvolvimento como no período de segmentação. Já o valor de 1 foi atribuído quando as características mostraram uma malformação.

Na gradação utilizada por Padilla *et al.* (2011)<sup>49</sup> e Padilla *et al.* (2012)<sup>48</sup> algumas malformações foram classificadas como presentes ou não (sistema binário) enquanto que outras foram pontuadas de acordo com a sua severidade de 0 a 4.

Após a atribuição das pontuações aos diferentes parâmetros, estes valores são utilizados para definir se o composto testado é considerado teratogénico ou não, através de um índice de teratogênese.

De uma forma mais simplista, Padilla *et al.* (2011)<sup>49</sup> e Padilla *et al.* (2012)<sup>48</sup> fizeram apenas a soma dos valores de forma a obter um índice de malformações, sem qualquer definição de outros resultados. Quanto maior o valor do índice (máximo de 34) maior a capacidade de o composto induzir malformações.

Ainda assim, os valores de severidade dos diferentes parâmetros foram utilizados de forma a obter o CL<sub>50</sub> (concentração calculada do composto resultando em 50% de letalidade/mortalidade) e o CE<sub>50</sub> (concentração do composto que induz metade do efeito máximo) para posterior definição do potencial teratogénico de um composto através do índice de teratogênese. Este

índice é obtido através do quociente entre  $CL_{50}/CE_{50}$ . Um composto com um índice superior a 1 é considerado teratogénico, enquanto que índices inferiores a 1 definem o composto como não teratogénico induzindo maioritariamente efeitos embrioletais/embriotóxicos<sup>59,63,68</sup>.

A proporção  $CL_{50}/CE_{50}$  é considerada pouco apropriada, uma vez que mesmo que os efeitos sejam observados em pontos de tempo anteriores, se o  $CL_{50}$  e/ou  $CE_{50}$  não forem atingidos no período de exposição, os compostos são automaticamente classificados como não teratogénicos. Desta forma, os estudos de Panzica-Kelly et al. (2010)<sup>59</sup>, Hermesen et al. (2011)<sup>31</sup> e Beekhuizen et al. (2015)<sup>10</sup> definem o  $CL_{25}$  (concentração calculada do composto resultando em 25% de letalidade/mortalidade) e o nível sem efeitos adversos observáveis (NSEAO – do inglês *no-observed effect level* (NOEL), e obtém o índice de teratogénese através do quociente entre  $CL_{25}/NSEAO$ . Compostos com índice superior a 10 são classificados como teratogénicos enquanto que compostos com índices inferiores a 10 são classificados como não teratogénicos.

### Considerações finais.

O peixe-zebra é um modelo animal alternativo e complementar para a substituição do uso de roedores e outros modelos vertebrados, nomeadamente para o estudo de desenvolvimento embrionário. O embrião (semitransparente) é considerado um bom modelo para a avaliação dos potenciais efeitos tóxicos de substâncias teratogénicas, embora apresente diferenças e limitações em relação ao desenvolvimento embrionário dos roedores. Apesar do aumento considerável da sua utilização na investigação do desenvolvimento embrionário, verificou-se uma elevada variação entre os parâmetros avaliados nos diferentes estudos, bem como nomenclaturas diferentes para malformações semelhantes. No entanto, o estudo de embriões de *D. rerio* é importante cumprindo com o princípio Redução/Substituição (é também uma alternativa aos testes agudos realizados com juvenis e adultos), com a legislação em vigor (DL: 113/2013) e a preocupação da comunidade em geral, dos organismos e entidades oficiais que regulam e estudam este tema.

### Agradecimentos.

Este trabalho é apoiado por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito do projeto UIDB/04033/2020 (CITAB/INOV4AGRO) e PTDC/CTA-AMB/6686/2020 (ENANTIOTOX).

Ondina Ribeiro agradece à FCT pelo financiamento através da bolsa de doutoramento (Ph.D. 2022.12242.BD).

### REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> ABREU, M. S. et al., *Zebrafish as a model of neurodevelopmental disorders*, *Neuroscience*, 445: 3-11. 2020.
- <sup>2</sup> ADHISH, M. & MANJUBALA, I., *Effectiveness of zebrafish models in understanding human diseases—A review of models*, *Heliyon*, 9(3): e14557. 2023.
- <sup>3</sup> AHARON, D. & MARLOW, F. L., *Sexual determination in zebrafish*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79: 1-19. 2022.
- <sup>4</sup> AUGUSTINE-RAUCH, K. et al., *In vitro developmental toxicology assays: A review of the state of the science of rodent and zebrafish whole embryo culture and embryonic stem cell assays*, *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 90(2): 87-98. 2010.
- <sup>5</sup> BAILEY, J., OLIVERI, A. & LEVIN, E. D., *Zebrafish model systems for developmental neurobehavioral toxicology*, *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 99(1): 14-23. 2013.
- <sup>6</sup> BAILONE, R. L. et al., *Zebrafish as an alternative animal model in human and animal vaccination research*, *Laboratory animal research*, 36: 1-10. 2020.
- <sup>7</sup> BANDMANN, O. & BURTON, E. A., *Genetic zebrafish models of neurodegenerative diseases*, *Neurobiology of disease*, 40(1): 58-65. 2010.
- <sup>8</sup> BAUER, B., MALLY, A. & LIEDTKE, D., *Zebrafish embryos and larvae as alternative animal models for toxicity testing*, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24): 13417. 2021.

- <sup>9</sup> BAUMANS, V., [The aspects of the use of rodents in experimental research](#). In *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research*, 7-12: Springer. 2016.
- <sup>10</sup> BEEKHUIJZEN, M. et al., [From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test \(ZET\) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system](#). *Reproductive Toxicology*, 56: 64-76. 2015.
- <sup>11</sup> BIGLOU, S. G. et al., [An overview of the insulin signaling pathway in model organisms \*Drosophila melanogaster\* and \*Caenorhabditis elegans\*](#). *Peptides*, 145: 170640. 2021.
- <sup>12</sup> BRANNEN, K. C. et al., [Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model](#). *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 89(1): 66-77. 2010.
- <sup>13</sup> BRAUNBECK, T. et al., [Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species-an update](#). *ALTEX-Alternatives to animal experimentation* 22(2): 87-102. 2005.
- <sup>14</sup> BRIGGS, J. P., [The zebrafish: a new model organism for integrative physiology](#). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282(1): R3-R9. 2002.
- <sup>15</sup> BRITO, R. S. et al., [Transgenic zebrafish \(\*Danio rerio\*\) as an emerging model system in ecotoxicology and toxicology: Historical review, recent advances, and trends](#). *Science of The Total Environment*, 848: 157665. 2022.
- <sup>16</sup> BRYDA, E. C., [The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research](#). *Missouri medicine*, 110(3): 207. 2013.
- <sup>17</sup> CHOE, S.-K. & KIM, C.-H., [Zebrafish: A Powerful Model for Genetics and Genomics](#). Vol. 24, 8169- MDPI. 2023.
- <sup>18</sup> CHOI, T.-Y. et al., [Zebrafish as an animal model for biomedical research](#). *Experimental & Molecular Medicine*, 53(3): 310-317. 2021.
- <sup>19</sup> COMMISSION, E., [Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes](#). *Official Journal of the European Union*, 358: 1-28. 1986.
- <sup>20</sup> CONLEY, J. M. & RICHARDS, S. M., [Teratogenesis](#). In *Encyclopedia of Ecology*, 3528-3536. 2008.
- <sup>21</sup> CROUZIER, L. et al., [Use of zebrafish models to boost research in rare genetic diseases](#). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24): 13356. 2021.
- <sup>22</sup> CSENKI, Z. et al., [Microinjection based zebrafish embryo test for the detection of estrogenic substances in slurry based irrigation water and its combined application with yeast estrogen screen](#). *Agricultural Water Management*, 272: 107830. 2022.
- <sup>23</sup> D'AMORA, M. & GIORDANI, S., [The utility of zebrafish as a model for screening developmental neurotoxicity](#). *Frontiers in neuroscience*, 12: 976. 2018.
- <sup>24</sup> DAI, Y. J. et al., [Zebrafish as a model system to study toxicology](#). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(1): 11-17. 2014.
- <sup>25</sup> DUBEY, A. et al., [Zebrafish as An Emerging Model: An Important Testing Platform for Biomedical Science](#). *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, Volume 13(3): 2. 2022.
- <sup>26</sup> ERICSSON, A. C. et al., [A brief history of animal modeling](#). *Missouri medicine*, 110(3): 201. 2013.
- <sup>27</sup> FRANCO, N. H., [Animal experiments in biomedical research: a historical perspective](#). *Animals*, 3(1): 238-273. 2013.
- <sup>28</sup> GAMBLE, J. T. et al., [The zebrafish xenograft models for investigating cancer and cancer therapeutics](#). *Biology*, 10(4): 252. 2021.
- <sup>29</sup> GERLAI, R., [Zebrafish \(\*Danio rerio\*\): A Newcomer With Great Promise in Behavioral Neuroscience](#). *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*: 104978. 2022.
- <sup>30</sup> HAMM, J. T. et al., [Characterizing sources of variability in zebrafish embryo screening protocols](#). *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 36(1): 103-120. 2019.
- <sup>31</sup> HERMSEN, S. A. et al., [Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies](#). *Toxicology in Vitro*, 25(3): 745-753. 2011.
- <sup>32</sup> HOLBECH, H. et al., [Detection of endocrine disruptors: evaluation of a Fish Sexual Development Test \(FSDT\)](#). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 144(1): 57-66. 2006.
- <sup>33</sup> HOWE, K. et al., [The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome](#). *Nature*, 496(7446): 498-503. 2013.
- <sup>34</sup> JARQUE, S. et al., [Morphometric analysis of developing zebrafish embryos allows predicting teratogenicity modes of action in higher vertebrates](#). *Reproductive Toxicology*, 96: 337-348. 2020.
- <sup>35</sup> JENNINGS, B. H., [Drosophila – a versatile model in biology & medicine](#). *Materials Today*, 14(5): 190-195. 2011.
- <sup>36</sup> KALUEFF, A. V. et al., [Gaining translational momentum: more zebrafish models for neuroscience research](#). Vol. 55, 1-6: Elsevier. 2014.
- <sup>37</sup> KENT, M. L. et al., [Toxicity of chlorine to zebrafish embryos](#). *Diseases of Aquatic Organisms*, 107(3): 235-240. 2014.
- <sup>38</sup> KIMMEL, C. B. et al., [Stages of embryonic development of the zebrafish](#). *Developmental dynamics*, 203(3): 253-310. 1995.
- <sup>39</sup> KNIGHT, A., [Scientific and educational animal use](#). In *Routledge Handbook of Animal Welfare*, 161-175: Routledge. 2022.
- <sup>40</sup> LARDELLI, M., [Using zebrafish in human disease research: some advantages, disadvantages and ethical considerations](#). In *Proceedings of 2008 ANZCCART Conference*, Auckland, New Zealand, 23-28. 2008.
- <sup>41</sup> LEE-ESTEVEZ, M. et al., [Zebrafish as a useful model for immunological research with potential applications in aquaculture](#). *Reviews in Aquaculture*, 10(1): 213-223. 2018.
- <sup>42</sup> LEE, S. H. et al., [Teratogenic Potential of Antiepileptic Drugs in the Zebrafish Model](#). *BioMed Research International*, 2013: 726478. 2013.
- <sup>43</sup> LIESCHKE, G. J. & CURRIE, P. D., [Animal models of human disease: zebrafish swim into view](#). *Nature Reviews Genetics*, 8(5): 353-367. 2007.
- <sup>44</sup> MEEKER, N. D. & TREDE, N. S., [Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease](#). *Developmental & Comparative Immunology*, 32(7): 745-757. 2008.
- <sup>45</sup> NAGEL, R., [DarT: The embryo test with the Zebrafish \*Danio rerio\*—a general model in ecotoxicology and toxicology](#). *Altex*, 19: 38-48. 2002.
- <sup>46</sup> OECD, [Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity \(FET\) Test](#). *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*, OECD Publishing, Paris. 2013.
- <sup>47</sup> OLSSON, I. A. S. et al., [Protecting animals and enabling research in the European Union: An overview of development and implementation of directive 2010/63/EU](#). *ILAR journal*, 57(3): 347-357. 2017.
- <sup>48</sup> PADILLA, S. et al., [Zebrafish developmental screening of the ToxCast™ Phase I chemical library](#). *Reproductive Toxicology*, 33(2): 174-187. 2012.

- <sup>49</sup> PADILLA, S. et al., [Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables](#). *Neurotoxicology and Teratology*, 33(6): 624-630. 2011.
- <sup>50</sup> PANZICA-KELLY, J. M. et al., [Morphological score assignment guidelines for the dechorionated zebrafish teratogenicity assay](#). *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 89(5): 382-395. 2010.
- <sup>51</sup> RAGHUNATH, A. & PERUMAL, E., [Analysis of lethality and malformations during zebrafish \(\*Danio rerio\*\) development](#). *Teratogenicity testing: methods and protocols*, 337-363. 2018.
- <sup>52</sup> REHBERGER, K. et al., [In vitro or not in vitro: a short journey through a long history](#). *Environmental Sciences Europe*, 30(1): 1-12. 2018.
- <sup>53</sup> RIBEIRO, O. et al., [Effects of acute metaphedrone exposure on the development, behaviour and DNA integrity of zebrafish \(\*Danio rerio\*\)](#). *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10. 2023.
- <sup>54</sup> RIBEIRO, O. M. et al., [O peixe-zebra \(\*Danio rerio\*\) como modelo emergente na ecotoxicologia](#). *Revista de Ciência Elementar*, 10(2). 2022.
- <sup>55</sup> RUSSELL, W. M. S. & BURCH, R. L., [The principles of humane experimental technique](#). Methuen. 1959.
- <sup>56</sup> SÁNCHEZ-OLIVARES, M. A. et al., [Toxicity and teratogenicity in zebrafish \*Danio rerio\* embryos exposed to chromium](#). *Latin american journal of aquatic research*, 49(2): 289-298. 2021.
- <sup>57</sup> SCHAUPP, C. M. et al., [Comparison of in silico, in vitro, and in vivo toxicity benchmarks suggests a role for ToxCast data in ecological hazard assessment](#). *Toxicological Sciences*, 195(2): 145-154. 2023.
- <sup>58</sup> SCHUBERT, S. et al., [Microinjection into zebrafish embryos \(\*Danio rerio\*\)—a useful tool in aquatic toxicity testing?](#). *Environmental Sciences Europe*, 26(1): 1-8. 2014.
- <sup>59</sup> SELDESLAGHS, I. W. et al., [Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds](#). *Reproductive Toxicology*, 33(2): 142-154. 2012.
- <sup>60</sup> STOLETOV, K. & KLEMKE, R., [Catch of the day: zebrafish as a human cancer model](#). *Oncogene*, 27(33): 4509-4520. 2008.
- <sup>61</sup> STREISINGER, G. et al., [Production of clones of homozygous diploid zebra fish \(\*Brachydanio rerio\*\)](#). *Nature*, 291(5813): 293-296. 1981.
- <sup>62</sup> TANGUAY, R. L., [The rise of zebrafish as a model for toxicology](#). *Toxicological Sciences*, 163(1): 3-4. 2018.
- <sup>63</sup> TEIXIDÓ, E. et al., [Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay](#). *Toxicology in Vitro*, 27(1): 469-478. 2013.
- <sup>64</sup> VALLE, S. et al., [Exploiting oxidative phosphorylation to promote the stem and immunoevasive properties of pancreatic cancer stem cells](#). *Nature Communications*, 11(1): 5265. 2020.
- <sup>65</sup> VAN DEN BULCK, K. et al., [Zebrafish developmental toxicity assay: A fishy solution to reproductive toxicity screening, or just a red herring?](#). *Reproductive Toxicology*, 32(2): 213-219. 2011.
- <sup>66</sup> VON HELLFELD, R. et al., [Adverse effects in the fish embryo acute toxicity \(FET\) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish \(\*Danio rerio\*\) embryos](#). *Environmental Sciences Europe*, 32: 1-18. 2020.
- <sup>67</sup> WAGNER, M. et al., [Endocrine disruption and in vitro ecotoxicology: Recent advances and approaches](#). *In vitro Environmental Toxicology—Concepts, Application and Assessment*, 1-58. 2017.
- <sup>68</sup> WEIGT, S. et al., [Zebrafish \(\*Danio rerio\*\) embryos as a model for testing proteratogens](#). *Toxicology*, 281(1): 25-36. 2011.
- <sup>69</sup> WHITE, R. M. et al., [Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis](#). *Cell stem cell*, 2(2): 183-189. 2008.
- <sup>70</sup> WINN, A. A. et al., [Testing alternative surface disinfection agents for zebrafish \(\*Danio rerio\*\) embryos](#). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 60(5): 510-518. 2021.
- <sup>71</sup> ZHAO, Y. et al., [A review of automated microinjection of zebrafish embryos](#). *Micromachines*, 10(1): 7. 2018.
- <sup>72</sup> ZON, L. I. & PETERSON, R. T., [In vivo drug discovery in the zebrafish](#). *Nature reviews Drug discovery*, 4(1): 35-44. 2005.