

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**O uso de *Zebrafish* (*Danio rerio*) como modelo na área da Farmacologia:
panorama atual e perspectivas**

Marcelli Terumi Miyagi

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientador:

Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

São Paulo

2019

Agradecimentos

Dedico este trabalho e agradeço à minha família, minha mãe Teresa e pai Nobumasa, que sempre me incentivaram e se sacrificaram para que eu pudesse me aplicar ao máximo aos estudos. Também agradeço ao meu irmão Marcelo e aos meus padrinhos Midori e Sakae por todo o incentivo e confiança.

A todos do Laboratório de Imunobiologia de Transplantes, principalmente ao Professor Niels e Angela pelo apoio e confiança e, é claro, à Marcela, Fernanda e Mari pela camaradagem, ajudas com os milhões de PCR e as milhões de caixas do biotério.

Agradeço à minha família de intercâmbio Thaís, Vitor, Matheus, Ana Helena e Sérgio pelos ótimos momentos divididos na Irlanda.

Obrigada a todos da equipe de Controle de Qualidade da Boehringer Ingelheim com quem trabalhei, em especial ao André, Agnes, Luciano e Biazinha, por serem os melhores companheiros que eu poderia ter. E também a Mayara, Renata, Karen, Camila, Ricardo, Taís, Thaís, Bárbara, Marina e Tálisson por serem os melhores mentores que eu poderia pedir.

Agradeço também aos meus velhos amigos da época do Técnico, Amanda, Bruno, Natália e Zé por toda a companhia durante todos esses anos. Muito obrigada também para as meninas do Universitário Mayara, Laís e Marcela. Obrigada pelas horas de estudos na salinha do plantão e principalmente pelas risadas e amizade que só teve a crescer com o tempo.

Agradeço também à Fernanda, a Nalda, por tantos anos de amizade e papos-cabeça.

E aos meus amigos queridos do 012N, aos tagarelas Diane, Ju, Gutí, Kaori e Mayara que estiveram comigo desde o primeiro semestre de faculdade. Ao Tarik pela companhia nos estudos e caronas e à Déborah, Nati, Maju, Carolzinha e Zuzu pela força durante esses anos todos.

Agradeço a todos, sem a companhia de vocês nada seria possível.

SUMÁRIO

	Pág.
Agradecimentos	1
Lista de Abreviaturas	3
RESUMO	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	15
3. MÉTODOS	15
4. REVISÃO DE LITERATURA	16
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO	37
7. BIBLIOGRAFIA	37
8. ANEXOS	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FDA	Do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
3R	Redução, Refinamento e Substituição
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
Cas-9	<i>CRISPR-associated protein - 9</i>
PD	Do inglês, <i>Pharmacodynamics</i> (Farmacodinâmica)
PK	Do inglês, <i>Pharmacokinetics</i> (Farmacocinética)
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
TUNEL	Do inglês, <i>Terminal deoxynucleodityl transferase dUTP nick end labeling</i>
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio]
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

RESUMO

MIYAGI, MT. **O uso de *Zebrafish* (*Danio rerio*) como modelo farmacológico: panorama atual e perspectivas.** 2019. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Palavras-chave: *Zebrafish*, farmacologia, modelo

INTRODUÇÃO: O uso de *Zebrafish* como modelo para estudos de desenvolvimento de novos fármacos, ensaios farmacológicos e toxicológicos está se tornando popular por sua manutenção simples e de baixo custo, facilidade de manipulação genética, facilidade na administração de fármacos, pela alta taxa de fecundidade e curto ciclo reprodutivo quando comparado a modelos vertebrados mais tradicionais. Além disso, o peixe possui características anatomorfofisiológicas que se tornam ferramentas interessantes para o pesquisador: a transparência e o desenvolvimento extra-uterino, que possibilitam a visualização *in vivo* de marcações celulares e proteicas. A seguinte revisão visa explorar o cenário atual do modelo expondo suas vantagens e sua relevância em estudos farmacológicos, toxicológicos e de desenvolvimento de novos fármacos, assim como projetar suas futuras aplicações. **OBJETIVO:** Explorar o cenário atual do uso de *zebrafish* como modelo, analisar a relevância e as limitações deste modelo aplicado a estudos em farmacologia e toxicologia e discutir suas aplicações futuras. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Revisão da literatura do período de 2008 a 2018, através da consulta ao banco de dados ZFIN e a periódicos e revistas científicas. Os artigos foram selecionados através da busca em bancos de dados como Medline/PubMed, SciELO. **RESULTADOS:** O *zebrafish* como modelo animal na grande área da farmacologia está em ascensão acompanhado do desenvolvimento da biologia molecular. As características do embrião e da larva como a transparência e o tamanho reduzido se mostraram um grande atrativo para os pesquisadores. Os diversos modelos, agora possíveis pela engenharia genética, podem fazer uma ponte entre os modelos mais simples como os invertebrados e culturas celulares e os modelos mais complexos como roedores **CONCLUSÃO:** O *zebrafish* possui um grande território em que pode atuar e pode ajudar a otimizar a seleção de novos fármacos e assim reduzindo tempo e custo na pesquisa. No entanto ainda há a necessidade de maiores estudos e validações de métodos, por se tratar de um animal de outra classe taxonômica, podendo apresentar diferenças fisiológicas, anatômicas, metabólicas e mecânicas em relação aos humanos.

1. INTRODUÇÃO

O uso de animais em estudos experimentais para modelar doenças humanas se baseia no entendimento de que alguns processos biológicos são suficientemente conservados a ponto de permitir a extrapolação para humanos. Neste contexto, o uso de roedores tem sido prolífico desde o começo do século XX, com o desenvolvimento da primeira linhagem padrão de ratos (*Rattus norvegicus*), o *Wistar* (FRANCO, 2013). O sequenciamento do genoma completo do camundongo (*Mus musculus*) impulsionou ainda mais o seu uso, chegando a totalizar cerca de 80% dos animais de laboratório utilizados em pesquisas científicas na Europa em 2011, seguidos dos animais de sangue frio que representaram apenas 12,4% (COMISSÃO EUROPEIA, 2013).

A grande área da Farmacologia e o desenvolvimento de fármacos ainda são extremamente dependentes do uso de modelos animais, em maior parte dos roedores, para os estágios de triagem de compostos e estudos pré-clínicos. No entanto, o uso de *zebrafish* (*Dario rerio*) como modelo para estudos de desenvolvimento de novos fármacos, ensaios farmacológicos e toxicológicos está se tornando popular por sua manutenção simples de baixo custo quando comparado a modelos vertebrados mais tradicionais. Além disso, o peixe possui características anatomorfofisiológicas que se tornam ferramentas interessantes para o pesquisador. Analisando também pelo ponto de vista dos “3R” em pesquisa (redução, refinamento e substituição), o seu uso é bastante positivo visto que possui um menor grau de senescência, comparado com os roedores, e ainda assim apresenta alto grau de homologia com o genoma humano (HOWE, 2013).

A racionalização dos estudos em farmacologia e toxicologia, então, começa a fomentar a procura de novos modelos animais e a seguinte revisão visa explorar o cenário atual do uso do *zebrafish* para fins científicos, com foco em doenças crônicas não transmissíveis, expondo suas vantagens e limitações e sua relevância na grande área da Farmacologia, assim como analisar as perspectivas e projetar suas futuras aplicações.

1.1. O Zebrafish (*Danio rerio*)

O zebrafish (Figura 1), conhecido comumente como “paulistinha” no Brasil, é um peixe teleósteo da ordem dos Cypriniformes, natural do Sul da Ásia (podendo ser encontrado na Índia, Paquistão, Bangladesh e Nepal) e descrito pela primeira vez por Francis Buchanan-Hamilton em 1822 (PARICHY, 2015).

É um peixe de águas rasas e calmas (ARUNACHALAM et al, 2013), podendo viver em riachos e lagoas, além de já terem sido observados em poças artificiais como arrozais ou esgotos (ARUNACHALAM et al, 2013; PARICHY, 2015).

Possui pequenas dimensões, medindo de 4 a 5 centímetros na sua vida adulta, quando desenvolve pigmentação em um padrão de listras horizontais, alternantes claras e escuras, padrão este que lembra as listras de uma zebra, característica da qual rendeu o nome popular de zebrafish ao peixe (Figura 1) (SIMONETTI et al, 2015).

Sua dieta é onívora e compreende desde detritos, areia e fitoplanctons a insetos e aracnídeos (WATSS et al, 2012). No entanto, no ambiente científico de cativeiro há uma grande preocupação sobre a padronização da dieta destes animais já que foi demonstrado que uma variação de níveis de ácidos graxos insaturados na dieta pode afetar a taxa de crescimento e fertilização dos peixes (SICCARDI III et al, 2009), alertando para a possível modulação de outros processos fisiológicos pela dieta.



Figura 1: Zebrafish (*Danio rerio*) adulto. Adaptado de (QUIGLEY, 2004).

Comparado com os modelos murinos, ele apresenta grande volume e rapidez de reprodução. Uma fêmea pode desovar cerca de 200 ovos a cada 2 ou 3 dias (SIMONETTI et al, 2015), o que se torna uma característica muito atrativas para os pesquisadores, possibilitando a realização de experimentos que demandem grandes

quantidades de indivíduos. Além disso, o desenvolvimento do embrião ocorre fora o corpo da fêmea, tornando conveniente o uso deste modelo no campo da Biologia do Desenvolvimento.

O embrião do *zebrafish* possui a particularidade de ser transparente e seu padrão de pigmentação adulta começa a surgir em apenas cerca de duas semanas pós-fertilização (QUIGLEY, 2004). A transparência do embrião e da larva, associada a técnicas de biologia molecular, abre portas para uma série de protocolos experimentais *in vivo* não-invasivas de marcações celulares e proteicas que não seriam possíveis em camundongos e outros modelos experimentais. A visualização *in vivo* de células com marcação fluorescente (Figura 2) ou alterações de morfologia intestinal são exemplos que demonstram as diversas possibilidades de aproveitamento desta característica.

Outra vantagem sobre os roedores é a sua facilidade de manutenção e diminuição do tamanho do viveiro, se traduzindo em uma grande relevância econômica. Na Universidade de Boston, por exemplo, o custo diário de manutenção de um camundongo (*Mus musculus*) custa ao laboratório cerca US\$1,08 contra US\$0,25 para a manutenção de um aquário de *zebrafish* (BOSTON UNIVERSITY, <<https://www.bu.edu/researchsupport/compliance/animal-care/housing/per-diem-housing-rates/>>, acesso em 2018).

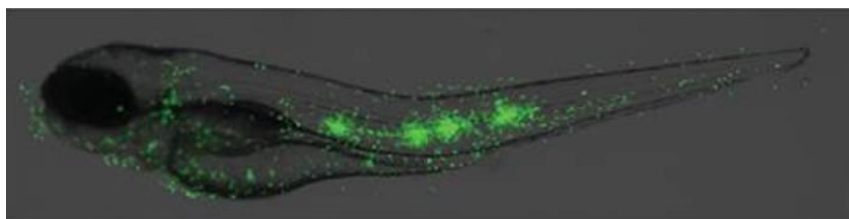


Figura 2: *Zebrafish* GFP transgênico com inflamação na notocorda após injeção com LPS. As células verdes são neutrófilos. Adaptado de (NGUYEN-CHI et al, 2014).

Em 2013, o genoma do *Danio rerio* (linhagem Tübingen como referência) foi sequenciado por Howe, revelando uma homologia de aproximadamente 70% com o genoma humano. Além disso, Howe e colaboradores também levantaram que 82% dos genes humanos relacionados a doenças listados na base de dados *Online Mendelian*

Inheritance in Man (OMIM), podem ser relacionados a pelo menos um gene ortólogo no *zebrafish* (HOWE et al, 2013).

O *zebrafish* possui um sistema imune inato que já se mostra ativo no primeiro dia de embriogênese (HERBOMEL; THISSE, THISSE, 2001), no entanto, o desenvolvimento do sistema imune adaptativo só se completa após 4-6 semanas pós-fertilização, com a maturação dos linfócitos T e B. (TREDE et al)

Muitas das células do sistema imune celular presentes nos mamíferos possuem células correspondentes no *zebrafish*, incluindo macrófagos e neutrófilos com mobilidade, capacidade fagocítica e capacidade de ativação de células B/T. O sistema complemento é bem desenvolvido e as proteínas inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-8 e NF- κ B são bem conservadas entre humanos e o *zebrafish* (MEEKER & TREDE, 2008).

Por haver um espaçamento temporal entre o desenvolvimento das respostas inatas e adaptativas e a vantagem da transparência do embrião e seu desenvolvimento externo neste intervalo de tempo, o uso do *zebrafish* para estudos *in vivo* tem sido bastante crescente no estudo do campo da imunologia celular (NOVOA; FIGUERAS, 2011).

No entanto, os linfócitos B apresentam certa disparidade e apenas as classes de IgD e IgM são compartilhadas com os humanos (MEEKER & TREDE, 2008).

O *zebrafish* possui anatomia renal semelhante aos humanos, com presença de néfrons com glomérulos, túbulos proximais e distais e ductos coletores. Há a presença de células hematopoiéticas nos interstícios e de células cromafins e interrenais (correspondendo à medula e córtex adrenal humano) nos grandes vasos renais, com a produção de corticosteroides e catecolaminas (MENKE et al, 2011). No entanto, por se tratar de um animal aquático, ressalta-se a falta da alça de Henle, estrutura responsável pela concentração da urina em vertebrados terrestres (JERMAN & SUN, 2017).

O trato intestinal consiste em um longo tubo sem distinção anatômica de estômago, intestino delgado e grosso, porém com diferenças na composição celular e morfologia da mucosa. Possui células calciformes e enterócitos, porém não há presença de glândulas gástricas e conseqüentemente sua porção intestinal anterior não possui pH ácido. A porção luminal anterior é a mais larga, se estreitando no sentido rostral-caudal e seu epitélio não apresenta criptas, porém apresenta vilosidades que também diminuem em tamanho neste sentido (MENKE et al, 2011; BRUGMAN, 2016).

O fígado no *zebrafish* possui três lóbulos contíguos e é localizado adjacente ao trato gastrointestinal. Diferente dos humanos, não possui a tríade portal aparente e os hepatócitos possui um arranjo em túbulos. Apesar de não ter sido identificada uma célula correspondente às células de Kupffer, todas as outras células hepáticas presentes em mamíferos foram descritas no peixe. Compartilha de várias das atividades hepáticas dos mamíferos como a homeostase metabólica, secreção de bile e detoxificação e secreção de proteínas como proteínas do complemento, de fase aguda e fatores de coagulação (MENKE et al, 2011; GOESSLING & SADLER, 2015).

Por se tratar de um modelo que está se tornando popular na área de toxicologia, é importante ressaltar a importância do conhecimento sobre as enzimas metabólicas e seus correspondentes humanos. Dentre as enzimas do citocromo P450, as subfamílias mais importantes para a metabolização de xenobióticos são as CYP 1, 2, 3 e 4, sendo as CYP3A as mais importantes isoformas no metabolismo de fármacos em humanos (SAAD et al, 2016; RUBINSTEIN, 2006). No *zebrafish* em fase larval foi descrita uma única isoforma da subfamília CYP3A, a CYP3A65, que pode ser induzido por rifampicina e dexametasona (TSENG et al, 2005). No total, 51 enzimas dentre as 86 identificadas se enquadram nas subfamílias CYP 1, 2 e 3 (SAAD et al, 2016).

A aliança da alta homologia com o genoma humano com a completa integração dos sistemas no peixe (que garante um grande leque de fenótipos que podem ser observados como dor, motilidade intestinal e tônus vascular, por exemplo) permitiu também a introdução do *zebrafish* como um modelo de doenças humanas (MACRAE, 2015).

1.2. Modelos de doenças humanas

Modelo animal pode ser definido como um organismo não-humano capaz de descrever um fenômeno biológico em comum com o organismo alvo (HAU, 2008). Neste contexto, um modelo animal de doenças humanas envolve um organismo capaz de portar patologias, naturais ou induzidas artificialmente, que possuem fenótipos em comum e mecanismos de doença permissíveis de extrapolação para as doenças humanas (RAND, 2008). Dentre as espécies não-humanas mais utilizadas destacam-se os camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus*), vertebrados mamíferos,

que possuem relativa facilidade de manuseio e custos razoáveis de manutenção. Nos últimos 50 anos foi visualizado um aumento pronunciado no uso de camundongos em detrimento ao uso de ratos, além de um crescimento importante do uso de *zebrafish* em publicações indexadas no PubMed até o presente momento (Figura 4).

Hau classifica os modelos em Modelos Induzidos (Experimentais), espontâneos, Geneticamente Modificados, Negativos e Órfãos (HAU, 2008).

Os modelos induzidos, também chamados de modelos experimentais, se utilizam de animais sadios e sem modificações genéticas para a indução experimental de alguma condição de doença por intervenções de resultado já conhecido, como por exemplo a indução de *diabetes mellitus* por infecção com o vírus da encefalomiocardite. (HAU, 2008)

Modelos espontâneos são animais de linhagens de ocorrência natural que desenvolvem algum fenótipo de doença sem a necessidade de indução. Uma das linhagens mais tradicionais é o camundongo *nude*, que possui uma mutação espontânea ($Foxn1^{nu}$) que causa o crescimento anormal de pelos e um desenvolvimento defeituoso (ou ausente) do epitélio tímico. Os camundongos *nude* pelo defeito na maturação de células T possuem uma resposta imune celular deficiente, o que os tornam suscetíveis a infecções, porém receptíveis a transplantes xenogênicos por serem incapazes de montar uma resposta de rejeição ao enxerto (SANTOS, 2002).

Modelos negativos são animais que não desenvolvem a doença estudada e, portanto, são comumente utilizados para o estudo dos mecanismos de resistência (RAND, 2008).

Já os modelos órfãos são os animais que desenvolvem uma doença que não possui correspondência com doenças humanas. Caso descritas posteriormente em humanos, o modelo anteriormente órfão pode se tornar um modelo induzido de doença (RAND, 2008; HAU, 2008).

Como já mencionado anteriormente, uso de modelos animais na pesquisa científica moderna aumentou significativamente desde o final do século XX com os avanços da engenharia genética e biologia molecular. A possibilidade da utilização de animais transgênicos com a inserção ou deleção de genes de interesse faz dos modelos geneticamente modificados o tipo de maior número em utilização (HAU, 2008).

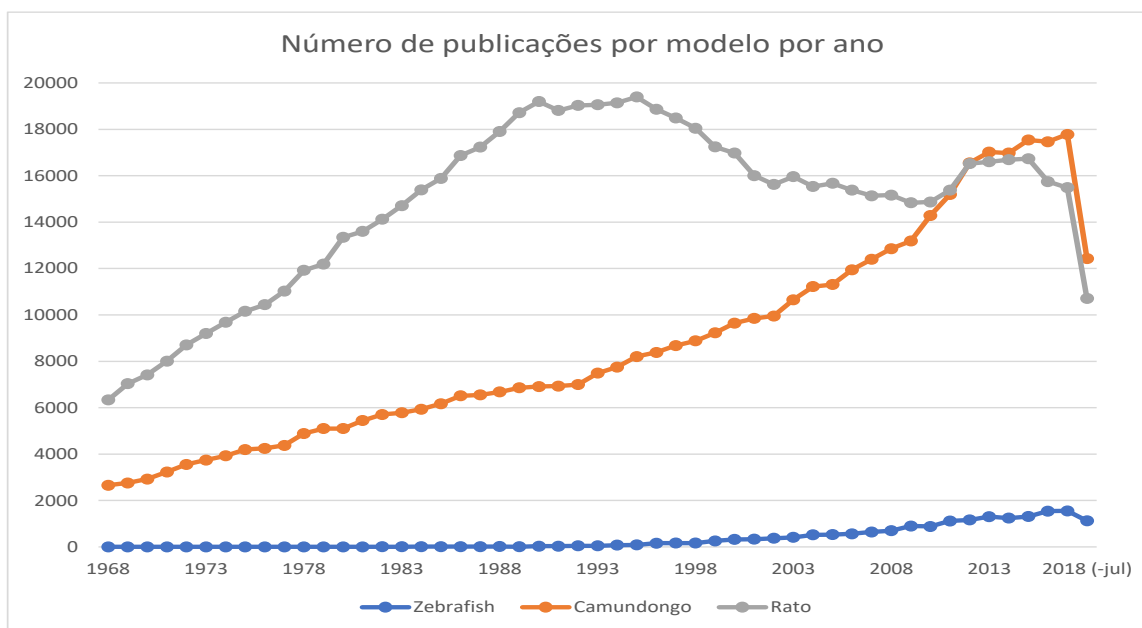


Figura 4: Número de publicações indexadas no PubMed por modelo por ano. O levantamento foi realizado pela procura de seus nomes comuns ou científicos no título do artigo, publicados desde 1968. (Pubmed, acesso em 18 de julho de 2018. Palavras-chave e filtro de procura: ((X OR *ratus norvegicus*[Title]) AND ("1968/01/01"[Date - Publication] : "3000"[Date - Publication]); X sendo substituído por: *zebrafish*[Title] OR *danio rerio*[Title]; *mouse*[Title] OR *mice*[Title] OR *mus musculus*[Title] e *rat*[Title] OR *rats*[Title] OR *ratus norvegicus*[Title]).

Ao longo das últimas décadas pesquisadores desenvolveram técnicas para a edição genética de modelos animais como transferência gênica, recombinação homóloga ou mutagênese química. Essas técnicas permitem a criação de animais com *knockin* e *knockout* (ablação) de genes. Destaca-se também a possibilidade de criação de *knockout* condicionais pelo sistema Cre-Lox, atrativo devido às possíveis consequências pleiotrópicas do *knockout* total de um gene. Este tipo de modelo possibilita observar a influência de um gene em uma célula específica, por exemplo, ou fazer a ablação do gene quando exposto a uma molécula exógena (CHAIBLE et al, 2017).

Atualmente há a crescente utilização da nova técnica de edição genômica CRISPR acoplado ao sistema Cas9. A técnica permite a excisão de um segmento de DNA por

uma nuclease sítio-específica guiada por RNA (Cas-9) e a ativação de mecanismos de reparo resultando na perda de atividade do gene ou inserção de sequências de DNA por recombinação homóloga. A técnica pode ser utilizada em embriões e pode ter diversos alvos em um mesmo organismo, podendo ser utilizada para o estudo de doenças complexas (ALBADRI et al, 2017).

Apesar de grande parte dos modelos atualmente dependerem de modelos transgênicos e mutantes, ainda se faz uso de modelos por indução química ou por exposição do peixe a condições causativas (Quadro 3).

1.3. O descobrimento e desenvolvimento de fármacos

O desenvolvimento de um novo fármaco envolve muitas etapas de pesquisa até o seu lançamento como princípio ativo. Para o desenvolvimento de um composto líder, diversas técnicas são utilizadas para o descobrimento e desenvolvimento de uma molécula de interesse farmacológico. Além das descobertas ao acaso, testes de *screening* baseados em alvo e de *screening* por ensaios fenotípicos são utilizados para a seleção de moléculas que possam ter atividades farmacológicas.

O *screening* por ensaios fenotípicos foi a base da descoberta de novos fármacos por muito tempo e consiste no *screening* de compostos em modelos celular ou animal de doenças para identificar compostos que provoquem mudanças desejáveis no fenótipo da doença. Após a observação da melhora do fenótipo, prossegue-se para a identificação dos alvos moleculares do composto (CROSTON, 2017).

Para o *screening in vivo*, comumente se utiliza de modelos murinos, porém atualmente há a tendência de aumentar a utilização de outros modelos de doença para o *screening* fenotípico, como por exemplo o *zebrafish*.

Após os avanços da biologia molecular e a grande evolução da genética e genômica e, por fim, a possibilidade de sequenciamento do genoma humano e de outras espécies, o panorama do descobrimento de fármacos desviou do tradicional *screening* fenotípico para o *screening* baseado em alvos nas décadas de 80 e 90 (CROSTON, 2017).

O *screening* baseado em alvos consiste em ensaios com compostos, em geral pequenas moléculas sintéticas ou não, com alvos moleculares biológicos conhecidos,

podendo ser genéticos ou mecanísticos. Os resultados identificam quais compostos interagem com o alvo e provocam algum efeito bioquímico desejado (AL-ALI, 2016; CROSTON, 2017).

Estudos fundamentados no *screening* baseado em alvos, no entanto, andam enfrentando grande dificuldade na validação e confirmação do alvo em questão, já que esta abordagem não leva em consideração a complexidade de células e sistemas. Muitos candidatos a fármacos não prosseguem para os estudos clínicos ou falham nesta etapa pela validação incorreta do alvo (VASAIKAR et al, 2016; ZHENG et al, 2013).

A coincidência da queda no registro de novos compostos e a introdução do *screening* baseado em alvo em laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento põe em perspectiva as limitações desta abordagem e, neste contexto, muitos pesquisadores estão voltando à abordagem de *screening* por ensaio fenotípico, também conhecido como *screening* baseado em sistemas (AL-ALI, 2016; SWINNEY & ANTHONY, 2011).

O *screening* por ensaio fenotípico se baseia em testes com compostos em um sistema biológico, podendo ser células ou modelos animais, para identificar a habilidade da substância de modular um fenótipo que seja relevante à doença estudada, sem a necessidade de se conhecer o mecanismo de ação e os alvos do composto. (AL-ALI, 2016).

1.4. Estudos farmacológicos e toxicológicos

A grande área da farmacologia envolve desde o desenvolvimento de novos fármacos bem como os estudos de elucidação dos mecanismos de interação dos fármacos com o corpo (e a conseqüente produção de efeitos terapêuticos), além dos processos sofridos pelo fármaco no corpo (estudos de farmacodinâmica e farmacocinética, respectivamente). (MEYER & SVENDSEN, 2003).

Parte dos estudos em farmacologia podem ser realizados em células, porém as interações farmacológicas são complexas demais e necessitam de um organismo completo para a observação total dos resultados.

Os candidatos a fármacos, para avançarem para a etapa clínica, devem ser aprovados quanto a sua segurança e eficácia em modelos animais e, portanto, passam

por estudos de caracterização farmacodinâmica (PD) e farmacocinética (PK) bem como de toxicidade (LIMA & REZA, 2003).

Os parâmetros PK ajudam a caracterizar as dosagens e sua frequência em função da absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME), que influenciam na concentração plasmática do fármaco. Já os parâmetros PD ajudam a entender a relação entre afinidade pelo alvo molecular, sua concentração no sítio de ação com a atividade farmacológica. Espera-se que durante esta etapa pré-clínica obtenha-se informações para a definição de uma janela terapêutica para o composto estudado (AMORE et al, 2010).

Os estudos de farmacodinâmica podem ser divididos entre estudos de efeitos primários e efeitos secundários (inclui-se farmacologia de segurança) (MEYER & SVENDSEN, 2003). Os estudos de efeitos primários são modelos que demonstram os efeitos/mecanismo de ação e sua relação com o alvo terapêutico (ICH, 2000), fazendo uso de modelos de doenças para a avaliação farmacodinâmica (MEYER & SVENDSEN, 2003). Já os estudos de efeitos secundários são estudos que se utilizam de animais/células saudáveis tratados com o fármaco em questão para a avaliação de efeitos/mecanismo de ação não relacionados com o alvo terapêutico desejado (ICH, 2000). Na farmacologia de segurança se estuda a ação e a capacidade do composto estudado em alterar atividades e características fisiológicas críticas, como função cardíaca e respiratória, por exemplo, e interações farmacológicas, analisando, portanto, os possíveis efeitos adversos associados ao composto (ICH, 2000; MEYER & SVENDSEN, 2003).

Os estudos de farmacocinética atualmente fazem uso de modelos *in vitro* associados à utilização de animais sadios para a caracterização do perfil ADME.

Os modelos *in vitro* podem incluir a caracterização físico-química (solubilidade, lipofilicidade), estudos de permeabilidade/absorção intestinal (como ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela, ensaios de permeabilidade em monocamada de células Caco-2) e metabolização hepática (por exemplo ensaios enzimáticos CYP-dependentes) (ARMSTRONG et al, 2007; WAN, 2013).

Em toxicologia também se utiliza de uma associação entre os métodos *in-vitro* e *in vivo*. Os testes necessários para a avaliação de segurança de compostos, segundo a

ANVISA, são: Estudos de toxicidade de dose única (aguda), de toxicidade de doses repetidas, de toxicidade reprodutiva, de genotoxicidade, de tolerância local, de carcinogenicidade e toxicinética (ANVISA, 2013).

Até o momento, poucos modelos utilizando o *zebrafish* foram desenvolvidos para o estudo da farmacocinética de candidatos a fármacos. O pouco desenvolvimento nesta área se dá pela dificuldade da quantificação de compostos e seus metabólitos em organismos tão pequenos.

Em 2016, Kantae e colegas desenvolveram um método de avaliação farmacocinética da absorção e *clearance* em embriões de *zebrafish*, utilizando o paracetamol e seus metabólitos como os exemplos na validação. O método consistiu na exposição de embriões com 3 dias pós-fertilização a uma concentração de paracetamol no meio e a quantificação do ativo em diversos tempos de exposição através da análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. O mesmo foi realizado com os embriões expostos ao paracetamol por 1 hora e transferidos a meios livres do fármaco. Neste caso, foi analisada a concentração dos metabólitos em diferentes tempos de incubação.

Em outro estudo em 2017, Kulkarni e colaboradores estudaram a farmacocinética e a penetração de dois fármacos, irinotecano e lorcaserina, no cérebro de *zebrafish* adultos. Os compostos foram injetados por via oral ou intraperitoneal e coletas de sangue e cérebro foram realizadas em diversos tempos após injeção.

Os autores obtiveram resultados que correlacionaram os dados de farmacocinética em *zebrafish* com mamíferos superiores, inclusive com humanos, sugerindo uma possível utilização deste animal como modelo de avaliação de farmacocinética.

2. OBJETIVOS

Esta revisão tem como objetivo explorar o cenário atual do uso do *zebrafish* (*Danio rerio*) na grande área da Farmacologia, analisar a relevância e as limitações destes modelos e discutir suas aplicações futuras.

3. MÉTODOS

3.1. Critérios para seleção de artigos

3.1.1. Bases de dados

As buscas foram realizadas em quatro bases de dados bibliográficas: PubMed (NCBI), SciELO, LILACS e ZFIN.

3.1.2. Limite de tempo

Foram selecionados artigos publicados dentro do período de 2008 a 2018.

3.1.3. Idiomas

Foram selecionados artigos em português, inglês e espanhol.

3.1.4. Termos livres

Para a pesquisa nas bases de dados os termos *Zebrafish* ou *Danio rerio* foram combinados com as áreas de utilização do modelo em questão, como explicitado no quadro 2.

Quadro 1: Assuntos pesquisados nos bancos de dados nacionais e internacionais através da combinação de termos das duas colunas

<i>Zebrafish</i> OR <i>Danio rerio</i>	pharmacology; toxicology; drug discovery; drug development; screening; model
---	--

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. *Zebrafish* como modelo de doença em avaliação farmacológica e toxicológica.

Assim como a utilização do *Zebrafish* para *screening* de novos compostos é um fenômeno atual, o uso do peixe como modelo animal em pesquisa também teve um crescimento acelerado na última década (Quadro 2). Grande parte das publicações são

relacionadas ao desenvolvimento do *zebrafish* como um modelo confiável para a experimentação em diversas áreas.

Quadro 2: Número de publicações indexadas na base de dados PubMed referentes ao *zebrafish* como modelo de doença e modelo animal em estudos relacionados à farmacologia.

Algoritmo de pesquisa	Total de artigos indexados	Número de artigos publicados a partir de 2008	Número de artigos de revisão
((<i>zebrafish</i> [Title]) OR danio rerio[Title]) AND model[Title]	1200	1044	243
((<i>zebrafish</i> [Title]) OR danio rerio[Title]) AND disease model[Title]	3	3	0
((<i>zebrafish</i> [Title]) OR danio rerio[Title]) AND pharmacology[Title]	7	6	2
((<i>zebrafish</i> [Title]) OR danio rerio[Title]) AND pharmacological[Title]	55	49	6

O *D. rerio* começou a ser utilizado como um modelo animal para o estudo da biologia do desenvolvimento pela necessidade de um modelo de maior similaridade com os humanos, já que por muito tempo os modelos mais populares nesta área foram invertebrados, como o nemátodo *C. elegans* e o artrópode *D. melanogaster* (ZHANG, 2003). A transparência e o desenvolvimento externo do embrião e da larva de *zebrafish* possibilitou o estudo *in vivo* do desenvolvimento de órgãos e tecidos, e em diferentes estágios, a um nível mais fino que os modelos invertebrados, com menor taxa de conservação de sequências genéticas, podem oferecer (DODD, 2000).

Após o sequenciamento do genoma do *D. rerio* e os avanços na área de biologia molecular, o peixe vem sendo bastante utilizado para o desenvolvimento de modelos de doenças de diversas etiologias. A seguir no quadro 3 são alguns exemplos de modelos

de doenças já publicados pela comunidade científica, com foco principal em algumas doenças crônicas não-transmissíveis.

Quadro 3: Exemplos de modelos de doenças em *zebrafish* publicados.

Câncer		
Tipo	Gene/Modelo	Referência
Leucemia Linfoblástica Aguda de célula T	<i>rag2:MYC-ER</i>	LANGENAU et al, 2003
	<i>rag2-loxP-dsRED2-loxP-EGFP- mMyc</i>	LANGENAU et al, 2005
	<i>rag2:MYC-ER;mitfa</i> - Regulado por Tamoxifeno	GUTIERREZ et al, 2011
Leucemia Linfoblástica Aguda de célula B	<i>EGFP-TEL-AML1</i>	SABAAY et al, 2006
	<i>zRAG2-EGFP-TEL-AML1</i>	
Leucemia Mielóide Aguda	<i>zspi1-MYST3/NCOA2-EGFP</i>	ZHURAVLEVA et al, 2008
Cancer Hepático/ Hepatite Esteatosa e Cirrose	<i>fabp10:loxP-mCherry-loxP- EGFP- krasV12 + Mifepristona</i>	NGUYEN et al, 2016
	<i>Tg(crybb1:mCherry,LEXOP:EG FP-kras_G12V)</i>	ZHENG et al, 2014
	<i>fabp10a:pt-β-cat</i>	EVASON et al, 2015

Quadro 3: Exemplos de modelos de doenças em *zebrafish* publicados. (Continuação)

	<i>Tg(fabp10:TA; TRE:xmrk; krt4:GFP) + Doxíciclina</i>	Li et al, 2015
	<i>Tg(fabp10:TA; TRE:Myc; krt4:GFP) + Doxíciclina</i>	
	Induzido por Tioacetamida	RHEKA et al, 2008
Doenças Metabólicas		
Tipo	Gene/Modelo	Referência
Diabetes Tipo 1	Induzido por Aloxana	KO et al, 2018; CASTAÑEDA et al, 2017; NAM et al, 2017; SEO et al, 2015; NAM et al, 2015
	Induzido por Estreptozocina	KWON et al, 2017; SARRAS et al, 2013; OLSEN et al, 2012; OLSEN et al, 2010
	<i>cftrpd1049/pd1049</i>	DELASPRES et al, 2015;
	<i>Tg(ins:NTR-mCherry) + Metronidazol</i>	CARVALHO et al, 2017
	<i>Tg(-4.0ins:GFP) + Aloxana</i>	NAM et al, 2015
Diabetes Tipo 2	Induzido por dieta	ZANG et al, 2017; MENG et al, 2017
	<i>lepr^{sa1508/sa1508}</i>	MICHEL et al, 2016

Quadro 3: Exemplos de modelos de doenças em *zebrafish* publicados. (continuação)

	<i>pdx1</i> ^{sa280/sa280}	KIMMEL et al, 2015
	<i>tcf7l2</i> ^{zf55/zf55}	FACCHINELLO et al, 2017
	s843Tg + D-glicose	CARNOVALI et al, 2016
Obesidade	Induzida por dieta	TINGAUD- SEQUEIRA et al, 2011; ZANG et al, 2017; LANDGRAF et al, 2017; SEEBACHER et al, 2017; MONTALBANO et al, 2016
	<i>mc4r</i> ^{-/-}	FEI et al, 2017
	<i>lepr</i> ^{-/-}	
	<i>cyp2r1</i> ^{-/-}	PENG et al, 2017
	<i>mitfa</i> ^{b692/b692} ; <i>ednrba</i> ^{b140/b140}	NISHIMURA, 2015
Doenças Neurológicas		
Tipo	Gene/Modelo	Referência
Doença de Alzheimer	Tratamento com injeção de polipeptídeo amiloide-β42	BHATTARAI et al, 2017; 2016; COSACAK et al, 2017
	Indução com ácido ocadáico	KOEHLER et al, 2015; NADA et al, 2016
Doença de Parkinson	Indução com 6-hidroxidopamina	CRONIN et al, 2017
	Indução com MPTP	HU et al, 2017
	<i>Pink</i> ^{-/-}	FLINN et al, 2013

No entanto, poucas publicações referentes ao uso do peixe na farmacologia retornaram com esses critérios de busca. Poucos são os estudos que se utilizam deste modelo para a avaliação farmacodinâmica e farmacocinéticas de compostos ativos.

De mesmo modo, o levantamento sobre a utilização do peixe como modelo para a avaliação da toxicidade de compostos também resultou com grande parte das publicações sendo um fenômeno que vem crescendo desde a década passada (Quadro 4).

Quadro 4: Número de publicações indexadas na base de dados PubMed referentes ao *zebrafish* como modelo de doença e modelo animal em estudos relacionados à toxicologia.

Algoritmo de pesquisa	Total de artigos indexados	Número de artigos publicados a partir de 2008	Número de artigos de revisão
((<i>zebrafish</i> [Title]) OR danio rerio[Title]) AND toxicology[Title]	36	29	16
((<i>zebrafish</i> [Title]) OR danio rerio[Title]) AND toxicological[Title]	43	40	6

Boa parte dos estudos realizados neste âmbito são de publicações com maior ênfase na toxicologia ambiental. Alguns exemplos de moléculas ativas e compostos utilizados como excipientes ou veículos que foram empregados para a avaliação de toxicidade podem ser vistos no quadro 5 a seguir.

Quadro 5 Exemplos de substâncias já empregadas para avaliação de toxicidade.

TOXICOLOGIA AMBIENTAL		
Substância	Classe Terapêutica/Química	Referência
Triclosan	Bacteriostático - Fenoxifenol policlorado	LIU et al, 2003
Selenometionina	l- α -aminoácido essencial	PETTEM et al, 2005
Glifosato	Herbicida organofosforado	DE BRITO RODRIGUES et al, 2016
Imidacloprid	Inseticida neonicotinoide	SHUCKLA et al, 2017
Dichlorvus	Pesticida organofosforado	
Atrazina	Herbicida s-triazina	
MOLÉCULAS ATIVAS E EXCIPIENTES		
Substância	Classe Terapêutica/Química	Referência
Butilparabeno	Conservante parabeno	BROWN et al, 2018
Ciproconazol	Fungicida triazólico	STAAL et al, 2018
Flusilazol	Fungicida triazólico	
Hexaconazol	Fungicida triazólico	
Pirimetanil	Fungicida anilino pirimidínico	
Thiram	Fungicida ditiocarbamato	
Fluazinam	Fungicida piridinamínico	WANG et al, 2018
Nanopartículas de Quitosana	Polissacarídeo catiônico	WANG et al, 2016

Quadro 5 Exemplos de substâncias já empregadas para avaliação de toxicidade.

Paracetamol	Analgésico derivado da anilina	ALI et al, 2012
Isoniazida	Tuberculostático derivado do ácido isonicotínico	
Amitriptilina sódica	Antidepressivo tricíclico	
Cloridrato de Verapamil	Bloqueador de canal de cálcio fenilalquilamínico	
Dicloridrato de Etambutol	Tuberculostático etilenodiamínico	
Cloridrato de Clorpromazina	Antipsicótico fenotiazínico	
Cloranfenicol	Antibiótico nitrobenzínico	

4.2. A utilização do *Zebrafish* no descobrimento e desenvolvimento de fármacos

Os estudos com *zebrafish* no âmbito de descobrimento e desenvolvimento de fármacos é um fenômeno atual, evidenciado pela baixa taxa de publicação de artigos indexados ao PubMed ao longo dos anos e o crescimento do interesse por parte dos pesquisadores a partir de 2008 (Quadro 6).

Quadro 6: Número de publicações indexadas na base de dados PubMed

Algoritmo de pesquisa	Total de artigos indexados	Número de artigos publicados a partir de 2008	Número de artigos de revisão
((zebrafish[Title]) OR danio rerio[Title]) AND drug discovery[Title]	40	35	21
((zebrafish[Title]) OR danio rerio[Title]) AND drug development[Title]	3	3	0

Dentre os artigos de revisão foi observada uma maior quantidade de revisões focando na utilização do *zebrafish* como um modelo para screening genético e de fármacos no geral, sem focar em sistemas específicos. (Figura 5).

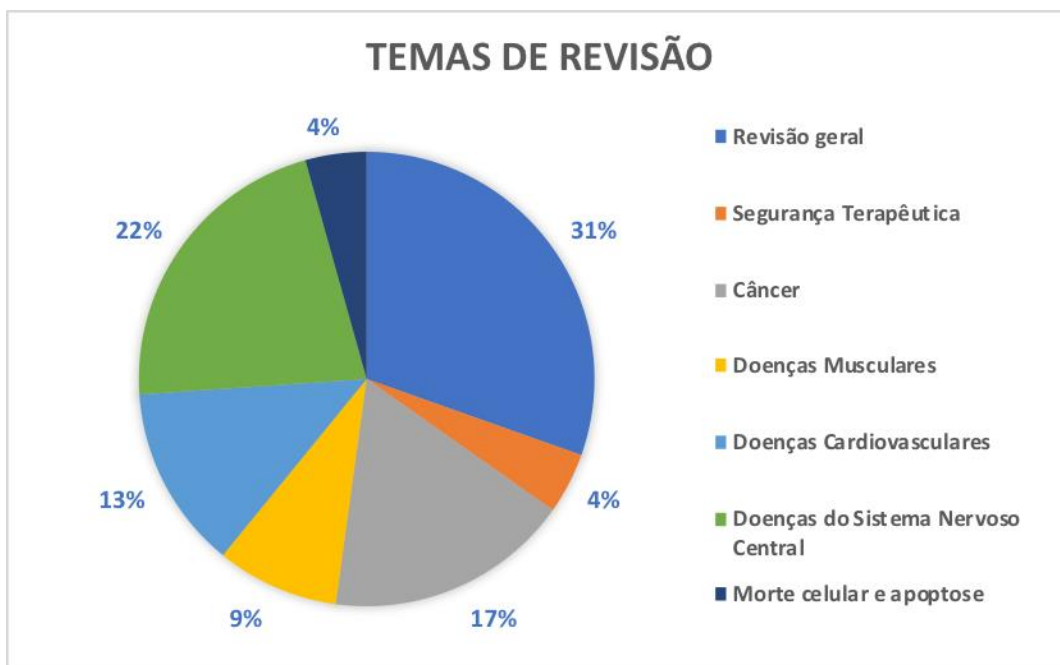


Figura 5: Distribuição de temas dos artigos de revisão. Revisão geral: Bowman et al (2010), Chakraborty et al (2009), Cornet et al (2018), Das et al (2013), Del Vecchio et al (2011), MacRae et al (2010, 2015), Wheeler et al (2009). Segurança Terapêutica: Barros et al (2008). Câncer: Brown et al (2017), Gao et al (2014), Huiting et al (2015) e Tat et al (2013). Doenças Musculares: Hirata et al (2009), Maves et al (2014). Doenças cardiovasculares: Keßler et al (2015), Rocke et al (2009). Doenças do Sistema Nervoso Central: Khan et al (2017), Kokel et al (2008), Nguyen et al (2013), Stewart et al (2015) e Vaz et al (2018). Morte celular e apoptose: McGrath; Seng (2013).

Dentre os temas abordados nas revisões generalistas, o foco principal é na atratividade do peixe como modelo. Os autores citam a aplicação do *zebrafish* para o *screening* de moléculas possivelmente ativas como um método que ofereça resultados mais robustos do que os oferecidos pelos ensaios *in vitro* ou com modelos de invertebrados: um composto pode possuir uma boa atividade *in vivo* que não acompanhe resultados satisfatórios em ensaios bioquímicos e vice-versa.

A introdução de um *screening* nesse nível de pesquisa poderia facilitar o descobrimento de novos alvos terapêuticos e suas validações (BOWMAN, 2010;

CHAKRABORTY, 2009; CORNET, 2018; DAS, 2013; DEL VECCHIO, 2011; MACRAE, 2010 e 2015).

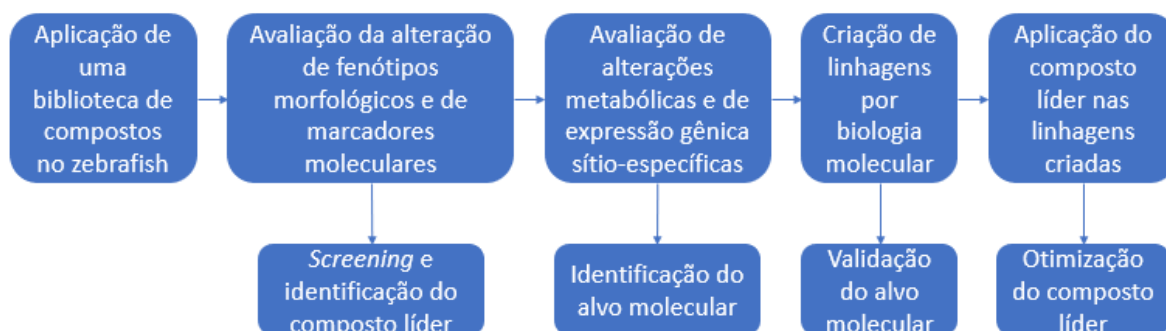


Figura 6: Processo de desenvolvimento de fármacos por *screening in vivo* em *zebrafish*. Adaptado de (CHAKRABORTY, 2009).

A boa tratabilidade dos animais, baixo custo de manutenção e a transparência de seus embriões e larvas são características que os pesquisadores julgam bastante interessantes e facilitadoras. Por suas pequenas dimensões e pelo seu habitat aquático, é possível realizar o *screening* em vários indivíduos e com pouca quantidade do composto, que pode ser administrado aos peixes diretamente na água do tanque, sendo capaz de absorver pequenas moléculas pela pele e pela alimentação (BOWMAN, 2010; CHAKRABORTY, 2009; CORNET, 2018; DAS, 2013; DEL VECCHIO, 2011; MACRAE, 2010 e 2015; WHEELER, 2009)

Baseando-se nessas características atrativas e a necessidade de desenvolvimento de métodos mais rápidos e menos laboriosos que permitam uma avaliação *in vivo* em etapas iniciais do desenvolvimento de um fármaco, houve uma onda de avaliação de resposta do *zebrafish* como modelo de *screening* de compostos a partir da divulgação do sequenciamento do seu genoma, evidenciando a necessidade de métodos validados e o entendimento profundo do modelo animal e de seus processos para que correlações possam ser feitas. Para tanto, grande parte da publicação científica com relação ao *screening* de compostos em *zebrafish* é referente ao desenvolvimento e adequação de métodos experimentais já existentes para outros modelos animais. (Quadro 7 e 8).

Quadro 7: Número de publicações indexadas na base de dados PubMed referentes a *screening*.

Algoritmo de pesquisa	Total de artigos indexados	Número de artigos publicados a partir de 2008	Número de artigos de revisão
((<i>zebrafish</i> [Title]) OR danio rerio[Title]) AND Screening[Title]	228	201	36

Quadro 8: Número de publicações indexadas na base de dados PubMed após categorização.

	Descobrimto de Alvos/Compostos ativos		
	Artigos de revisão	Desenvolvimento e Validação de Métodos	Screening de Novos alvos e compostos
Número de publicações	24	65	20

No campo da biologia celular, McGrath e Seng em 2013 ressaltam a vantagem do uso de *zebrafish* para estudo de morte celular e apoptose sobre modelos *in vitro* e invertebrados, como por exemplo em *C. elegans*. Apesar das vias de sinalização da apoptose serem bastante conservadas durante a evolução, a utilização de um modelo vertebrado oferece maior complexidade (múltiplas vias e moléculas de sinalização) (MCGRATH; SENG, 2013). Foi demonstrado que o *zebrafish* possui genes correspondentes às caspases 2, 3, 6, 7, 8 e 9. Aproveitando-se das características dos embriões, principalmente de sua transparência, a análise visual de marcadores de morte celular é bastante interessante para o *screening* de compostos capazes de regular as vias de morte celular programada. McGrath e Seng citam a possibilidade de uso do peixe para a identificação de compostos radioprotetores: ensaios de marcação

TUNEL utilizando radiação ionizante e compostos de ação já conhecida e bem estabelecida obtiveram resultados esperados (Quadro 9).

O *zebrafish* surgiu como um modelo promissor para o descobrimento de fármacos com ação antitumoral pela semelhança molecular e histológica com os tumores humanos e pela possibilidade de criação de animais modificados geneticamente para a superexpressão de oncogenes ou inativação de genes supressores. Além disso pode-se induzir tumores através do tratamento com compostos carcinogênicos diretamente na água. Nguyen e colaboradores, em 2012, apresentaram um modelo de tumorigênese hepática em *zebrafish* transgênico para a superexpressão do oncogene *kras^{v12}* por indução com mifepristona, um método inteligente que previne a mortalidade precoce e permite o controle da indução do desenvolvimento do tumor na fase de vida desejada. Aproveitando-se da transparência do embrião, o autor fundiu a sequência para expressão da proteína fluorescente eGFP com a do oncogene *kras^{v12}*, permitindo a visualização da progressão ou regressão tumoral por microscopia. Nguyen e colaboradores destacam que esse método pode ser interessante para a análise visual dos efeitos de compostos supressores da hiperplasia tumoral em um potencial *screening* de alta capacidade.

Outro modelo desenvolvido para o *screening* de compostos anticâncer é o de xenoenxertos tumorais, avaliando-se a angiogênese e metástase tumoral. Jung em 2012 validou o método de xenoenxertos de diversas linhagens de células tumorais de carcinoma em *zebrafish* através de uma triagem com diversos compostos anticâncer de ação já conhecida, obtendo resultados que se correlacionam com os resultados esperados. No mesmo artigo o autor demonstrou a utilidade do método para a triagem de novas moléculas, obtendo boa resposta com dois novos candidatos anticâncer. Jo e sua equipe, em 2013, de mesmo modo, demonstraram que o *zebrafish* pode ser utilizado no *screening* de novos compostos com ação anti-retinoblastoma ortotópico através da validação do método com carboplatina e melfalana. Zhang e colaboradores, em 2014, também validaram um método de xenoenxerto de células K562 ALDH⁺, de propriedades de células tronco leucêmicas. Imatinibe, dasatinibe, partenolida, TDZD-8, trióxido de arsênico, niclosamida, salinomicina e tiorizadina foram capazes de diminuir o

tamanho dos enxertos e metástase, sendo que seis destes compostos inibiram seletivamente a proliferação celular ALDH+.

Lee e colaboradores, em 2016 desenvolveram um modelo de schwannoma vestibular em embriões de *zebrafish* através do xenoenxerto de células SC4 que expressam mCherry, uma proteína vermelho-fluorescente. O modelo foi validado com o uso do everolimo, um inibidor da via de mTOR e um antitumoral bem estabelecido. Os resultados obtidos se correlacionaram com os resultados clínicos conhecidos: redução do número de células cancerígenas, formação tumoral e metástase.

Além disso, o modelo *in vivo* pode ser um bom complemento ao ensaio viabilidade celular de MTT. Li e colaboradores, em 2012, avaliaram a resposta do tratamento de embriões com uma biblioteca de 502 compostos naturais. Para a avaliação de citotoxicidade dos compostos qualquer má-formação dos embriões foi observada, seja neural, cardiovascular, intestinal ou nos órgãos locomotores. Como os mecanismos de embriogênese e carcinogênese são semelhantes, o autor sugere que uma ação citotóxica possa correlacionar com uma boa atividade antitumoral. Para isso, os resultados do *screening* no peixe foram comparados com os dos ensaios MTT em células da linhagem MCF7 de câncer de mama, identificando 21 compostos de ação semelhantes nos dois métodos. O autor aponta também que foi identificado maior número de compostos citotóxicos no ensaio *in vivo*, sugerindo uma maior sensibilidade do ensaio com alguns compostos e que a associação dos dois ensaios pode ser interessante para o *screening* de compostos anticâncer.

Alguns exemplos de substâncias utilizadas para a validação de métodos de modelos animais de doenças crônicas não-transmissíveis para o *screening* de compostos podem ser vistos no Quadro 9 abaixo.

Quadro 9: Exemplos de fármacos utilizados na validação de métodos de screening de compostos em *zebrafish*.

Substância	Classe	Método de Screening Validado	Referência
Inibidores de morte celular			
Amifostina	Radioprotetor	Identificação de Radioprotetores	McGrath; Seng, 2013
Z-VAD-fmk	Inibidor de caspase		
Quimioterápicos			
Paclitaxel	Alcaloide Inibidor de Microtúbulo	Carcinoma Humano	Jung et al, 2012
Vincristina	Alcaloide Inibidor de Microtúbulo		
Geldanamicina	Benzoquinona Inibidora de HSP90		
Carboplatina	Organoplatino Alquilante de DNA	Retinoblastoma	Jo et al, 2013
Melfalana	Mostarda nitrogenada Alquilante de DNA		

Quadro 9: Exemplos de fármacos utilizados na validação de métodos de screening de compostos em *zebrafish*. (Continuação)

Imatinibe	2-fenilaminopirimidina Inibidora de Tirosina Quinase	Leucemia	Zhang et al, 2014
Dasatinibe	Derivado de pirimidina e tiazol Inibidor de Tirosina Quinase		
Partenolida	Lactona Sesquiterpena Inibidor de NFκB		
TDZD-8	Tiadiazolidinona Inibidora de GSK-3β		
Trióxido de Arsênico	Molécula indutora de apoptose e dano à Proteína Receptora da Leucemia Promielocítica α (PML/RARα)		
Niclosamida	Salicilanilida clorada Inibidora de NFκB		
Salinomycin a	Antibiótico Ionóforo Poliéster de ação inibitória da via Wnt/β-catenina		
Tioridazina	Fenotiazina Indutora de Apoptose	Shwannoma Vestibular	Lee et al, 2016
Everolimo	Derivado de Lactona Macrocíclica Inibidor de mTORC1		

Quadro 9: Exemplos de fármacos utilizados na validação de métodos de screening de compostos em *zebrafish*. (Continuação)

Brefeldina A	Lactona Macrocíclica Indutora de Stress de Retículo Endoplasmático	Avaliação de citotoxicidade comparativo a MTT	Li et al, 2012
Bufalina	Bufadienolídeo Indutor de Apoptose		
Camptotecina	Alcaloide indólico monoterpênico Inibidor de topoisomerase		
Capsaicina	Derivado do ácido homovanílico Indutor de apoptose		
α -Chaconina	Glicoalcaloide esteroidal Indutor de Apoptose		
Cinobufagina	Bufadienolídeo Indutor de Apoptose		
Cicloheximida	Piperidinadiona inibidora da Síntese <i>de novo</i> de proteínas		
Equinomicina	Peptídeo benzopirazínico intercalante de DNA		
Gliotoxina	Dicetopiperazina Indutora de Apoptose		
Harmina	Alcaloide β -carbolina indutora de apoptose		
Hipocrelina A	Perilenoquinona indutora de apoptose		

Quadro 9: Exemplos de fármacos utilizados na validação de métodos de screening de compostos em *zebrafish*. (Continuação)

Ivermectina	Macrolídeo Indutor de apoptose	Avaliação de citotoxicidade comparativo a MTT	Li et al, 2012
β -Lapachona	Naftoquinona indutora de síntese de superóxido		
Menadiona	Naftoquinona indutora de apoptose		
Narasina	Antibiótico Ionóforo Poliéster Indutora de Apoptose		
Plumbagina	Naftoquinona indutora de apoptose		
Podofilotoxina	Podofilotoxina de ação antimitótica		
Rotenona	Isoflavonoide indutor de apoptose		
Sanguinarina	Benzofenantridina indutora de apoptose		
Vinpocetina	Alcaloide indutora de apoptose e parada de ciclo celular em G(0)/G(1)		
Antiobesogênico			
Fenilefrina	Alquilarilamina Agonista α -1 adrenérgico	Obesidade	Tingaud-Sequeira et al, 2011
Antidiabéticos			
Metformina	Biguanida que estimula a translocação dos transportadores de glicose	Diabetes Mellitus Tipo II	Zang et al, 2017
Glimepirida	Sulfonilureia estimuladora de secreção de insulina	Diabetes Mellitus Tipo II	Zang et al, 2017

5. DISCUSSÃO

Ao longo dos anos, tradicionalmente os modelos animais mais utilizados e aceitos na comunidade científica são os roedores, como o camundongo (*Mus musculus*) e o rato (*Rattus norvegicus*). Isso se deu por ser um vertebrado de pequeno porte, pela similaridade do genoma, facilidade de manuseio e os vastos recursos de biologia molecular e edição gênica disponível, já que possuem seus genomas inteiramente sequenciados. No entanto, o preço, espaço e o tempo gasto na manutenção de colônias pode ser um impedimento para estudos que necessitem de um número amostral grande. Neste contexto, o *zebrafish* tem se mostrado um bom modelo para se utilizar, visto que é um peixe de pequenas dimensões, de grande rapidez e volume de reprodução. Seus embriões são pequenos o suficiente para que sobrevivam ao período de experimentação em uma placa de *petri* ou até micro-poços (1 embrião pode ser mantido em um volume de até 100 μ L) (ZHANG, 2003), o que torna fácil o tratamento de diversos indivíduos por vez já que dependendo do composto utilizado, os embriões podem absorvê-los diretamente na água de seu meio ambiente.

Apesar de possuir menor porcentagem de homologia do seu genoma com o do ser humano em relação aos roedores, o *zebrafish* possui cerca de 70% de homologia. Além disso, cerca de 80% dos genes relacionados à doenças listados na base de dados *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) possuem um gene ortólogo no *D. rerio*. Adicionalmente, como já mencionado diversas vezes, a transparência do embrião e a capacidade da visualização celular *in vivo* faz do *zebrafish* um modelo muito atrativo.

Com essas vantagens não é difícil explicar o crescimento do número de estudos se utilizando deste modelo.

Durante a última década, nos deparamos com um crescimento explosivo de publicações, ainda que muito aquém das publicações com modelos murinos.

Observamos que a maior taxa de publicação se deu a partir de 2003, quando houve a publicação do sequenciamento completo do genoma de *D. rerio*, o que possibilitou a geração de linhagens para diversas condições gene-específicas.

A escolha de um modelo adequado para o estudo em farmacologia, toxicologia e descobrimento de novos fármacos é de suma importância, visto que a indústria farmacêutica é muito competitiva e a pesquisa por trás do lançamento de um novo

produto é longo e caro. Leva-se em média de 5 a 12 anos da bancada para as prateleiras (VIEIRA; OHAYON, 2006).

A pesquisa básica tem como função o descobrimento de compostos que possuam a atividade desejada e que não ofereçam riscos de toxicidade que se sobreponham às vantagens do uso do medicamento. Muitos compostos candidatos a fármacos são opor apresentarem alta toxicidade para humanos, que muitas vezes não foi identificada nos modelos utilizados.

Um fator que também retarda o desenvolvimento de novos fármacos é o retrabalho. Muitas vezes um composto pode se mostrar promissor em uma cultura celular e não apresentar atividade em um modelo murino.

Neste contexto, o *zebrafish* pode diminuir o tempo gasto nesta etapa de pesquisa básica pois pode servir como uma ponte entre modelos simples (como a cultura celular) e modelos mais complexos como os camundongos, por ser um modelo que pode apresentar resultados rápidos mas que pode apresentar alterações a níveis de tecidos e sistemas. Além disso, o *zebrafish* pode agilizar mais ainda na seleção de candidatos a fármacos pelos *screenings* de compostos.

Apesar de não ser garantido que uma molécula que tenha atividade em *zebrafish* irá apresentar atividade em camundongos e em humanos, o *zebrafish* pode ser um bom modelo para prever resultados e selecionar candidatos promissores para testes mais extensivos.

Com isso, a utilização do *zebrafish* pode agilizar e baratear um estudo, além de racionalizar o uso de vertebrados superiores.

No entanto, a substituição de modelos já estabelecidos só será eficiente e favorável se há uma vantagem ou equivalência de adequação. Por isso, faz-se extremamente necessário que haja uma validação de modelos e métodos e que se constate que os resultados são comparáveis àqueles esperados de humanos.

É necessário, portanto, que peças-chave dos sistemas e processos sejam conservados. Por exemplo, para que seja possível a utilização do *D. rerio* para o estudo de câncer e tumorigênese, o peixe deve possuir alguma semelhança na anatomia e nos processos de angiogênese. E de fato, a anatomia vascular do peixe é bastante conservada e há a ocorrência de vários genes ortólogos do *D. rerio* que são específicos

do sistema vascular, como por exemplo o fator de crescimento vascular endotelial e seu receptor e angiopietinas. (WEINSTEIN, 2002)

Para a avaliação e estudo da obesidade em *zebrafish*, a anatomia do tecido adiposo e os mecanismos de metabolismo de lipídeos também deve ser similar e suficientemente conservado. O *D. rerio* é um ótimo modelo para estudar doenças metabólicas pois possui a anatomia dos adipócitos e metabolismo de lipídeos muito semelhantes às dos mamíferos. Além disso, está presente o circuito do apetite, semelhante ao dos humanos, além do pâncreas e estruturas sensíveis à insulina como o fígado e músculos. No entanto, como o *zebrafish* sofre variações na temperatura corporal de acordo com a temperatura do ambiente, não há estrutura análoga ao tecido adiposo marrom dos mamíferos (que é responsável por dissipar a energia química em calor) (SETH, 2013).

Adicionalmente, pela presença de estruturas sensíveis à insulina e de um pâncreas funcional (que secreta uma insulina semelhante estruturalmente e que é processada de forma similar à dos mamíferos), e a resposta a fármacos anti-diabéticos, o peixe pode ser um modelo interessante para o estudos de diabetes.

O *zebrafish* tem se mostrado um modelo promissor para mimetizar doenças neurodegenerativas. Além de já terem sido identificados no *D. rerio* vários genes relacionados à doenças neurodegenerativas humanas, o peixe e os mamíferos compartilham dos mesmos neurotransmissores (como serotonina, acetilcolina, noradrenalina, GABA, glutamato e dopamina) e a anatomia e a estrutura básica do sistema nervoso central do *D. rerio* possui todos os maiores domínios encontrados nos mamíferos (PANULA, 2010).

Nem sempre uma proximidade evolutiva significa que o modelo seja mais adequado. Para a doença de Parkinson, por exemplo, nenhum modelo murino conseguiu mimetizar mecanisticamente a doença. O modelo murino mais utilizado é o de indução da deficiência de dopamina pela administração de 6-hidroxi-dopamina, o que acaba produzindo efeitos similares à doença mas não resulta na degeneração da substância negra. Um composto capaz de reproduzir esta lesão é o MPTP, porém ratos não são sensíveis à esta substância e a resposta em camundongos depende da linhagem. O

zebrafish é sensível a este composto e exibe não só a diminuição do conteúdo de dopamina como também a diminuição de neurônios no núcleo (PANULA, 2010).

No entanto, o animal oferece algumas desvantagens. Para estudo de farmacocinética por exemplo, é um modelo de difícil utilização pelo tamanho pequeno e há uma dificuldade para a retirada de sangue para a construção da curva de concentração e conseqüentemente para a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos como o volume de distribuição e *clearance*. Além disso, ainda há um entendimento limitado dos processos de absorção e distribuição. Pelo tamanho reduzido, os métodos disponíveis para este modelo requerem técnicas muito sensíveis (como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas) e de custo elevado (KANTAE, 2016).

Apesar disso, o futuro promete grandes avanços para o *D. rerio*, o modelo deve se desenvolver conforme o avanço de novas tecnologias. Por exemplo, com novas técnicas de biologia molecular, como a construção de linhagens repórter, é possível observar populações celulares específicas através da fluorescência, em um intervalo de tempo em um animal vivo, permitindo visualizar interações celulares e a dinâmica de processos celulares (MORO, 2013).

6. CONCLUSÕES

Através dos dados levantados, observa-se que há um grande território em que o *zebrafish* pode atuar. Mais especificamente na área de farmacologia e desenvolvimento de novos fármacos, com a estagnação do lançamento de fármacos inovadores, há uma esperança de que a utilização do peixe impulse e otimize a seleção de novos candidatos a fármacos, diminuindo tempo, custo e reduzindo a quantidade de vertebrados superiores utilizados. No entanto, ainda há a necessidade de maiores estudos e validações de métodos por ser um animal não-mamífero e pode apresentar diferenças fisiológicas, anatômicas, metabólicas e mecánísticas.

7. BIBLIOGRAFIA

[1] HENRIQUE FRANCO, N. Animal experiments in biomedical research: A historical perspective. **Animals**, v. 3, n. 1, p. 238–273, 2013.

[2] COMISSÃO EUROPEIA, **Relatório da Comissão ao Conselho e ao Parlamento Europeu: Sétimo relatório de dados estatísticos sobre o número de animais**

utilizados para fins experimentais e outros fins científicos nos Estados-Membros da União Europeia. Bruxelas, 2013. 14p.

[3] HOWE, K.; CLARK, M.; TORROJA, C.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C.; MUFFATO, M.; COLLINS, J. E.; HUMPHRAY, S.; MCLAREN, K.; MATTHEWS, L.; MCLAREN, S.; SEALY, I.; CACCAMO, M.; CHURCHER, C.; SCOTT, C.; BARRETT, J. C.; KOCH, R.; AL., E. The *zebrafish* reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.

[4] PARICHY, D. M. Advancing biology through a deeper understanding of *zebrafish* ecology and evolution. **eLife**, v. 4, p. 1–11, 2015.

[5] ARUNACHALAM, M.; RAJA, M.; VIJAYAKUMAR, C.; MALAIAMMAL, P.; MAYDEN, R. L. Natural History of *Zebrafish* (*Danio rerio*) in India. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2013.

[6] SIMONETTI, R. B.; MARQUES, L. S.; STREIT JR, D. P.; OBERST, E. R. *ZEBRAFISH* (Danio rerio): THE FUTURE OF ANIMAL MODEL IN BIOMEDICAL RESEARCH. **Journal of FisheriesSciences. com**, v. 9, n. 3, p. 39, 2015.

[7] WATTS, S. a; POWELL, M.; D'ABRAMO, L. R. Fundamental Approaches to the Study of Zebrafish Nutrition. **ILAR Journal**, v. 53, n. 2, p. 144–160, 2012.

[8] SICCARDI III, A. J.; GARRIS, H. W.; JONES, W. T.; MOSELEY, D. B.; D'ABRAMO, L. R.; WATTS, S. A. Growth and Survival of *Zebrafish* (Danio rerio) Fed Different Commercial and Laboratory Diets. **Zebrafish**, v. 6, n. 3, p. 275–280, 2009.

[9] QUIGLEY, I. K. Pigment pattern evolution by differential deployment of neural crest and post-embryonic melanophore lineages in Danio fishes. **Development**, v. 131, n. 24, p. 6053–6069, 2004. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.01526>>.

[10] UNIVERSITY OF BOSTON. Per Diem Housing Rates (animal rates). Disponível em:

<<https://www.bu.edu/researchsupport/compliance/animal-care/housing/per-diem-housing-rates/>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

[11] NGUYEN-CHI, M.; PHAN, Q. T.; GONZALEZ, C.; DUBREMETZ, J.-F.; LEVRAUD, J.-P.; LUTFALLA, G. Transient infection of the zebrafish notochord with E.

coli induces chronic inflammation. **Disease Models & Mechanisms**, v. 7, n. 7, p. 871–882, 2014. Disponível em: <<http://dmm.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dmm.014498>>.

[12] HERBOMEL, P.; THISSE, B.; THISSE, C. Mesenchyme and Developing Brain , Retina , and Epidermis through a M-CSF Receptor-Dependent Invasive Process. **Developmental Biology**, v. 288, n. 1, p. 274–288, 2001.

[13] TREDE, N. S.; LANGENAU, D. M.; TRAVER, D.; LOOK, A. T.; ZON, L. I.; INACTIVATION, G. The Use of Zebrafish to Understand Immunity. **Immunity**, v. 20, p. 367–379, 2004.

[14] MEEKER, N. D.; TREDE, N. S. Immunology and *zebrafish*: Spawning new models of human disease. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 7, p. 745–757, 2008.

[15] NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Zebrafish : Model for the Study of Inflammation and the Innate Immune Response to Infectious Diseases. **Current Topics in Innate Immunity II**, p. 253–275, 2011.

[16] MENKE, A. L.; SPITSBERGEN, J. M.; WOLTERBEEK, A. P. M.; WOUTERSEN, R. A. Normal anatomy and histology of the adult *zebrafish*. **Toxicologic Pathology**, v. 39, n. 5, p. 759–775, 2011.

[17] JERMAN, S.; SUN, Z. Using *Zebrafish* to Study Kidney Development and Disease. . **Current Topics in Developmental Biology**, v 123, p. 41-72, 2017.

[18] BRUGMAN, S. The zebrafish as a model to study intestinal inflammation. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 64, p. 82–92, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.020>>.

[19] GOESSLING, W.; SADLER, K. C. Zebrafish: An Important Tool for Liver Disease Research. **Gastroenterology**, v. 149, n. 6, p. 1361–1377, 2015.

[20] SAAD, M.; CAVANAUGH, K.; VERBUEKEN, E.; PYPE, C.; CASTELEYN, C.; VAN GINNEKEN, C.; VAN CRUCHTEN, S. Xenobiotic metabolism in the zebrafish: a review of the spatiotemporal distribution, modulation and activity of Cytochrome P450 families 1 to 3. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 41, n. 1, p. 1–11, 2016. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/41/1/41_1/_article>.

[21] RUBINSTEIN, A. L. Zebrafish assays for drug toxicity screening. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 2, n. 2, p. 231–240, 2006. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425255.2.2.231>>.

[22] TSENG, H. P.; HSEU, T. H.; BUHLER, D. R.; WANG, W. Der; HU, C. H. Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 205, n. 3, p. 247–258, 2005.

[23] MACRAE, C. A.; PETERSON, R. T. *Zebrafish* as tools for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 10, p. 721–731, 2015.

[24] HAU, J. Animal Models for Human Diseases. **Sourcebook of Models for Biomedical Research**, p. 3–8, 2008.

[25] RAND, M.S. Selection of Biomedical Animal Models. In: CONN, M. **Sourcebook of Models for Biomedical Research**. Elsevier, 2017.cap.27, p.703-726. Nova Jérsei: Humana Press, 2008.cap.2.p.9-15.

[26] SANTOS, B.F. Camundongos mutantes mais utilizados. In: ANDRADE, A.; PINTO, SC.; OLIVEIRA, RS. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002.cap.18, p.139-142.

[27] CHAIBLE, L.M.; KINOSHITA, D.; CORAT, M.A.F.; DAGLI, M.L.Z. Genetically Modified Animal Models. In: CONN, M. **Animal Models for the Study of Human Disease**. Elsevier, 2017.cap.27, p.703-726.

[28] ALBADRI, S.; DEL BENE, F.; REVENU, C. Genome editing using CRISPR/Cas9-based knock-in approaches in zebrafish. **Methods**, v. 121–122, n. March, p. 77–85, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.03.005>>.

[29] CROSTON, G. E. The utility of target-based discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 5, p. 427–429, 2017.

[30] AL-ALI, H. The evolution of drug discovery: From phenotypes to targets, and back. **MedChemComm**, v. 7, n. 5, p. 788–798, 2016.

[31] VASAIKAR, S.; BHATIA, P.; BHATIA, P.; CHU YAIW, K. Complementary Approaches to Existing Target Based Drug Discovery for Identifying Novel Drug Targets. **Biomedicines**, v. 4, n. 4, p. 27, 2016.

[32] ZHENG, W.; THORNE, N.; MCKEW, J. C. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 21–22, p. 1067–1073, 2013.

[33] SWINNEY, D. C.; ANTHONY, J. How were new medicines discovered? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 7, p. 507–519, 2011.

[34] MEYER, O.A.; SVENDSEN, O. Animal Models in Pharmacology and Toxicology. In: HAU, J; SCHAPIRO, S.J; VAN HOOSIER JR, G.L. **Handbook of Laboratory Animal Science.Vol.2. Animal Models**. Flórida: CRC Press, 2003.cap.2, p.11-41.

[35] LIMA, J.; REZA, D. D. La. Pesquisa clínica: fundamentos, aspectos éticos e perspectivas. **Revista da SOCERJ**, v. 16, n. 4, p. 225–233, 2003. Disponível em: <http://sociedades.cardiol.br/socerj/revista/2003_04/a2003_v16_n04_art01.pdf>.

Acesso em 20 jul 2018

[36] AMORE, B. M.; GIBBS, J. P.; EMERY, M. G. Application of in vivo animal models to characterize the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drug candidates in discovery settings. **Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening**, v. 13, n. 2, p. 207–218, 2010. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77949841570&partnerID=40&md5=27b384debb195858da763740e7a4daaa>>.

[37] ICH. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **ICH - S7A Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals**, Genebra, 2000. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7A/Step4/S7A_Guideline.pdf> Acesso em 22 jul 2018

[38] ARMSTRONG, D.; MIGEON, J.; ROLF, M. G.; BOWES, J.; CRAWFORD, M.; VALENTIN, J. P. Secondary Pharmacodynamic Studies and *In Vitro* Pharmacological Profiling. In: GAD, S.C. **Preclinical Development Handbook: Toxicology**. Nova Jérsei: John Wiley & Sons. 2007.cap.17, p.581-609.

[39] WAN, H. What ADME tests should be conducted for preclinical studies? Hit-to-Lead Lead-optimisation Candidate. **ADMET & DMPK** v. 1, p. 19–28, 2013.

[40] ANVISA Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia. **Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica**

Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2492465/Guia+para+a+Condu%C3%A7%C3%A3o+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+de+Toxicologia+e+Seguran%C3%A7a+Farmacol%C3%B3gica+Necess%C3%A1rios+ao+Desenvolvimento+de+Medicamentos+-+Vers%C3%A3o+2/a8cad67c-14c8-4722-bf0f-058a3a284f75>> Acesso em 22 jul 2018.

[41] KANTAE, V.; KREKELS, E. H. J.; ORDAS, A.; GONZÁLEZ, O.; VAN WIJK, R. C.; HARMS, A. C.; RACZ, P. I.; VAN DER GRAAF, P. H.; SPAINK, H. P.; HANKEMEIER, T. Pharmacokinetic Modeling of Paracetamol Uptake and Clearance in Zebrafish Larvae: Expanding the Allometric Scale in Vertebrates with Five Orders of Magnitude. **Zebrafish**, v. 13, n. 6, p. 504–510, 2016. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/zeb.2016.1313>>.

[42] KULKARNI, P.; MEDISHETTI, R.; NUNE, N.; YELLANKI, S.; SRIPURAM, V.; RAO, P.; SRIRAM, D.; SAXENA, U.; ORUGANTI, S.; YOGESHWARI, P. Correlation of pharmacokinetics and brain penetration data of adult zebrafish with higher mammals including humans. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 88, p. 147–152, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2017.09.258>>.

[43] ZHANG, C.; WILLETT, C. Zebrafish: An animal model for Toxicological Studies. **Current Protocols in Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 1-18, 2003.

[44] DODD, A.; CURTIS, P. M.; WILLIAMS, L. C.; LOVE, D. R. Zebrafish : bridging the gap between development and disease. **Human Molecular Genetics** v. 9, n. 16, p. 2443–2450, 2000.

[45] LANGENAU, D. M.; TRAVER, D.; FERRANDO, A. A.; KUTOK, J. L.; ASTER, J. C.; KANKI, J. P.; LIN, S.; PROCHOWNIK, E.; TREDE, N. S.; ZON, L. I.; LOOK, A. T. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. **Science**, v. 299, n. 5608, p. 887–890, 2003.

[46] LANGENAU, D. M.; FENG, H.; BERGHMANS, S.; KANKI, J. P.; KUTOK, J. L.; LOOK, A. T. Cre/lox-regulated transgenic zebrafish model with conditional myc-induced T cell acute lymphoblastic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 17, p. 6068–6073, 2005. Disponível em: < DOI: 10.1126/science.1080280 >.

[47] GUTIERREZ, A.; GREBLIUNAITE, R.; FENG, H.; KOZAKEWICH, E.; ZHU, S.; GUO, F.; PAYNE, E.; MANSOUR, M.; DAHLBERG, S. E.; NEUBERG, D. S.; HERTOOG, J. den; PROCHOWNIK, E. V.; TESTA, J. R.; HARRIS, M.; KANKI, J. P.; LOOK, A. T. Pten mediates Myc oncogene dependence in a conditional zebrafish model of T cell acute lymphoblastic leukemia. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 8, p. 1595–1603, 2011. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20101691>>.

[48] SABAAWY, H. E.; AZUMA, M.; EMBREE, L. J.; TSAI, H.-J.; STAROST, M. F.; HICKSTEIN, D. D. TEL-AML1 transgenic zebrafish model of precursor B cell acute lymphoblastic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 41, p. 15166–71, 2006. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/103/41/15166.short>>.

[49] ZHURAVLEVA, J.; PAGGETTI, J.; MARTIN, L.; HAMMANN, A.; SOLARY, E.; BASTIE, J. N.; DELVA, L. MOZ/TIF2-induced acute myeloid leukaemia in transgenic fish. **British Journal of Haematology**, v. 143, n. 3, p. 378–382, 2008.

[50] NGUYEN, A. T.; KOH, V.; SPITSBERGEN, J. M.; GONG, Z. Development of a conditional liver tumor model by mifepristone-inducible Cre recombination to control oncogenic kras V12 expression in transgenic zebrafish. **Scientific Reports**, v. 6, n. December 2015, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep19559>>.

[51] ZHENG, W.; LI, Z.; NGUYEN, A. T.; LI, C.; EMELYANOV, A.; GONG, Z. Xmrk , Kras and Myc Transgenic Zebrafish Liver Cancer Models Share Molecular Signatures with Subsets of Human Hepatocellular Carcinoma. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1-11, 2014.

[52] EVASON, K. J.; FRANCISCO, M. T.; JURIC, V.; BALAKRISHNAN, S.; LOPEZ PAZMINO, M. del P.; GORDAN, J. D.; KAKAR, S.; SPITSBERGEN, J.; GOGA, A.; STAINIER, D. Y. R. Identification of Chemical Inhibitors of β -Catenin-Driven Liver Tumorigenesis in Zebrafish. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 7, p. 1–32, 2015.

[53] LI, Z.; ZHENG, W.; LI, H.; LI, C.; GONG, Z. Synergistic Induction of Potential Warburg Effect in Zebrafish Hepatocellular Carcinoma by Co-Transgenic Expression of Myc and xmrk Oncogenes. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–19, 2015. Disponível em: < doi: 10.1371/journal.pone.0132319>.

[54] RHEKA, D.R.; ANUSHA, A.; MOUR, G.; HUI, Y.; GONG, H. Thioacetamide accelerates steatohepatitis, cirrhosis and HCC by expressing HCV core protein in transgenic zebrafish *Danio rerio*. **Toxicology**, v. 243, p. 11–22, 2008.

[55] KO, J. H.; NAM, Y. H.; JOO, S.; KIM, H.; LEE, Y.; KANG, T. H.; BAEK, N. Flavonoid 8- O -Glucuronides from the Aerial Parts of *Malva verticillata* and Their Recovery Effects on Alloxan Induced Pancreatic Islets in Zebrafish. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 833, 2018. Disponível em: <doi:10.3390/molecules23040833>

[56] CASTAÑEDA, R.; RODRIGUEZ, I.; HEE, Y.; NA, B.; HO, T. Phytomedicine Trigonelline promotes auditory function through nerve growth factor signaling on diabetic animal models. **Phytomedicine**, v. 36, n. 1, p. 128–136, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2017.09.023>>.

[57] NAM, Y. H.; LE, H. T.; RODRIGUEZ, I.; KIM, E. Y.; KIM, K.; JEONG, S. Y.; WOO, S. H.; LEE, Y. R.; CASTAÑEDA, R.; HONG, J.; JI, M. G.; KIM, U.; HONG, B. N.; KIM, T. W.; KANG, T. H. Enhanced antidiabetic efficacy and safety of compound K/b - cyclodextrin inclusion complex in zebrafish. *Journal of Ginseng Research*, v. 41, n. 1, p. 103–112, 2016. Disponível em: <doi:10.1016/j.jgr.2016.08.007>

[58] SEO, K.; NAM, Y.; LEE, D.; AHN, E.; KANG, T.; BAEK, N. Recovery effect of phenylpropanoid glycosides from *Magnolia obovata* fruit on alloxan-induced pancreatic islet damage in zebrafish (*Danio rerio*). **Carbohydrate Research**, v. 416, n. 1, p. 70–74, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2015.07.010>>.

[59] NAM, Y. H.; HONG, B. N.; RODRIGUEZ, M. I.; JI, G.; KIM, K.; KIM, U.; KANG, T. H. Synergistic potentials of coffee on injured pancreatic islets and insulin action via KATP channel-blocking in zebrafish. Synergistic potentials of coffee on injured pancreatic islets and insulin action via K ATP channel-blocking in zebrafish. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 23, p. 5612–5621, 2015. Disponível em: <doi:10.1021/acs.jafc.5b00027>.

[60] KWON, S. J.; HWANG, S. J.; JUNG, Y.; PARK, H.; KIM, M.; PARK, Y.; LEE, H. A synthetic Nitraria alkaloid, isonitramine protects pancreatic β -cell and attenuates postprandial hyperglycemia. **Metabolism**, v. 70, n. 1, p. 107–115, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2017.02.002>>.

[61] SARRAS, M. P.; LEONTOVICH, A. A.; OLSEN, A. S.; INTINE, R. V. Impaired tissue regeneration corresponds with altered expression of developmental genes that persists in the metabolic memory state of diabetic zebrafish. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 2, p. 320-328, 2013.

[62] OLSEN, A. S.; LEONTOVICH, A.; INTINE, R. V. Heritable Transmission of Diabetic Metabolic Memory in Zebrafish Correlates with DNA Hypomethylation and Aberrant Gene Expression. **Diabetes**, v. 61, n. 2, p. 485-491, 2012.

[63] OLSEN, A. S.; SARRAS, M. P.; INTINE, R. V. Limb regeneration is impaired in an adult zebrafish model of diabetes mellitus. **Wound Repair and Regeneration**, n. 18, v. 5, p. 532-542, 2010.

[64] DELASPRES, F.; BEER, R. L.; ROVIRA, M.; HUANG, W.; GEE, S.; VITERY, C.; WHEELAN, S. J.; PARSONS, M. J. Centroacinar Cells Are Progenitors That Contribute to Endocrine Pancreas Regeneration. **Diabetes**, v. 64, n. 10, p. 3499–3509. Disponível em: <doi:10.2337/db15-0153>

[65] CARVALHO, F. R.; FERNANDES, A. R.; CANCELA, M. L.; GAVAIA, P. J. Improved regeneration and de novo bone formation in a diabetic zebrafish model treated with Paricalcitol and Cinacalcet. **Wound Repair and Regeneration**, v. 25, n.3, p. 432–442.

[66] ZANG, L.; SHIMADA, Y.; NISHIMURA, N. Development of a Novel Zebrafish Model for Type 2 Diabetes Mellitus. **Scientific Reports**, v. 7, n1, p. 1–11, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01432-w>>.

[67] MENG, X.; CHEN, B.; ZHANG, J. Intracellular Insulin and Impaired Autophagy in a Zebrafish model and a Cell Model of Type 2 diabetes. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 8, p. 985-995, 2017.

[68] MICHEL, M.; PAGE-MCCAW, P. S.; CHEN, W.; CONE, R. D. Leptin signaling regulates glucose homeostasis, but not adipostasis, in the zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 11, p. 3084–3089, 2016.

[69] KIMMEL, R. A.; DOBLER, S.; SCHMITNER, N.; WALSEN, T.; FREUDENBLUM, J. show conserved responses to nutrient overload and anti-glycemic treatment. **Scientific Reports**, v. 5, n.1, p. 1–14, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep14241>>.

[70] FACCHINELLO, N.; TARIFEÑO-SALDIVIA, E.; GRISAN, E.; SCHIAVONE, M.; PERON, M.; MONGERA, A.; EK, O.; SCHMITNER, N.; MEYER, D.; PEERS, B.; TISO, N.; ARGENTON, F. Tcf7l2 plays pleiotropic roles in the control of glucose homeostasis, pancreas morphology, vascularization and regeneration. **Scientific Reports**, v. 7, n 1, p. 1-16, 2017.

[71] CARNOVALI, M.; LUZI, L.; BAN, G. Chronic hyperglycemia affects bone metabolism in adult zebrafish scale model. **Endocrine**, v 54, n. 3, p. 808-817, 2016.

[72] TINGAUD-SEQUEIRA, A.; OUADAH, N.; BABIN, P. J. Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity. **Journal of Lipid Research**, v. 52, n. 9, p. 1765–1772, 2011. Disponível em: <<http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.D017012>>.

[73] LANDGRAF, K.; SCHUSTER, S.; MEUSEL, A.; GARTEN, A.; RIEMER, T.; SCHLEINITZ, D. Short-term overfeeding of zebrafish with normal or high-fat diet as a model for the development of metabolically healthy versus unhealthy obesity. **BMC Physiology**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2017. Disponível em: <[doi:10.1186/s12899-017-0031-x](https://doi.org/10.1186/s12899-017-0031-x)>.

[74] SEEBACHER, F.; TALLIS, J.; MCSHEA, K.; JAMES, R. S. Obesity-induced decreases in muscle performance are not reversed by weight loss. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 8, p. 1271–1278, 2017. doi:10.1038/ijo.2017.81

[75] MONTALBANO, G.; MANIA, M.; CRISTINA, M.; ABBATE, F.; LAURÀ, R.; NAVARRA, M.; VEGA, J. A.; CIRIACO, E.; GERMANÀ, A. Morphological differences in adipose tissue and changes in BDNF/Trkb expression in brain and gut of a diet induced obese zebrafish model. **Annals of Anatomy**, v. 204, n. 1, p. 36–44, 2016.

[76] FEI, F.; SUN, S. Y.; YAO, Y. X.; WANG, X. Generation and phenotype analysis of zebrafish mutations of obesity-related genes *lepr* and *mc4r*. *Acta Physiologica Sinica*, v. 69, n. 1, p. 61-69, 2017.

PENG, X.; SHANG, G.; WANG, W.; CHEN, X.; LOU, Q.; ZHAI, G.; LI, D.; DU, Z.; YE, Y.; JIN, X.; HE, J.; ZHANG, Y.; YIN, Z. Fatty Acid Oxidation in Zebrafish Adipose Tissue Is Promoted by $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. **CellReports**, v. 19, n. 7, p. 1444–1455, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.066>>.

[77] NISHIMURA, Y., SASAGAWA, S., ARIYOSHI, M., ICHIKAWA, S., SHIMADA, Y., KAWAGUCHI, K.; TANAKA, T. Systems pharmacology of adiposity reveals inhibition of EP300 as a common therapeutic mechanism of caloric restriction and resveratrol for obesity. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 199. Disponível em: <doi:10.3389/fphar.2015.00199>

[78] BHATTARAI, P.; THOMAS, A. K.; COSACAK, M. I.; DAHL, A.; BHATTARAI, P.; THOMAS, A. K.; COSACAK, M. I.; PAPADIMITRIOU, C. IL4 / STAT6 Signaling Activates Neural Stem Cell Proliferation and Neurogenesis upon Amyloid- b 42 Aggregation in Adult Zebrafish Brain Report IL4 / STAT6 Signaling Activates Neural Stem Cell Proliferation and Neurogenesis upon Amyloid- b 42 Aggregation in Adult Zebrafish Brain. **CellReports**, v. 17, n. 4, p. 941–948, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.075>.

[79] BHATTARAI, P.; THOMAS, A. K.; ZHANG, Y.; KIZIL, C. The effects of aging on Amyloid- β 42-induced neurodegeneration and regeneration in adult zebrafish brain. **Neurogenesis**, v. 4, n. 1, p. 1-18, 2017. Disponível em: < doi:10.1080/23262133.2017>

[80] COSACAK, M. I.; BHATTARAI, P.; BOCOVA, L.; DZEWSAS, T.; CHRISTOS, P.; BRANDT, K.; HOLLAK, H.; ANTOS, C. L.; KIZIL, C. Human TAUP301L overexpression results in TAU hyperphosphorylation without neurofibrillary tangles in adult zebrafish brain. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017. Disponível em: <doi:10.1038/s41598-017-13311-5>.

[81] KOEHLER, D.; WILLIAMS, F. E. Utilizing zebrafish and okadaic acid to study Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 9, p. 1538-1541, 2015.

[82] NADA, S. E.; WILLIAMS, F. E.; SHAH, Z. A. Development of a Novel and Robust Pharmacological Model of Okadaic Acid-induced Alzheimer ' s Disease in Zebrafish. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 15, n. 1, p. 86–94, 2016.

[83] CRONIN, A.; GREALY, M. Neuroprotective and neuro-restorative effects of minocycline and rasagiline in a zebrafish 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v.367, n.1, p. 34-46, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.10.018>.

[84] HU, Z.; CHEN, B.; ZHANG, J.; MA, Y. Up-regulation of autophagy-related gene 5 (ATG5) protects dopaminergic neurons in a zebrafish model of Parkinson's disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, p. 18062–18074, 2017.

[85] FLINN, L. J.; KEATINGE, M.; BRETAUD, S.; MORTIBOYS, H.; MATSUI, H.; De Felice, E.; BANDMANN, O. TigarB causes mitochondrial dysfunction and neuronal loss in PINK1 deficiency. **Annals of Neurology**, v.74, n.6, p. 837–847. 2013. Disponível em: <doi:10.1002/ana.23999>.

[86] ZHANG, C.; WILLETT, C. Zebrafish: An animal model for Toxicological Studies. **Current Protocols in Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 1-18, 2003.

[87] DODD, A.; CURTIS, P. M.; WILLIAMS, L. C.; LOVE, D. R. Zebrafish : bridging the gap between development and disease. **Human Molecular Genetics** v. 9, n. 16, p. 2443–2450, 2000.

[88] BOWMAN, T. V.; ZON, L. I. Swimming into the Future of Drug Discovery: In-vivo chemical screens in zebrafish. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n. 2, p. 159-161, 2010.

[89] CHAKRABORTY, C.; HSU, C. H.; WEN, Z. H.; LIN, C. S.; AGORAMOORTHY, G. *Zebrafish*: a complete animal model for in vivo drug discovery and development. **Curr Drug Metab**, v. 10, n. 2, p. 116–124, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19275547>>.

[90] CORNET, C.; DI DONATO, V.; TERRIENTE, J. Combining *Zebrafish* and CRISPR/Cas9: Toward a More Efficient Drug Discovery Pipeline. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. July, p. 1–11, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00703/full>>.

[91] DAS, B. C.; MCCORMICK, L.; THAPA, P.; KARKI, R.; EVANS, T. Use of *zebrafish* in chemical biology and drug discovery. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 17, p. 2103–2116, 2013.

[92] DELVECCHIO, C.; TIEFENBACH, J.; KRAUSE, H. M. The *Zebrafish*: A Powerful Platform for *In Vivo* , HTS Drug Discovery. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 9, n. 4, p. 354–361, 2011. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/adt.2010.0346>>.

[93] WHEELER, G. N.; BRÄNDLI, A. W. Simple vertebrate models for chemical genetics and drug discovery screens: Lessons from *zebrafish* and *Xenopus*. **Developmental Dynamics**, v. 238, n. 6, p. 1287–1308, 2009.

[94] BARROS, T. P.; ALDERTON, W. K.; REYNOLDS, H. M.; ROACH, A. G.; BERGHMANS, S. Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 1, p. 1400-1423, 2008.

[95] BROWN, H.; SCHIAVONE, K.; TAZZYMAN, S.; HEYMANN, D.; CHICO, T. Zebrafish xenograft models of cancer and metastasis for drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 4, p. 379-389, 2017, Disponível em: <10.1080/17460441.2017.1297416>.

[96] GAO, Y.; CHAN, R. H. M.; CHOW, T. W. S.; ZHANG, L.; BONILLA, S.; PANG, C. A High-Throughput Zebrafish Screening Method for Visual Mutants by Light-Induced Locomotor Response. **IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform**, v. 11, n. 4, p. 693–701, 2014.

[97] HUITING, L. N.; LAROCHE, F. J. F.; FENG, H. The Zebrafish as a Tool to Cancer Drug Discovery. **Austin Journal of Pharmacology and Therapeutics**, v. 3, n. 2, p. 1069, 2015.

[98] TAT, J.; LIU, M.; WEN, X. Zebrafish cancer and metastasis models for in vivo drug discovery. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 10, n. 1, p. 83–89, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.04.006>>.

[99] HIRATA, H. Zebrafish muscular disease models towards drug discovery. **Expert Opin Drug Discov.**, v. 4, n. 5, p. 507–514, 2009.

[100] MAVES, L. Recent advances using zebrafish animal models for muscle disease drug discovery. **Expert Opin Drug Discov.** v. 9, n. 9, p. 1033–1045, 2015.

[101] KESSLER, M.; ROTTBAUER, W.; JUST, S. Recent progress in the use of zebrafish for novel cardiac drug discovery. **Expert Opin Drug Discov.** v. 10, n. 11, p. 1231–1241, 2015.

[102] ROCKE, J.; LEES, J.; PACKHAM, I.; CHICO, T. The Zebrafish as a Novel Tool for Cardiovascular Drug Discovery. **Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2009.

[103] KHAN, K. M.; COLLIER, A. D.; MESHALKINA, D. A.; KYSIL, E. V.; KHATSKO, S. L.; KOLESNIKOVA, T.; MORZHERIN, Y. Y.; WARNICK, J. E.; KALUEFF, A. V.; ECHEVARRIA, D. J. Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 1, p. 1925-1944, 2017.

[104] KOKEL, D.; RANDALL, T. Chemobehavioural phenomics and behaviour-based psychiatric drug discovery in the zebrafish. **Briefings in Funcional Genomics and Proteomics**, v. 7, n. 6, p. 483-490, 2008.

[105] NGUYEN, M.; POUDEL, M. K.; MICHAEL, A.; KALUEFF, A. V. Skin too thin? The developing utility of zebrafish skin (neuro) pharmacology for CNS drug discovery research. **Brain Research Bulletin**, v. 98, p. 145–154, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2013.08.004>>.

[106] STEWART, A. M.; GERLAI, R.; KALUEFF, A. V.; BRENNAN, C. H.; BONAN, C. D. Developing highER-throughput zebrafish screens for in-vivo CNS drug discovery. **Frontiers in Behavioural Neuroscience**, v. 9, p. 1–8, 2015.

[107] VAZ, R. L.; OUTEIRO, T. F.; FERREIRA, J. J. Zebrafish as an Animal Model for Drug Discovery in Parkinson's Disease and Other Movement Disorders : A Systematic Review. **Frontiers in Neurology**, v. 9, p. 1-23, 2018.

[108] MCGRATH, P.; SENG, W. L. Use of zebrafish apoptosis assays for preclinical drug discovery. **Expert Opin Drug Discov**, v. 8, n. 10, p. 1191-1202, 2013.

[109] NGUYEN, A. T.; EMELYANOV, A.; KOH, C. H. V.; SPITSBERGEN, J. M.; PARINOV, S.; GONG, Z. An inducible *krasV12* transgenic *zebrafish* model for liver tumorigenesis and chemical drug screening. **Disease Models & Mechanisms**, v. 5, n. 1, p. 63–72, 2012. Disponível em: <<http://dmm.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dmm.008367>>.

[110] JUNG, D.-W.; OH, E.-S.; PARK, S.-H.; CHANG, Y.-T.; KIM, C.-H.; CHOI, S.-Y.; WILLIAMS, D. R. A novel *zebrafish* human tumor xenograft model validated for anti-cancer drug screening. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 7, p. 1930, 2012. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c2mb05501e>>.

[111] JO, D. H.; SON, D.; NA, Y.; JANG, M.; CHOI, J.; KIM, J. H.; YU, Y. S.; SEOK, S. H.; KIM, J. H. Orthotopic transplantation of retinoblastoma cells into vitreous cavity of *zebrafish* for screening of anticancer drugs. p. 1–9, 2013.

[112] ZHANG, B.; SHIMADA, Y.; KUROYANAGI, J.; UMEMOTO, N. Quantitative Phenotyping-Based In Vivo Chemical Screening in a *Zebrafish* Model of Leukemia Stem Cell Xenotransplantation. v. 9, n. 1, p. 1–9, 2014.

[113] LEE, H.-J.; YANG, Y. J.; JEONG, S.; LEE, J. D.; CHOI, S.-Y.; JUNG, D.-W.; MOON, I. S. Development of a vestibular schwannoma xenograft *zebrafish* model for in vivo antitumor drug screening. **The Laryngoscope**, v. 126, n. 12, p. E409–E415, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/lary.26043>>.

[114] LI, Y.; HUANG, W.; HUANG, S.; DU, J.; HUANG, C. Screening of anti-cancer agent using *zebrafish*: Comparison with the MTT assay. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 422, n. 1, p. 85–90, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.110>>.

[115] VIEIRA, V. M. da M.; OHAYON, P. Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D. Revista Economia & Gestão da PUC Minas. Disponível em: <<http://periodicos.pucminas.br/index.php/economiaegestao/article/viewArticle/26>>

[116] WEINSTEIN, B. M. Vascular cell biology in vivo: a new piscine paradigm? **Trends in Cell Biology**, v. 12, n. 9, p. 439–445, 2002.

[117] SETH, A.; STEMPLE, D. L.; BARROSO, I. The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. **Disease Models & Mechanisms**, v.6, n.5, p.1080–1088, 2013.

[118] ELO, B.; VILLANO, C. M.; GOVORKO, D.; WHITE, L. A. Larval zebrafish as a model for glucose metabolism: expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase as a marker for exposure to anti-diabetic compounds. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 38, n. 4), p. 433–440, 2007. doi:10.1677/jme-06-0037

[119] PANULA, P.; CHEN, Y. C.; PRIYADARSHINI, M.; KUDO, H.; SEMENOVA, S.; SUNDVIK, M.; SALLINEN, V. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 40, n. 1, p. 46–57, 2010.

[120] MORO, E.; VETTORI, A.; PORAZZI, P.; SCHIAVONE, M.; RAMPAZZO, E.; CASARI, A.; ARGENTON, F. Generation and application of signaling pathway reporter lines in zebrafish. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 288, n 5, p. 231–242, 2013.

8. ANEXOS

Data e assinatura do aluno(a)

Data e assinatura do orientador(a)