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

Ian Guimarães de Araújo[1], Pedro Victor Carvalho Costa[1], Matheus Santos Costa[2], Rogério Oliveira Faleiros[1], Juliana Castro Monteiro[1]

[1]Universidade Fedederal do Espírito Santo, São Mateus - ES, Brasil
(ian-guimaraes44@hotmail.com)
[2]Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil

O peixe-zebra é um modelo consolidado na pesquisa biomédica, mas exige infraestrutura e protocolos padronizados para seu cultivo. Este estudo utilizou análise documental da legislação brasileira, além de guias e artigos, para criar um protocolo de cultivo e reprodução para o Laboratório de Bioexperimentação da UFES. A padronização estabelece bases éticas e reprodutíveis para pesquisas futuras.

Palavras-chave: Peixe-zebra; BPL; biotério.

INTRODUÇÃO

O *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822), conhecido no Brasil como peixe-zebra ou paulistinha, é um Cypriniforme que se destaca no cenário científico por possuir características biológicas e genéticas que o tornam um modelo (Dammski *et al*., 2011). Entre suas principais vantagens estão o curto ciclo de vida, a facilidade de reprodução em laboratório, a elevada taxa reprodutiva, o rápido desenvolvimento embrionário, a fertilização externa e a transparência dos ovos. Seu genoma apresenta cerca de 70% de similaridade com o genoma humano (Currie e Lieschke, 2007; Dey e Das, 2025), o que o torna uma alternativa viável ao uso de roedores (Ribeiro *et al*., 2022).

A manutenção e o cultivo da espécie exigem infraestruturas especializadas denominadas biotérios, que devem assegurar condições ambientais, sanitárias e de bem-estar animal rigorosamente controladas para minimizar variações fisiológicas (Brasil, 2021). O funcionamento adequado dessas instalações deve seguir as Boas Práticas de Laboratório (BPL) para garantir a padronização dos procedimentos (World Health Organization, 2009). Embora o cultivo do peixe-zebra apresente custos reduzidos em comparação com outros animais, como ratos (Dammski *et al*., 2011; Lipman, 2024), é necessária uma infraestrutura com sistemas de recirculação de água, controle de parâmetros físico-químicos (Hammer, 2020; Guibert, 2025) e implementação de Procedimentos Operacionais Padrão (POPs).

Sua capacidade de modelar doenças humanas é fundamental para a investigação de patologias genéticas e a avaliação de novas estratégias terapêuticas (Zortéa, 2020; Facchinello *et al*., 2025a Facchinello *et al*., 2025b). A versatilidade do *zebrafish* na modelagem de doenças humanas viabiliza desde a triagem de fármacos (Jamadagni *et al*., 2026) e a modulação genética de mecanismos patológicos (Wijerathna *et al*., 2024) até o estudo de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (Wang *et al*., 2021) e de doenças cardiovasculares e metabólicas, incluindo cardiopatias, obesidade e diabetes tipo 2 (Angom e Nakka, 2024).

No evento, a ausência de protocolos de manejo pode comprometer a validade dos resultados e a qualidade dos dados gerados na pesquisa (Hollmann *et al.* 2020), sobretudo em biotérios em fase de implantação. Nesse contexto, o presente estudo objetivou a padronização do cultivo e da reprodução do peixe-zebra na implantação do Laboratório de Bioexperimentação (LaBex) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), campus São Mateus.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido em três etapas principais: análise documental, elaboração de um guia técnico de boas práticas e padronização de protocolos de reprodução.

Análise documental: Foi realizada uma análise documental da legislação brasileira e de diretrizes internacionais sobre criação, manejo e uso de *D. rerio* em laboratório. A metodologia consistiu na identificação, seleção e sistematização de documentos oficiais, sem delimitação temporal. Foram considerados: (i) legislação brasileira vigente (Lei nº 11.794/2008 – Lei Arouca; resoluções do CONCEA; normas do IBAMA; portarias e decretos correlatos); (ii) diretrizes internacionais sobre boas práticas

com *D. rerio* e normativas de instituições estrangeiras reconhecidas; (iii) regulamentações técnicas sobre biotérios no Brasil, incluindo biossegurança, bem-estar animal e parâmetros ambientais para a espécie. Os documentos foram obtidos de fontes oficiais (sites governamentais, conselhos reguladores e repositórios científicos).

Elaboração do Guia Técnico de Boas Práticas: Com base no levantamento documental, e nas condições atuais para implantação, foi elaborado um Guia Técnico contendo recomendações de Boas Práticas de Laboratório (BPL) para manutenção de *D. rerio* no LaBex, visando atender às exigências normativas e garantir o bem-estar animal, incluindo a implantação de sistema de recirculação padronizado.

Padronização da reprodução: Foram padronizados protocolos de cultivo, reprodução e desenvolvimento embrionário, adaptados da literatura científica à estrutura do LaBex. O delineamento incluiu: seleção de reprodutores; observação de comportamentos sexuais e reprodutivos; coleta e incubação de ovos; registro do desenvolvimento embrionário e larval; e controle das variáveis ambientais (temperatura, fotoperíodo, densidade e qualidade da água). O guia contemplou medidas para escolha de casais, condições ambientais ideais e uso de aquários do tipo *ZebClean* para desova, simulando o ambiente natural para otimizar a fecundidade.

Todos os protocolos desenvolvidos foram aprovados pela CEUA-Ufes, sob os projetos nº 02/2023 e nº 12/2023, referentes à produção, manutenção e experimentação com peixe-zebra no LaBex.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Legislação Vigente Relacionada ao Uso de Animais em Pesquisa

No Brasil, o uso de animais em pesquisa e ensino é regulado pela Lei Arouca (nº 11.794/2008), que assegura o bem-estar animal. O CONCEA normatiza e fiscaliza essas atividades, exigindo CEUAs nas instituições, além do credenciamento institucional (CIAEP) via CIUCA, comprovando infraestrutura e equipe qualificada.

O Decreto nº 6.899/2009 regulamenta a Lei Arouca, detalhando o funcionamento do CONCEA e das CEUAs, e estabelecendo punições para o descumprimento. O CONCEA emite Resoluções Normativas, como a RN nº 37/2018 (eutanásia), RN nº 49/2021 (capacitação profissional), RN nº 50/2021 (CIAEP) e, crucialmente, a RN nº 61/2023, que regulamenta a criação, manutenção e experimentação com peixes, incluindo peixe-zebra, Lambari e Tilápia. A Nota Informativa nº 01/2024 aborda o uso de embriões, fetos ou formas larvais. A legislação enfatiza a ética, o bem-estar e a busca por métodos alternativos, com sanções legais em caso de maus-tratos (Lei nº 9.605/1998).

Outros órgãos como o IBAMA (animais silvestres) e o MAPA (animais de produção) também atuam na fiscalização. No âmbito da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), a CEUA-Ufes, estabelecida pela Portaria 1.112/2007, analisa os aspectos éticos dos protocolos de ensino e pesquisa e monitora as instalações cadastradas no CIUCA.

Com base na legislação analisada, foi possível estabelecer procedimentos alinhados às exigências legais vigentes, abrangendo desde a infraestrutura laboratorial necessária até o manejo e cultivo do peixe-zebra no Brasil. A adequação aos padrões normativos assegura não apenas o bem-estar animal e as questões éticas envolvidas, mas também a reprodutibilidade dos experimentos científicos das pesquisas desenvolvidas no LaBex.

Infraestrutura Laboratorial, Aspectos Éticos e BPL

O Laboratório de Bioexperimentação (LaBex) da UFES, *campus* São Mateus, em colaboração com o Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA), constitui uma Unidade Experimental credenciada junto ao CIUCA-CONCEA. Esta unidade é dedicada à criação e manutenção de *D. rerio* para experimentação animal (Figura 1).



Figura 1. Sistema de recirculação do LaBex. Fonte: autoria própria.

Uma visita técnica da CEUA-Ufes (23/08/2023) avaliou as instalações, considerando satisfatórios o

estado sanitário dos animais, o controle e registro dos parâmetros físico-químicos da água (pH, temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, amônia, nitrito, nitrato, dureza), luminosidade, aeração e controle de patógenos.

Adequações estruturais, monitoramento e conformidade ética

Foram identificadas vulnerabilidades estruturais nas instalações, posteriormente mitigadas por medidas como o descarte de resíduos por empresa especializada, a adequação da rede elétrica, a climatização do ambiente com aparelhos de ar-condicionado (temperatura mantida em torno de 24 °C), o controle do fotoperíodo (14 horas de luz e 10 horas de escuro) e a implementação de estratégias de enriquecimento ambiental (incluindo o uso de canos de PVC e plantas plásticas nos aquários). Essas ações tiveram como objetivo reduzir o estresse dos animais (Goolish *et al*., 1998; Lawrence, 2007). Adicionalmente, foram implantados sistemas de monitoramento remoto por câmeras Wi-Fi e futuramente serão instaladas lâmpadas sentinelas.

A água utilizada no sistema é proveniente de poço artesiano e, até o momento, não recebe tratamento prévio. Considerando que a Resolução Normativa CONCEA nº 61 estabelece a necessidade de sistema de abastecimento com reservatório e recomenda a utilização de filtros para prevenção de contaminantes, foi implementado um monitoramento rigoroso dos parâmetros físico-químicos da água, associado ao controle periódico de sua reconstituição.

Para otimizar a nutrição dos organismos, foram padronizados os cultivos de artêmia (Figura 2), e microveme da aveia (Figura 3) e paramécios (Figura 4), as rotinas de alimentação e o fornecimento de rações adequadas às diferentes fases do desenvolvimento do peixe-zebra: larval, juvenil e adulta.

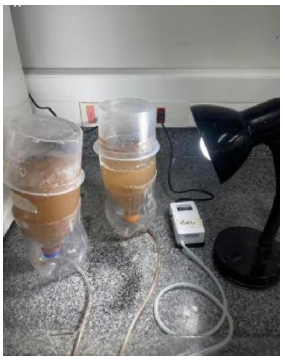


Figura 2. Cultivo de artêmia em artemeira caseira. Fonte: autoria própria.



Figura 3. Cultivo de microverme da aveia em potes de vidro tapados com perlon. Fonte: autoria própria.



Figura 4. Cultivo de Paramécios em frasco Erlenmeyer. Fonte: autoria propria.

Reprodução

O *D. rerio* apresenta dimorfismo sexual, com machos esguios e amarelados e fêmeas prateadas (Figura 5) com protuberância ventral (Spence *et al*., 2006), além disso, machos apresentam estruturas epidérmicas queratinizadas em forma de espícula nas nadadeiras peitorais (McMillan *et al*., 2015).



Figura 5. *Danio rerio* fêmea (seta verde) e macho (seta vermelha) em aquário no LaBex. Fonte: autoria própria.

O comportamento reprodutivo envolve um cortejo complexo com liberação simultânea de gametas estimulada por oscilações corporais (Spence *et al*., 2008). Os ovos são transparentes e demersais, com desenvolvimento embrionário de aproximadamente 96 horas, passando por estágios definidos de zigoto a eclosão (Quintaneiro *et al*., 2022). As medidas implementadas em relação aos parâmetros físico-químicos e alimentares, além do uso de aquários *ZebClean/Alesco* específicos para reprodução têm garantido alta viabilidade dos ovos produzidos para bioensaios.

Bioexperimentação em embriões

Adicionalmente, foi elaborada uma ficha técnica específica para estudos de embriotoxicidade, visando a padronização das futuras análises conduzidas no LaBex. Esses avanços são cruciais para a realização de ensaios ecotoxicológicos de embriotoxicidade, garantindo a reprodutibilidade e confiabilidade dos estudos científicos com o modelo peixe-zebra.

CONCLUSÃO

A padronização do cultivo e reprodução do peixe-zebra, permite consolidar um modelo mundialmente utilizado dentro dos parâmetros legais e éticos que envolve o cuidado de animais vertebrados, mesmo em realidades com altas limitações de pessoal e orçamentária.

Nesse sentido, ainda existem limitações no que diz respeito a estrutura adicional necessária das instalações de cultivo, como a dotação de um sistema de geração energia própria e filtragem prévia da água.

Apesar disso, a padronização representa um importante marco para o avanço de uma unidade de ensaios científicos que estão em avanço no LaBex, e para biotérios em implantação. Com protocolos elucidados, registro e controle de variáveis é possível estabelecer resultados confiáveis e reprodutibilidade experimental com respeito ao bem-estar dos animais envolvidos na pesquisa. Dessa forma, o trabalho realizado não apenas viabiliza a utilização do peixe-zebra como modelo experimental na instituição, mas também estabelece uma base sólida para futuras pesquisas nas áreas de toxicologia, ecotoxicologia, farmacologia e modelagem de doenças humanas e no estabelecimento de biotérios de peixes em centros de pesquisa emergentes.

REFERÊNCIAS

Angom, R., e Nakka, N. Zebrafish as a Model for Cardiovascular and Metabolic Disease: The Future of Precision Medicine. Biomedicines, 12(3), 693, 2024.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 dez. 2021.

Brasil. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 9 out. 2008

Currie, P. D., e Lieschke, G. J. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. Nature Reviews Genetics, 8, 353–367, 2007.

Dammski, A. P., Müller, B. R., e Gaya, C. Manual de Criação em Biotério. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

Dey, D., Nagalakshmi, N. C., e Das, K. Zebra Fish Model as a Promising Alternative to Laboratory Rodents in Pharmacological and Biomedical Research. UTAR PRADESH JOURNAL OF ZOOLOGY, 46(9), 153–167, 2025.

Facchinello, N., Williams, A. L., e Tiso, N. Editorial: Zebrafish: bona fide pathophysiological models of human diseases. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 13, 1624614, 2025a.

Facchinello, N., Williams, A. L., e Tiso, N. Zebrafish: bona fide pathophysiological models of human diseases. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 13, 1624614, 2025.in Cell and Developmental Biology, 13, 1624614, 2025b.

Guibert, N., Mocho, J. P., Bally-Cuif, L., e Bedu, S. Balance Between Daily Water Renewal and Nitrate Levels in a Recirculating Zebrafish Housing System. Zebrafish, 22(5), 189-194, 2025.

Hammer, H. S. The Zebrafish in Biomedical Research. (Cartner, S. C., Eisen, J. S., Farmer, S. C., Guillemin, K. J., Kent, M. L., e Sanders, G. E.). Academic Press, Londres, 2020.

Hollmann, S., Frohme, M., Endrullat, C., Kremer, A., D'Elia, D., Regierer, B., e Nechiporenko, A. Ten simple rules on how to write a standard operating procedure. PLoS Computational Biology, 16(9), e1008090, 2020.

Jamadagni, P., *et al*. Pharmaco-behavioral profiling identifies suppressors of autism gene-associated phenotypes in zebrafish. Proceedings of the National Academy of Sciences, 123(12), e2518846123, 2026.

Lipman, N. S. Letter to the Editor: The Financial Realities of the Zebrafish as a Model Organism. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 63(6), 593, 2024.

Quintaneiro, C., Gagliardi, M., Capone, L., e Domingues, I. Desenvolvimento embrionário do peixe-zebra. Captar, 1, e20, 2022.

Ribeiro, O. M. R., Pinto, M. Q. P., Félix, L., Monteiro, S., Fernandes, A., e Carrola, J. S. C. O peixe-zebra (Danio rerio) como modelo emergente na ecotoxicologia. Revista de Ciência Elementar, 10(2), 2022.

Spence, R., e Smith, C. Mating preference of female zebrafish, Danio rerio, in relation to male dominance. Behavioral Ecology, 17(5), 779-783, 2006.

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., e Smith, C. The Behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio. Biological Reviews, 83(1), 13-34, 2008.

Wang, X., Zhang, J., He, K., Wang, F., e Liu, C. Advances of Zebrafish in Neurodegenerative Disease: From Models to Drug Discovery. Frontiers in Pharmacology, 12, 713963, 2021.

Wijerathna, H. M. S. M., *et al*. CRISPR/Cas9-mediated fesh knockout Zebrafish: Unraveling the pathogenesis of erythropoietic protoporphyria and facilitating drug screening. International Journal of Molecular Sciences, 25(19), 10819, 2024.

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

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