

# Uso de embriões de peixe-zebra em ecotoxicologia

Mônica A. M. Moura

monica\_moura@biologico.sp.gov.br

Centro Experimental Central do Instituto Biológico

Rhau de Oliveira

Pós-doutorando da Universidade de Brasília

Número 201 - 17/04/2014

A contaminação dos mananciais pode se dar por diferentes fontes poluentes, como os agroquímicos e pesticidas, resíduos de origem doméstica e industrial, etc. O que pode vir a inviabilizar o uso destes corpos d'água para diferentes fins como o abastecimento público, a manutenção das comunidades aquáticas associadas, a recreação, a irrigação de lavouras, a aquicultura e a pesca, a dessedentação animal e a harmonia paisagística.

Nascida na década de 1960, a Ecotoxicologia é uma ciência relativamente nova e multidisciplinar, que visa estudar como os agentes químicos e outros estressores afetam o ambiente e os organismos aí presentes, desde o nível molecular até a organização dos ecossistemas. Em pleno século XXI, a Ecotoxicologia é uma área da ciência em expansão. Os procedimentos habituais de avaliação de risco ecológico foram baseados por décadas sobre abordagens simplificadas, a fim de fornecer informações básicas sobre a enorme quantidade de produtos químicos introduzidos no ambiente.

Dentre as diferentes espécies aquáticas utilizadas para atender a alta demanda por estudos sobre a segurança ambiental de compostos químicos merece destaque o peixe-zebra ou paulistinha (*Danio rerio*) (Fig. 1), um ciprinídeo tropical originário de ambientes lênticos do sudoeste da Ásia e que foi introduzido como modelo biológico na década de 1960, pelo pesquisador norte-americano George Streisinger, da Universidade do Óregon, EUA.

Esta espécie vem sendo empregada mundialmente desde a década de 1980 em estudos de genética, desenvolvimento, neurociência<sup>1</sup> e ecotoxicologia, graças a características como representatividade em relação ao grupo dos peixes; facilidade de manutenção em laboratório e estabilidade genética (além de ter o genoma totalmente sequenciado, hoje estão disponíveis linhagens de peixe-zebra com alto nível de consanguinidade, o que possibilita a obtenção de informações com uma variação interindividual menor)<sup>2</sup>.

Estudos internacionais têm empregado o *D. rerio* na avaliação ecotoxicológica de agroquímicos neurotóxicos como organofosforados e carbamatos e de químicos industriais, todos estes frequentemente encontrados nos ecossistemas aquáticos. Atualmente, os testes toxicológicos com diferentes compostos de interesse são frequentemente realizados com os embriões e não mais com os adultos desta espécie.

Como principais vantagens do uso dos embriões apontam-se o desenvolvimento embrionário rápido (com apenas quatro dias vários de seus órgãos estão formados), a grande quantidade de embriões produzida (média de 50 ovos/casal) e seu pequeno tamanho, que possibilita o uso de unidades experimentais com poços de 2 mL de volume útil, ou seja, uma menor geração de resíduos no laboratório.

O peixe-zebra também tem se mostrado sensível mesmo quando exposto a baixíssimas doses de compostos químicos, sendo possível testar em meses e com alguns milhares de dólares, o que levaria anos para ser feito com roedores e custaria milhões<sup>1</sup>. Na Figura 2 podem ser observados os diferentes estágios de desenvolvimento do peixe-zebra em relação ao tempo.

A OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) apresenta protocolos internacionais utilizados por governos, indústrias e laboratórios independentes. Estes protocolos visam à padronização de ensaios com substâncias químicas novas e existentes, preparações químicas e misturas, caracterizando riscos ambientais. Posteriormente, os dados obtidos permitem a notificação e registro de substâncias nos diversos órgãos regulamentadores ao redor do mundo.

Dentre os cerca de 100 protocolos existentes, destaca-se o teste FET (Fish Embryo Acute Toxicity Test, nº 236 de 2013), que é baseado em estudos e atividades de validação desenvolvidos com embriões de peixe-zebra (Fig. 3) e aplicados com sucesso para uma ampla gama de substâncias com diferentes modos de ação, solubilidade, volatilidade e hidrofobicidade.

No final da década de 1950, os cientistas Russel e Birch apresentaram em seu livro "The principles of humane experimental technique" o Princípio dos 3 Rs:

- Replacement – que pode ser entendido como alternativas - indica o uso de materiais sem sensibilidade (ex. cultura de tecidos, modelos de computador) no lugar de animais vivos, como também a substituição do uso de mamíferos por animais com sistema nervoso menos desenvolvido;
- Reduction – ou redução – indica o uso de desenhos experimentais com o menor número possível de animais saudáveis e geneticamente conhecidos, suficientes para a obtenção de resultados estatísticos significativos e, finalmente;
- Refinement – ou aprimoramento – as pessoas que lidam diretamente com animais na experimentação científica devem, obrigatoriamente, estar bem treinadas para tal propósito, a fim de minimizar o estresse, priorizando o uso de materiais e técnicas menos invasivas e o bem-estar animal<sup>3</sup>.

O uso de embriões de peixe-zebra apresenta-se como uma alternativa aos testes agudos com juvenis e adultos de peixes, possibilitando, desta forma, a redução/substituição do uso destes organismos na experimentação animal, uma tendência mundial.

No teste FET, os ovos de peixe-zebra recém-fertilizados são coletados dos aquários de desova, selecionados com ajuda de lupa e expostos em microplacas a 2 mL da substância de interesse, durante um período de 96 horas (Fig. 4). A cada 24 horas, são registrados os efeitos causados pelo potencial contaminante em cada nível de concentração testado.

O teste inclui cinco concentrações crescentes da substância-teste e o controle, além de quatro *endpoints* apicais, usados como indicadores de letalidade: (a) coagulação de ovos fertilizados, (b) a falta de formação de somito, (c) ausência de separação entre o pedúnculo caudal e o saco vitelino, e (d) falta de batimentos cardíacos (Fig. 5).

No final do período de exposição, a toxicidade aguda é determinada com base num resultado positivo em qualquer um dos quatro *endpoints* apicais, e a concentração necessária para produzir a morte de 50% dos indivíduos expostos (CL<sub>50</sub>) é calculada. O relatório de ensaio inclui ainda informações importantes como os parâmetros de qualidade das soluções teste, concentrações medidas de cada substância química testada e os critérios de validação do teste.

No Laboratório da Ciência das Plantas Daninhas, do Centro Experimental Central do IB, são realizados estudos de avaliação de toxicidade de herbicidas com auxílio do teste FET em parceria com pesquisadores da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP), Universidades de Brasília e de Aveiro (Portugal).

Bibliografia

<sup>2</sup>Chasin, A.A.M.; Azevedo, F.A. Intoxicação e Avaliação de Toxicidade. In: Azevedo, F.A.; Chasin, A.A.M. (Coord.). 2003. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos: Rima, 2003. p.127-165.

<sup>4</sup>Lammer, E.; Carr, G.J.; Wendler, K.; Rawlings, J.M.; Belanger, S.E.; Braunbeck, T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, v.149, p.196-209, 2009.

<sup>5</sup>Organization for Economic Co-Operation and Development. Guideline for Testing of Chemicals. Fish Embryo Toxicity (FET) Test (236). 2013. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9713161e.pdf?expires=1396280411&id=id&accname=guest&checksum=37C81741AD3E7CB85CC6DD720EBF569> Acesso em: 31 mar. 2014. DOI :10.1787/9789264203709-en

<sup>3</sup>Rivera, E.A.B. Ética na experimentação animal. *Revista de Patologia Tropical*, v.30, n.1, p.9-14, 2001. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/viewFile/15790/9682> Acesso em: 08 abr. 2014.

<sup>1</sup>Zorzetto, R.; Guimarães, M. Um peixe modelo. *Revista FAPESP*. 2013. Disponível em: [http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2013/07/016-021\\_CAPA\\_cobaia\\_209.pdf](http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2013/07/016-021_CAPA_cobaia_209.pdf) . Acesso em: 31 mar. 2014.



**Fig. 1 - Peixe-zebra (*Danio rerio*adulto. Foto: André Künzelmann, UFZ. Fonte: <http://www.ufz.de/index.php?en=6556>**

(uploads/artigos/201/1.jpg)

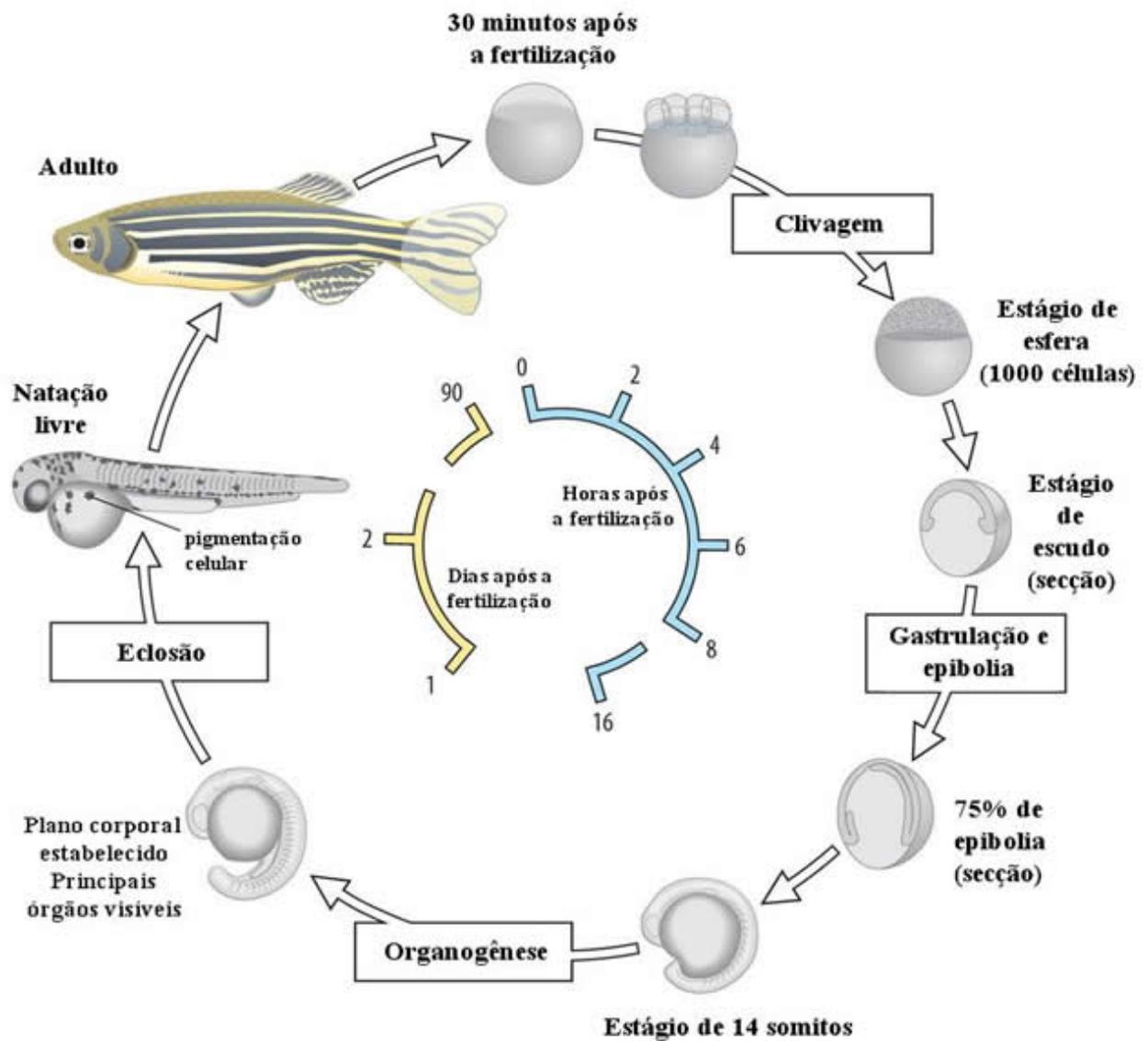


Fig. 2 - Desenvolvimento do peixe-zebra (*Danio rerio*). Fonte: Link ([http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO\\_03/devo\\_03.html](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_03/devo_03.html))

(uploads/artigos/201/2.jpg)

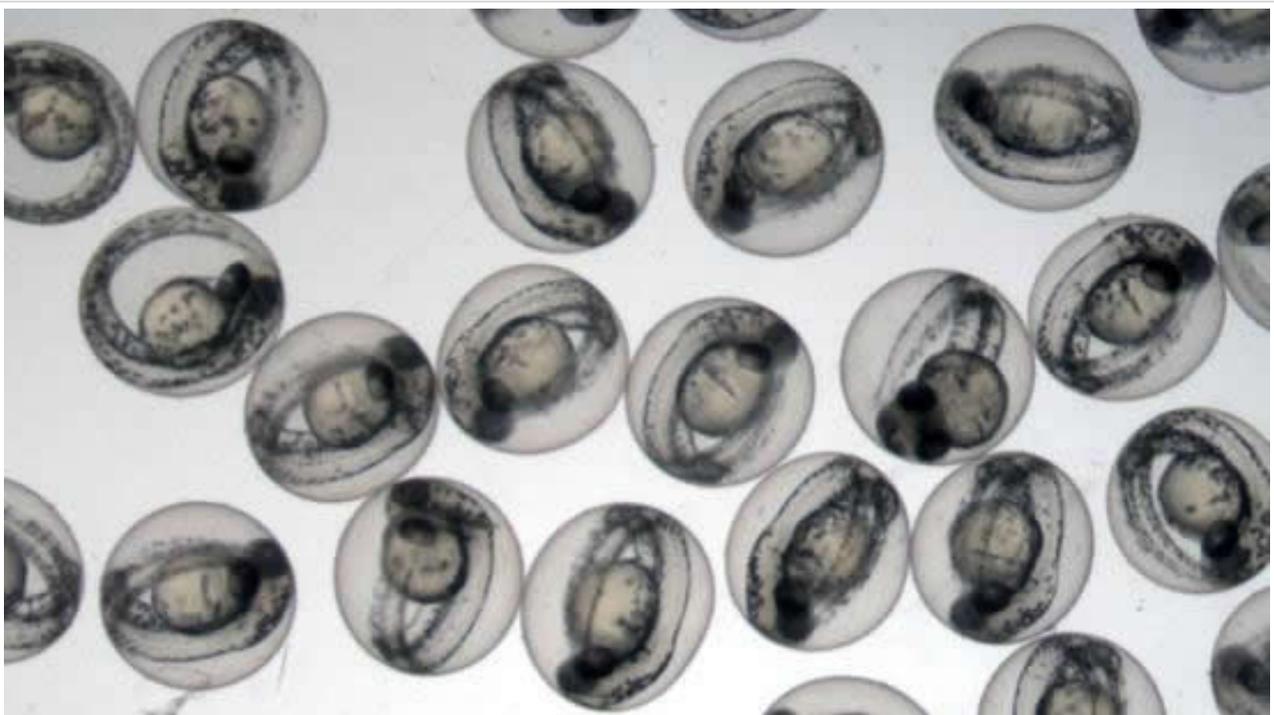


Fig. 3 - Embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*). Fonte: Link ([http://www.victorialabalme.com/communication\\_and\\_presentation\\_skills/?p=37](http://www.victorialabalme.com/communication_and_presentation_skills/?p=37))

(uploads/artigos/201/3.jpg)

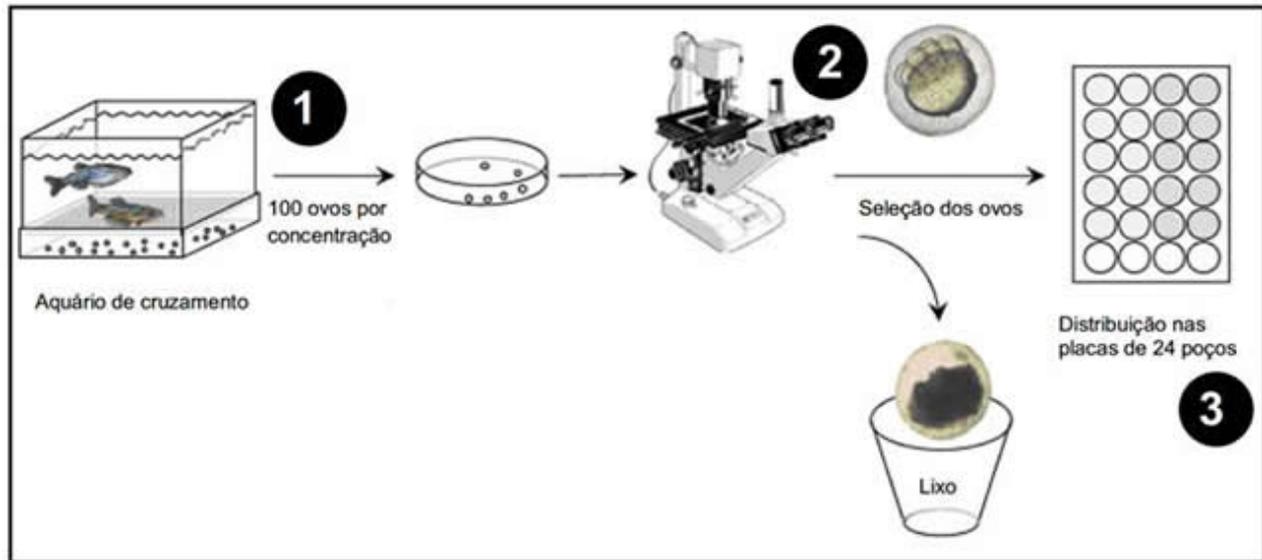


Fig. 4 - Esquema do teste de toxicidade com embriões de peixe-zebra. (1) coleta dos ovos dos aquários de cruzamento; (2) seleção dos ovos viáveis e descarte dos defeituosos; (3) distribuição dos ovos em placas de 24 poços\*.

(uploads/artigos/201/4.jpg)

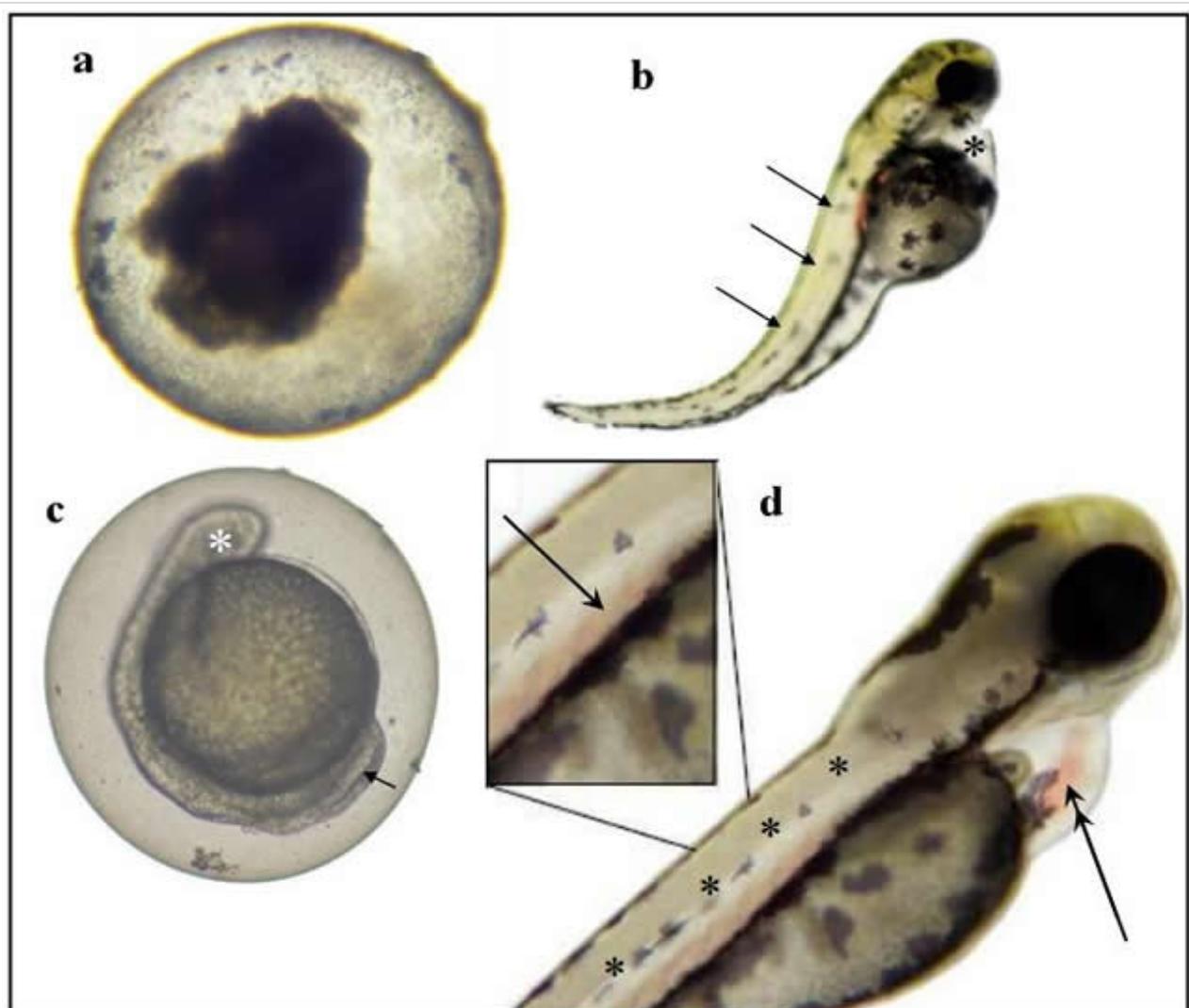


Fig. 5 - Endpoints letais para o teste FET com peixe-zebra. a) coagulação do embrião; b) ausência de somitos e presença de edema cardíaco; c) ausência de separação entre o pedúnculo caudal e o saco vitelínico, e (d) ausência de batimentos cardíacos

(uploads/artigos/201/5.jpg)