



Zebrafish - a successful model in biomedical research



Joana Monteiro

Fish Platform at Champalimaud Foundation

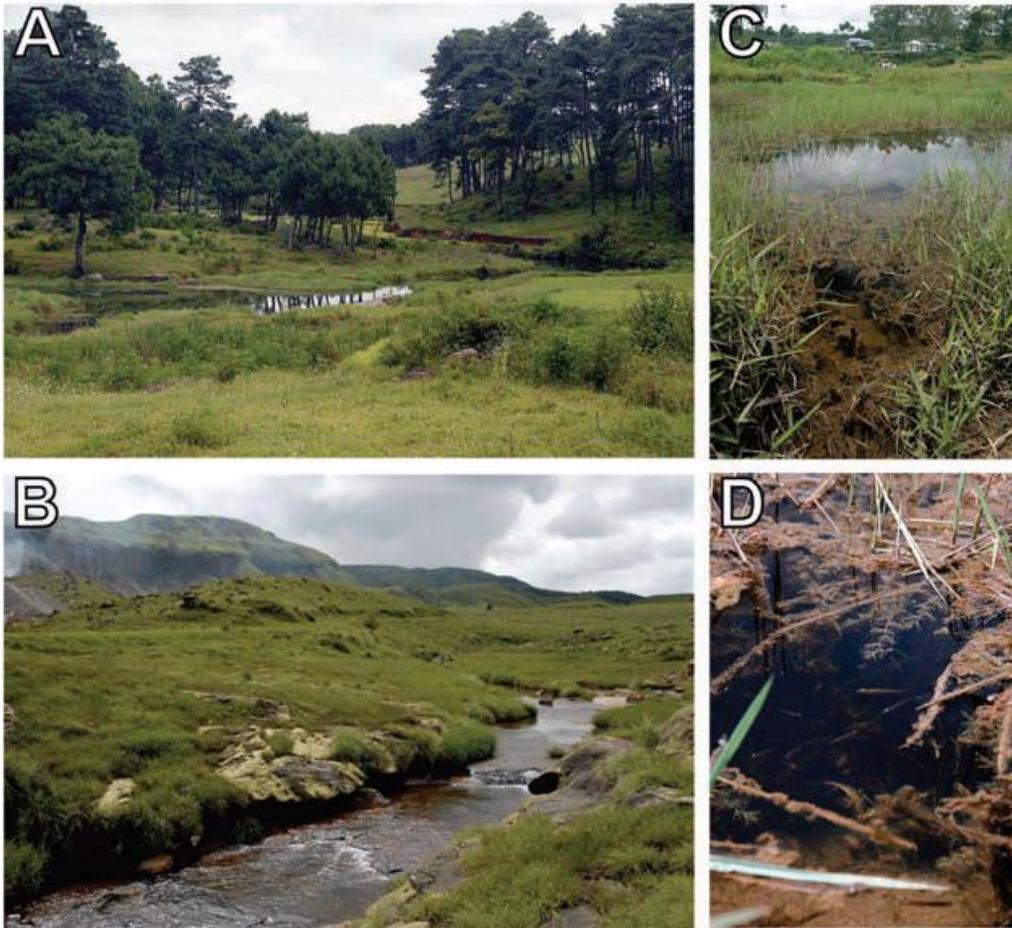
[Email: joana.monteiro@research.fchampalimaud.org](mailto:joana.monteiro@research.fchampalimaud.org)

O meu nome é Zebra, Peixe-zebra

- *Danio rerio*
- ~3-4 cm
- Cardumes
- Origem: Sul da Ásia (India, Bangladesh)
- Cursos de água doce com pouca corrente
- e pouca profundidade
- Muito tolerantes a diferentes condições ambientais (T°C, salinidade)
- Omnivoros (zoo/fitoplancton, insectos, crustaceos)



Habitat natural do peixe-zebra



Habitat natural do peixe-zebra

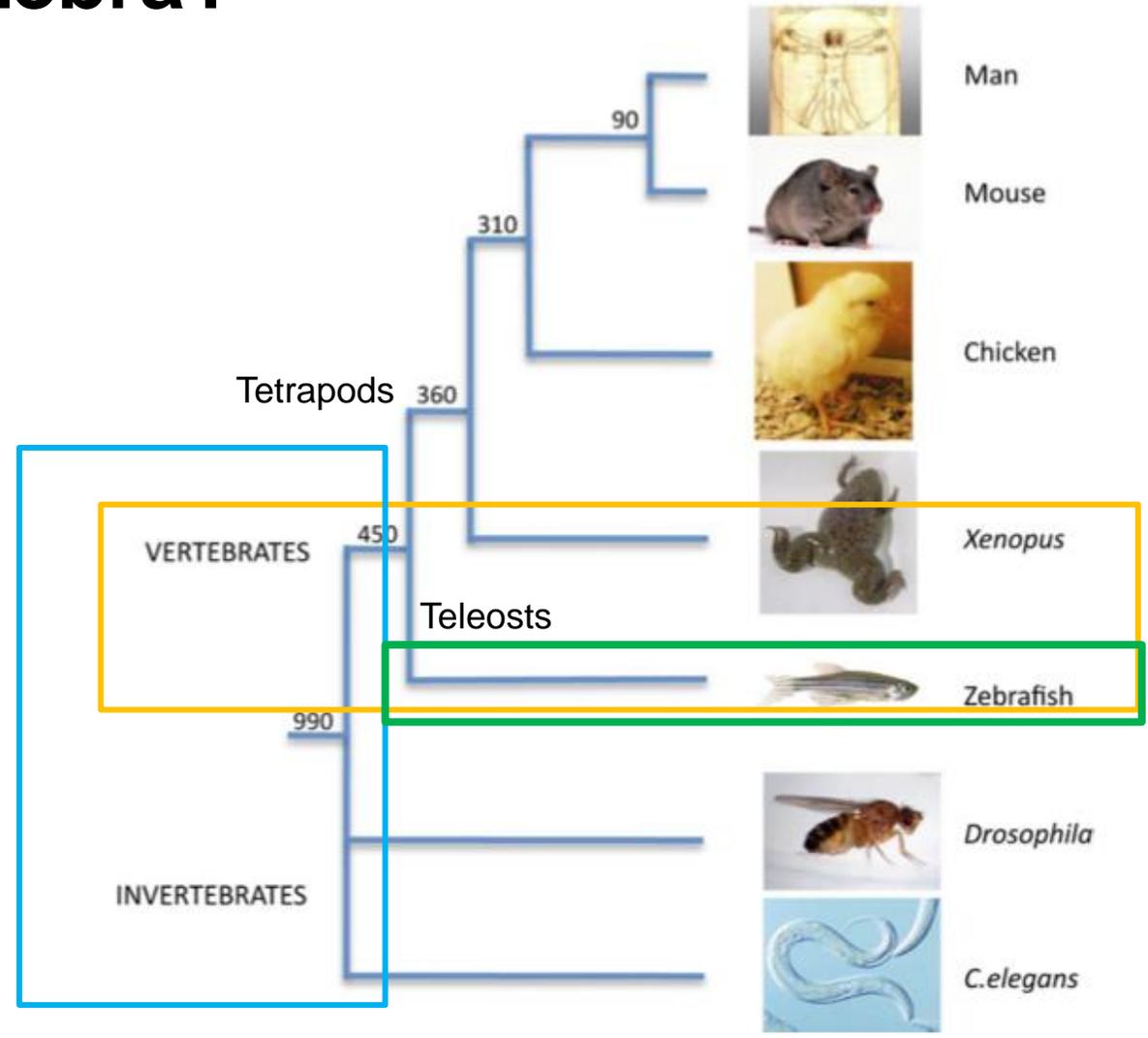
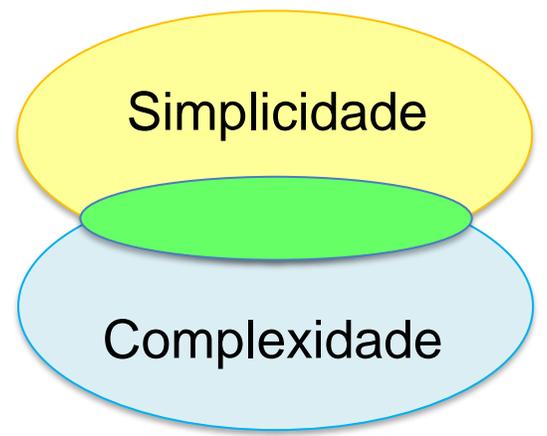


Video available at: <https://vimeo.com/200660695>

“Habitat” do peixe-zebra em cativeiro



Porquê o peixe-zebra?

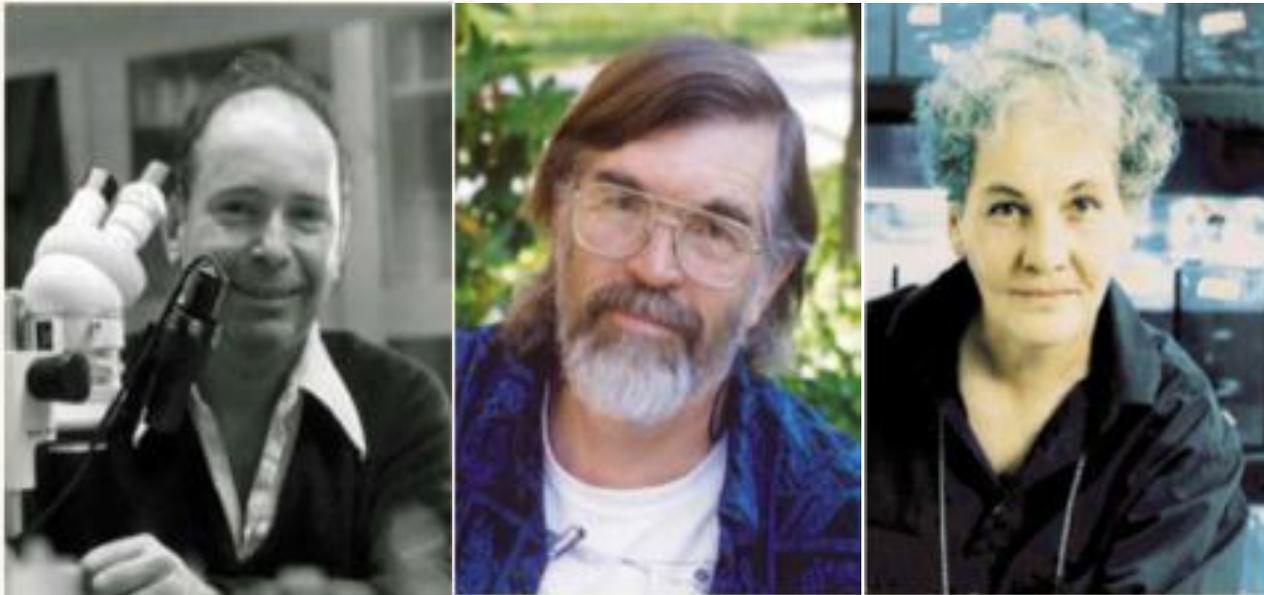


Porquê o peixe-zebra?



1. Pequeno tamanho & schooling
 2. Ciclo de vida curto
 3. Rapido desenvolvimento embrionário
 4. Facil reprodução em cativeiro
 5. Fertilização externa
 6. Embriões ópticamente transparentes
 7. (Atualmente: muitas ferramentas celulares, moleculares, genéticas disponíveis)
- Screens em grande escala (geneticos, quimicos)**
- Imagiologia de alta qualidade, simples e pouco invasiva**

Os Pioneiros



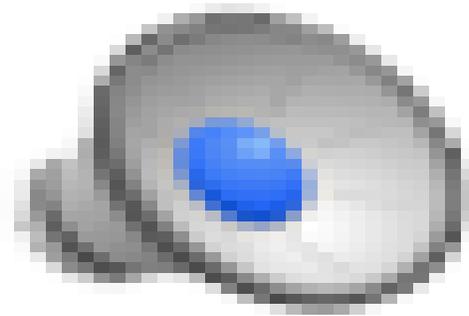
Streisinger, G.

Kimmel, C.B.

Nüsslein-Vollhard, C.

- 1960's: da loja de animais para o laboratório:
1ª colónia laboratorial de peixe-zebra
- Mais de 100 publicações
- **Ferramentas e Protocolos**
 - ✓ Transplantação de células
 - ✓ Clonagem (1º clone vertebrado)
 - ✓ Produção das primeiras linhas estáveis de mutantes sem identificação genética

Biologia do Desenvolvimento – O advento do modelo peixe-zebra



[Video available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134005.s005](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134005.s005)

Manutenção em cativeiro fácil
e económica

Desenv. embrionário rápido e
visível de forma não invasiva



Estudo de comportamento celular

Formação de tecidos

Organização de tecidos: órgãos,
sistemas, organismos funcionais

Biologia do Desenvolvimento – O advento do modelo peixe-zebra



Desenvolvimento do cérebro:
<https://www.youtube.com/watch?v=C2q3Dqv9PEA>

Manutenção em cativeiro fácil e económica

Desenv. embrionário rápido e visível de forma não invasiva

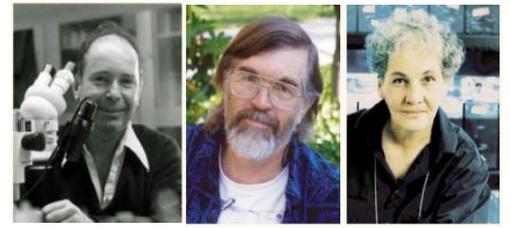


Estudo de comportamento celular

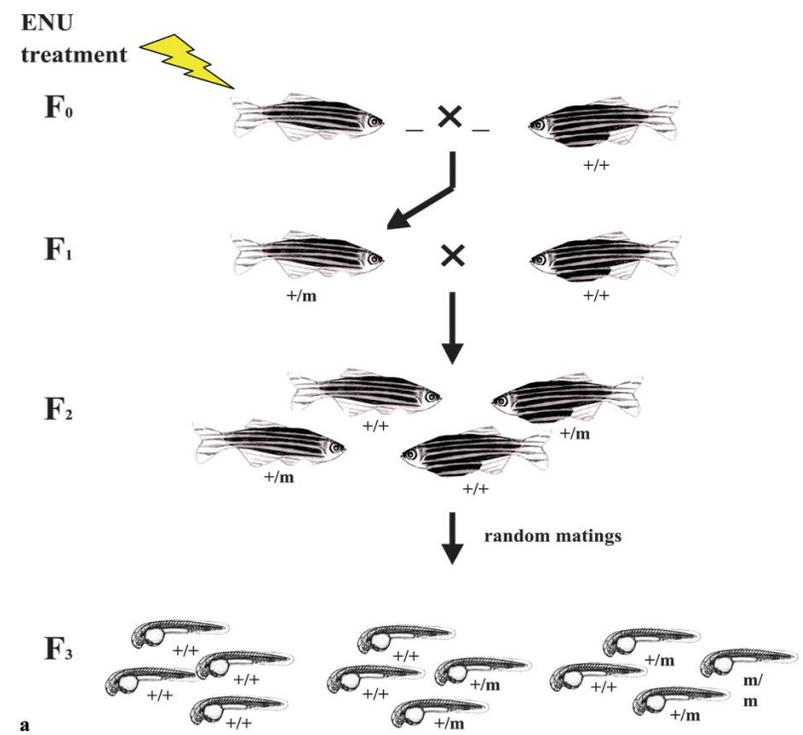
Formação de tecidos

Organização de tecidos: órgãos, sistemas, organismos funcionais

Os Pioneiros - *Ferramentas e Protocolos*



1. Mutagenese em Larga Escala



i) Exposição a agentes altamente mutagénicos (**UV**, **ENU** (N-etil-N-nitrosourea), **retrovirus** (em embriões))



ii) Introdução de mutações pontuais aleatórias na linha germinativa

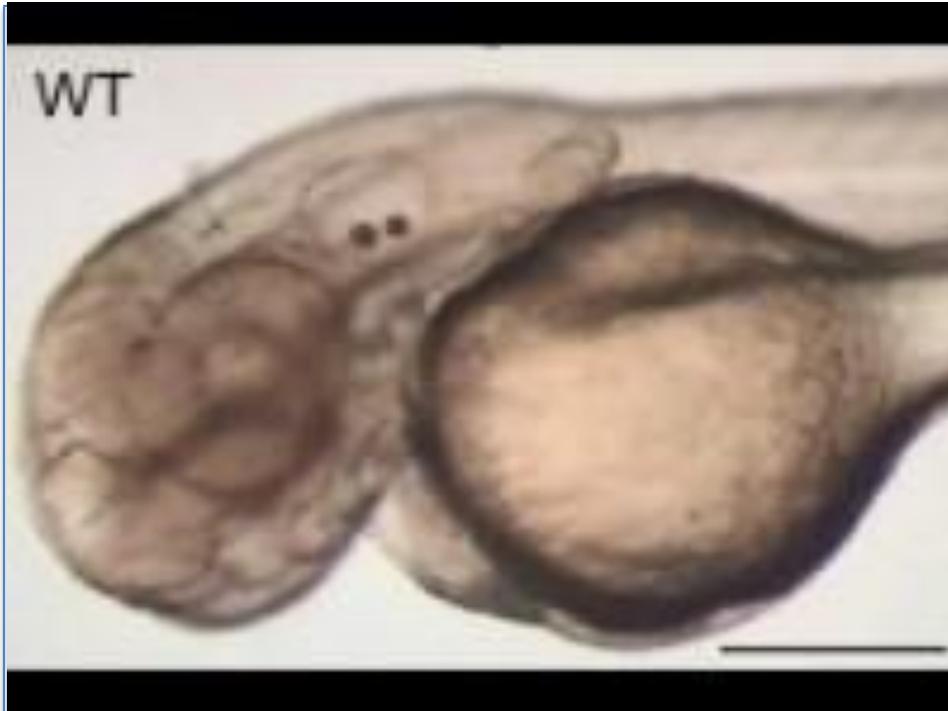


iii) Cruzamentos com peixes do género oposto



iv) Centenas de embriões, portadores de mutações

2. Análise de fenótipo



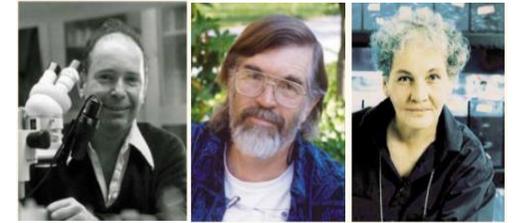
Normal heart beat:

<https://www.youtube.com/watch?v=w6AjrBJaOKQ>

Defective heart beat:

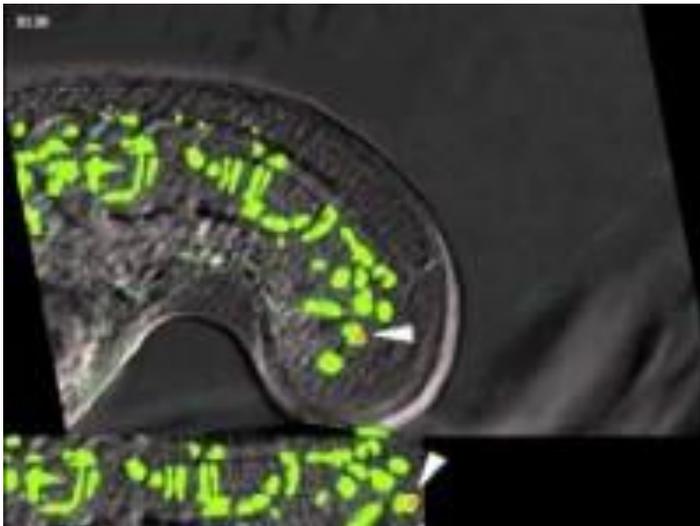
<https://www.exploratorium.edu/video/zebrafis-h-mutant-heart>

Os Pioneiros - *Ferramentas e Protocolos*



1. Mutagenese em Larga Escala

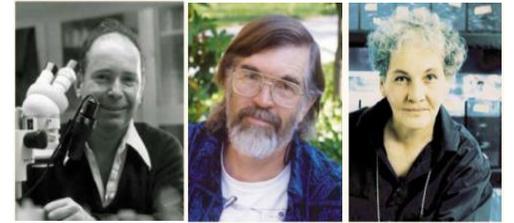
2. **Análise de fenótipo**
- i) Clonagem: metodos de reprodução para conservação dos fenótipos ao longo das gerações (eg. ginogenese, cruzamentos e selecção de progenia



ii) *Fate mapping e cell lineage tracing*

- Injecção intracelular de marcadores rastreáveis
- Acompanhar movimentos, restrição de linhagem, diferenciação

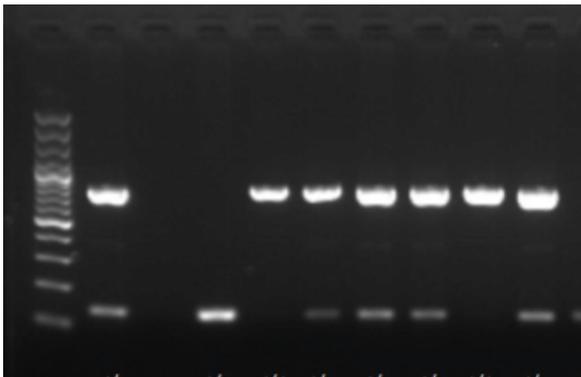
Os Pioneiros - *Ferramentas e Protocolos*



1. Mutagenese em Larga Escala

2. Análise de fenótipo

3. Análise genética
- i) Clonagem posicional, aplicável a mutações cuja herança seja rastreável , c/ ou s/ conhecimento do gene/ via de sinalização envolvida.



- Identificação de segmentos de ADNs candidatos
- Isolar clones com o mesmo marcador, a partir de bibliotecas genómicas
- Identificar o gene nessa região - Eg. sequenciação

Whole-genome sequencing



Caracterização de processos “normais - interações celulares, organogénese

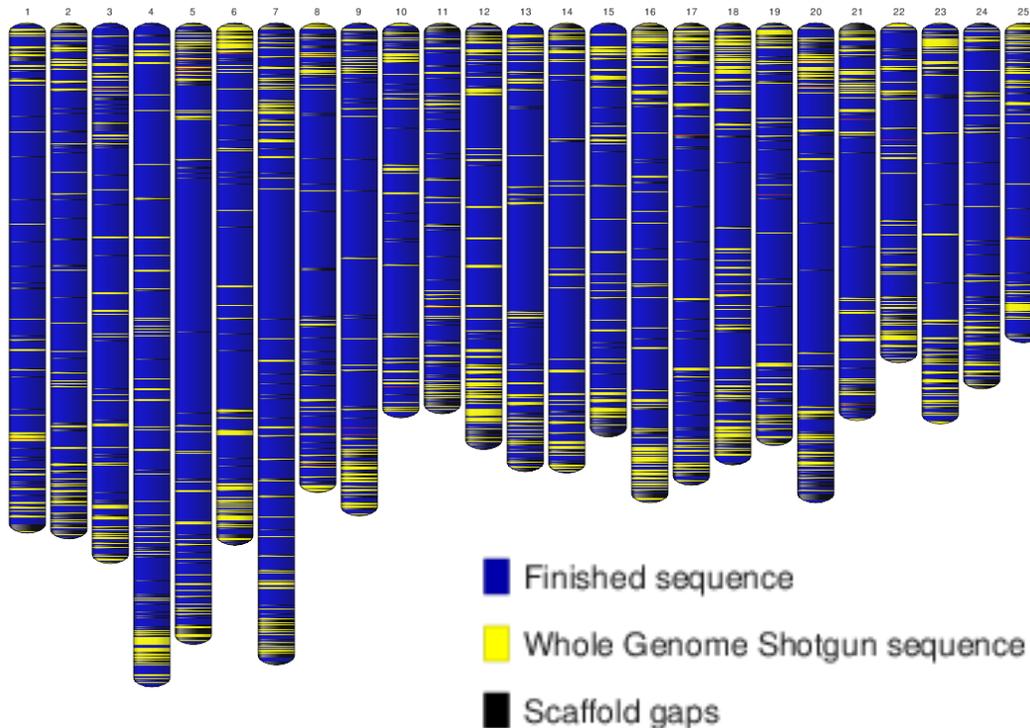
Identificação e caracterização de genes e de interações genéticas e celulares envolvidas no desenvolvimento e comportamento

1988: Westerfield lab – DNA exógeno pode ser integrado no genoma e transmitido pela linha germinativa.

1997_ Lin lab, 1ª linha transgénica com expressão GFP associada a tipos de células definitos.

2001: Huang et al, 1º transgénico relevante: *Tg(insulin:GFP)*

Sequenciação do Genoma do Peixe-zebra



- Primeira colecção de referência do genoma complete do peixe-zebra (2002)
- 25 cromossomas
- Ausência de cromossomas sexuais
- Duplicação genómica natural, usada como ferramenta genética
- 12 cromossomas ancestrais, conservados em todos os vertebrados

<https://www.sanger.ac.uk/science/data/zebrafish-genome-project>

https://www.ensembl.org/Danio_reio/Info/Annotation

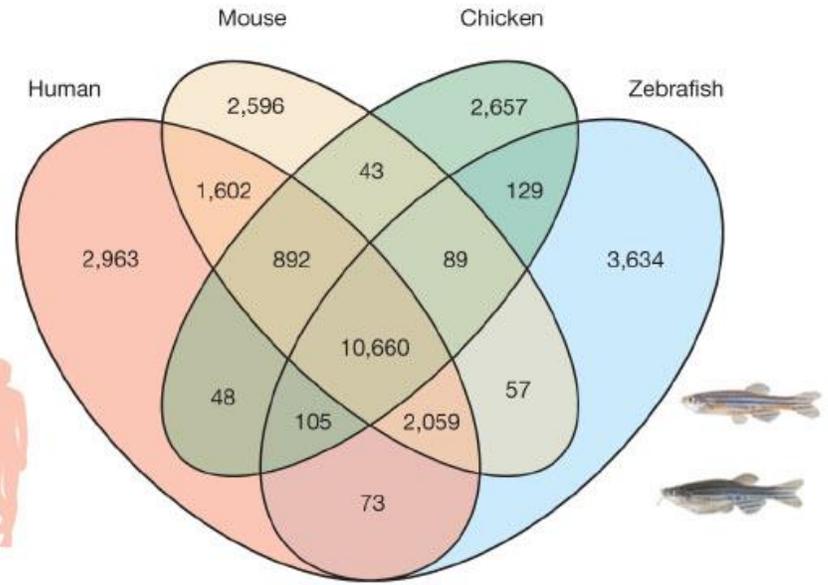
LETTER

2013
OPEN

doi:10.1038/nature12111

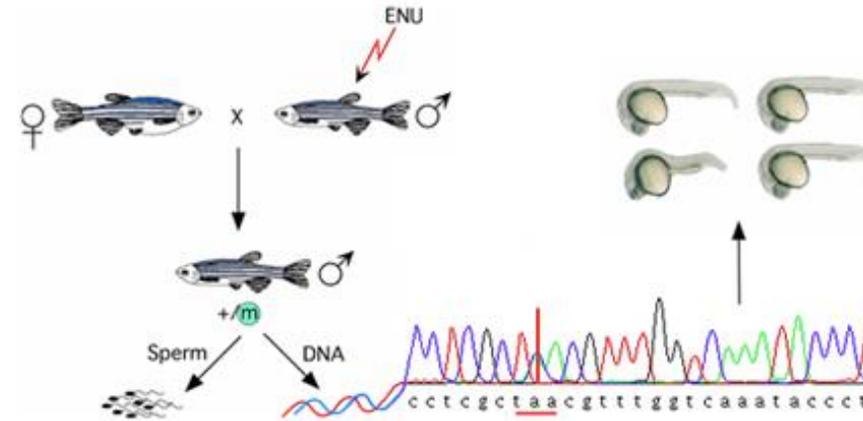
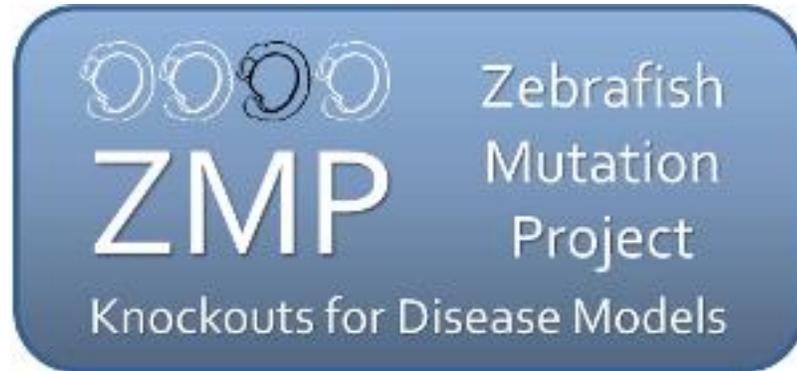
The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome

Kerstin Howe^{1*}, Matthew D. Clark^{1,2*}, Carlos F. Torroja^{1,3}, James Torrance¹, Camille Berthelot^{4,5,6}, Matthieu Muffato⁷, John E. Collins¹, Sean Humphray^{1,8}, Karen McLaren¹, Lucy Matthews¹, Stuart McLaren¹, Ian Sealy¹, Mario Caccamo², Carol Churcher¹, Carol Scott¹, Jeffrey C. Barrett¹, Romke Koch⁹, Gerd-Jörg Rauch¹⁰, Simon White¹, William Chow¹, Britt Kilian¹, Leonor T. Quintais⁷, José A. Guerra-Assunção⁷, Yi Zhou¹¹, Yong Gu¹, Jennifer Yen¹, Jan-Hinnerk Vogel¹, Tina Eyre¹, Seth Redmond¹, Ruby Banerjee¹, Jianxiang Chi¹, Beiyuan Fu¹, Elizabeth Langley¹, Sean F. Maguire¹, Gavin K. Laird¹, David Lloyd¹, Emma Kenyon¹, Sarah Donaldson¹, Harminder Sehra¹, Jeff Almeida-King¹, Jane Loveland¹, Stephen Trevanion¹, Matt Jones¹, Mike Quail¹, Dave Willey¹, Adrienne Hunt¹, John Burton¹, Sarah Sims¹, Kirsten McLay¹, Bob Plumb¹, Joy Davis¹, Chris Clew¹, Karen Oliver¹, Richard Clark¹, Clare Riddle¹, David Elliot¹, Glen Threadgold¹, Glenn Harden¹, Darren Ware¹, Sharmin Begum¹, Beverley Mortimore¹, Giselle Kerry¹, Paul Heath¹, Benjamin Phillimore¹, Alan Tracey¹, Nicole Corby¹, Matthew Dunn¹, Christopher Johnson¹, Jonathan Wood¹, Susan Clark¹, Sarah Pelan¹, Guy Griffiths¹, Michelle Smith¹, Rebecca Glithero¹, Philip Howden¹, Nicholas Barker¹, Christine Lloyd¹, Christopher Stevens¹, Joanna Harley¹, Karen Holt¹, Georgios Panagiotidis¹, Jamieson Lovell¹, Helen Beasley¹, Carl Henderson¹, Daria Gordon¹, Katherine Auger¹, Deborah Wright¹, Joanna Collins¹, Claire Raisen¹, Lauren Dyer¹, Kenric Leung¹, Lauren Robertson¹, Kirsty Ambridge¹, Daniel Leongamornlert¹, Sarah McGuire¹, Ruth Gildertorph¹, Coline Griffiths¹, Deepa Manthravadi¹, Sarah Nichol¹, Gary Barker¹, Siobhan Whitehead¹, Michael Kay¹, Jacqueline Brown¹, Clare Murnane¹, Emma Gray¹, Matthew Humphries¹, Neil Sycamore¹, Darren Barker¹, David Saunders¹, Justene Wallis¹, Anne Babbage¹, Sian Hammond¹, Maryam Mashreghi-Mohammadi¹, Lucy Barr¹, Sancha Martin¹, Paul Wray¹, Andrew Ellington¹, Nicholas Matthews¹, Matthew Ellwood¹, Rebecca Woodmansey¹, Graham Clark¹, James D. Cooper¹, Anthony Tromans¹, Darren Grafham¹, Carl Skuce¹, Richard Pandian¹, Robert Andrews¹, Elliot Harrison¹, Andrew Kimberley¹, Jane Garnett¹, Nigel Fosker¹, Rebekah Hall¹, Patrick Garner¹, Daniel Kelly¹, Christine Bird¹, Sophie Palmer¹, Ines Gehring¹⁰, Andrea Berger¹⁰, Christopher M. Dooley^{10,11}, Zübeyde Ersan-Ürün¹⁰, Cigdem Eser¹⁰, Horst Geiger¹⁰, Maria Geisler¹⁰, Lena Karotki¹⁰, Anette Kirm¹⁰, Judith Konantz¹⁰, Martina Konantz¹⁰, Martina Oberländer¹⁰, Silke Rudolph-Geiger¹⁰, Mathias Teucke¹⁰, Christa Lanz¹⁰, Günter Raddatz¹⁰, Kazutoyo Osoegawa¹², Baoli Zhu¹², Amanda Rapp¹³, Sara Widaa¹, Cordelia Langford¹, Fengtang Yang¹, Stephan C. Schuster¹⁰, Nigel P. Carter¹, Jennifer Harrow¹, Zemin Ning¹, Javier Herrero⁷, Steve M. J. Searle¹, Anton Enright¹, Robert Geisler^{10,14}, Ronald H. A. Plasterk⁹, Charles Lee¹⁵, Monte Westerfield¹³, Pieter J. de Jong¹², Leonard I. Zon¹¹, John H. Postlethwait¹³, Christiane Nüsslein-Volhard¹⁰, Tim J. P. Hubbard¹, Hugues Roest Crolius^{4,5,6}, Jane Rogers^{1,2} & Derek L. Stemple¹



- >26.000 genes *protein-coding*
- ~ 70% genes humanos têm ≥1 ortólogo px-zebra (84% dos genes associados a doença)
- Peixe-zebra: modelo biomédico para estudo de alterações ao genoma humano associadas a doença

ZF Mutation Project – Sanger Institute



Objectivo:

Peixes knockout p/ todos alelos de genes codificadores em px-zebra; disponibilizar à comunidade (ZIRC, EZRC)

Método:

1. Mutagénese em larga escala
2. Selecção de fenótipos
3. Sequenciação e cruzamentos

Resultados até agora:

- 37.624 alelos em 753 genes.
- 17.882 alelos (530 genes) disponíveis



Abordagens *reverse genetics* para geração de peixes-modelo

Princípio: Interferir com a expressão normal de um gene com sequencia conhecida e função/ expressão desconhecida → análise fenotípica → caracterização espaço-temporal, funcional

**Caracterização da expressão,
Integração aleatória**

Cre-LoxP, Gal4/UAS, Q system
+ Tol2 transposase, BAC



Marcação de genes
com fluoróforos

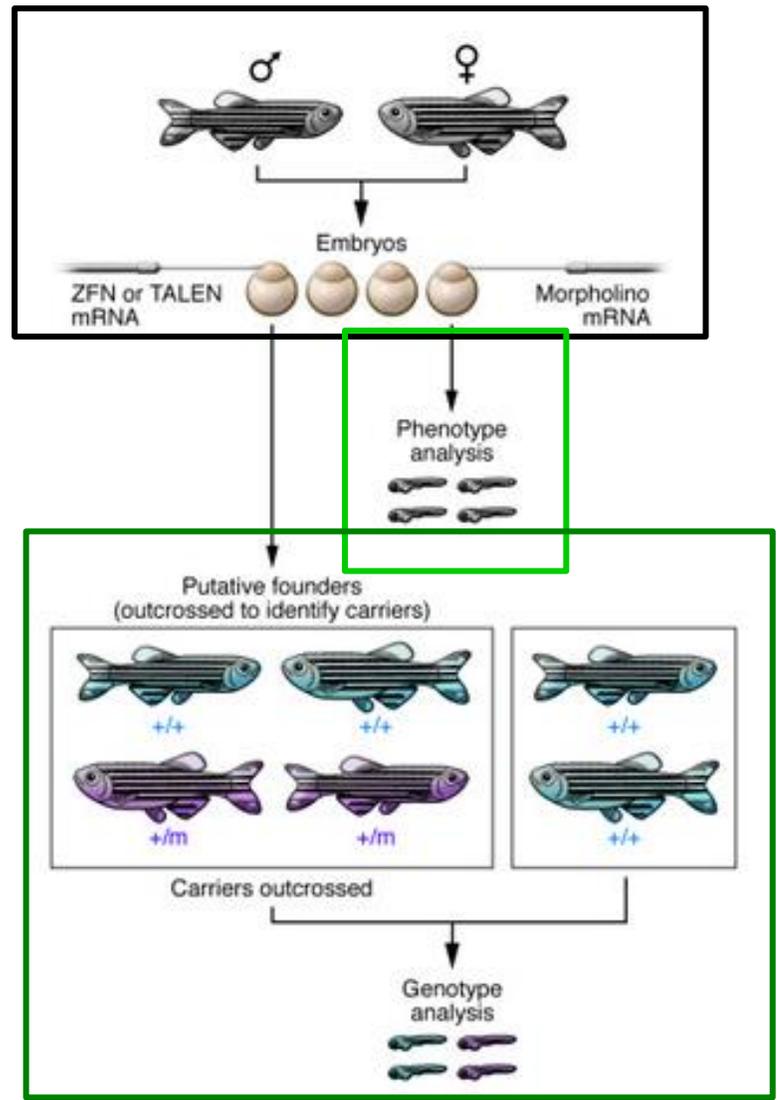
**Gene knockdown/ knockout/
knockin
Edição genómica dirigida**

- Morfolinos
- Zn-fingers
- TALENs
- CRISPR-Cas



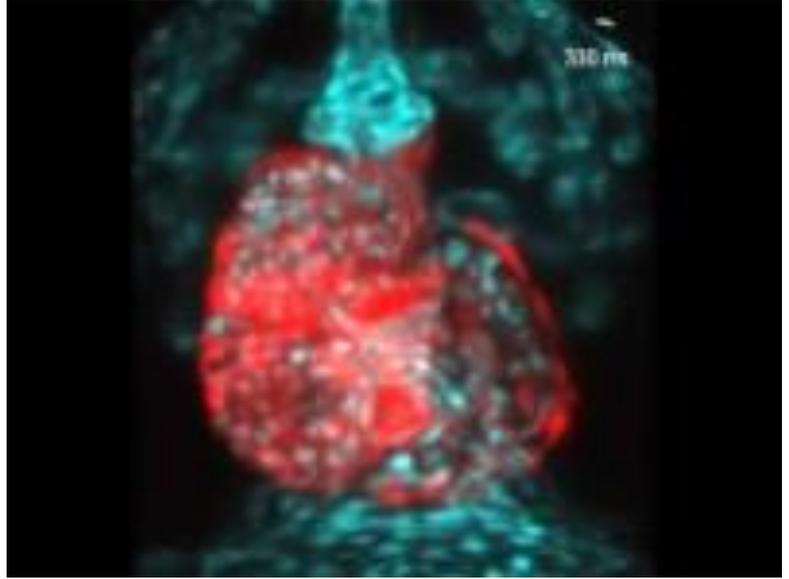
Efeito temporário

Efeito estável ao longo de
gerações

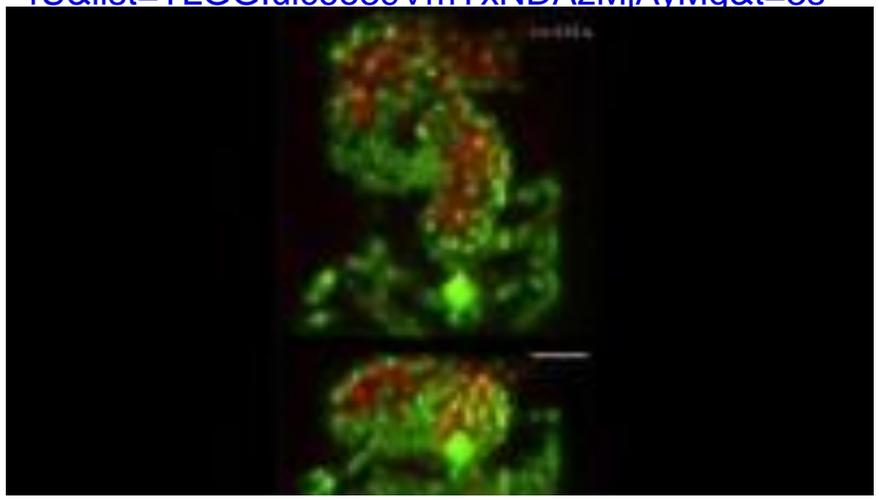


1. Cruzamentos (reprodução)
2. Injecção dos componentes moleculares em embriões em fase de 1 célula.
- 3a) Analise de fenótipo no embrião
E/Ou
- 3b) Manutenção progenia até adultos
4. Várias rondas de novos cruzamentos e selecção de positivos
5. Geração de linhas mutantes/ trangénicas estáveis

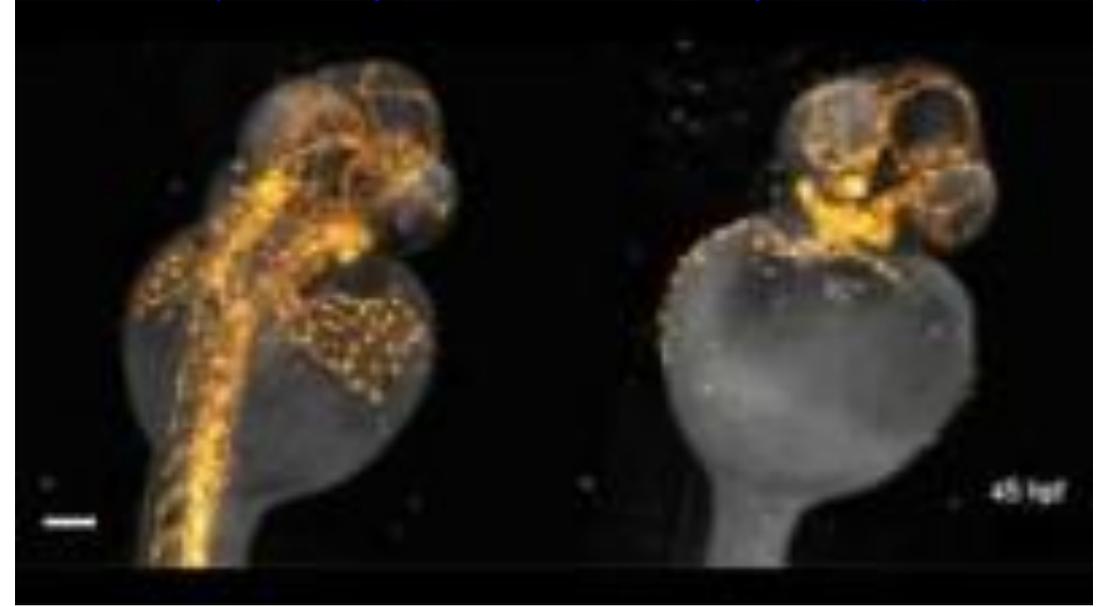
V1. <https://www.youtube.com/watch?v=LbG7vPKIAN0&t=16s>



V2. <https://www.youtube.com/watch?v=keRfCD6Dq4U&list=TLGGluic6e39VmYxNDAzMjAvMg&t=3s>



V3. <https://www.youtube.com/watch?v=yk7TWOtrpM>



V1. Batimento cardíaco, miocárdio (Vermelho), endocárdio e vasos (azul)

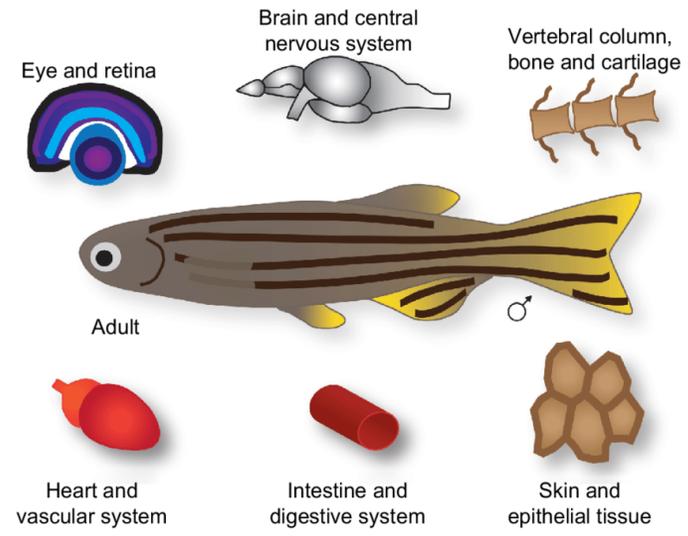
V2. Fluxo sanguíneo no coração de um embrião

V3. Desenvolvimento 16h-2 dias com resolução single-cell (vasos geneticamente marcados com fluoroforo)

Uma espécie, múltiplos modelos

Modelos de funcionamento básico:

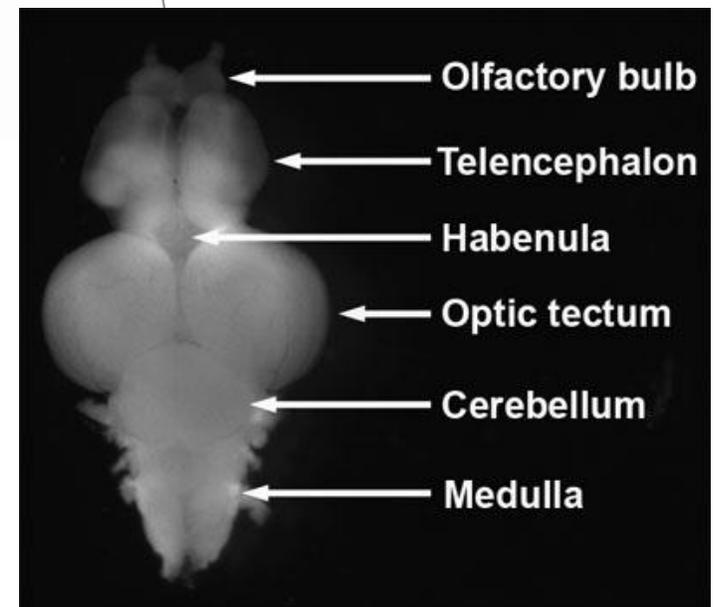
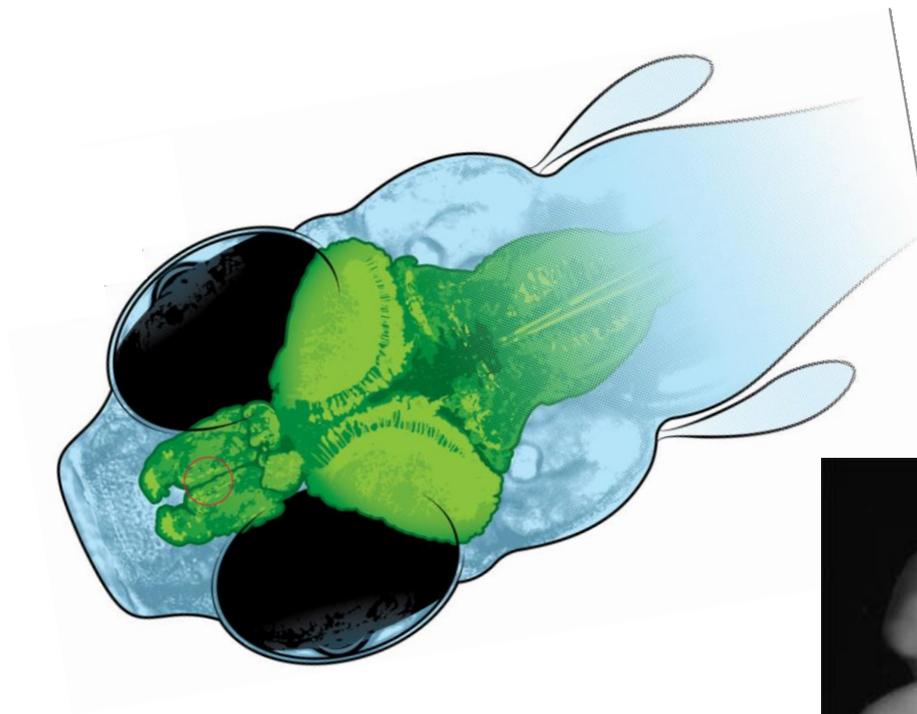
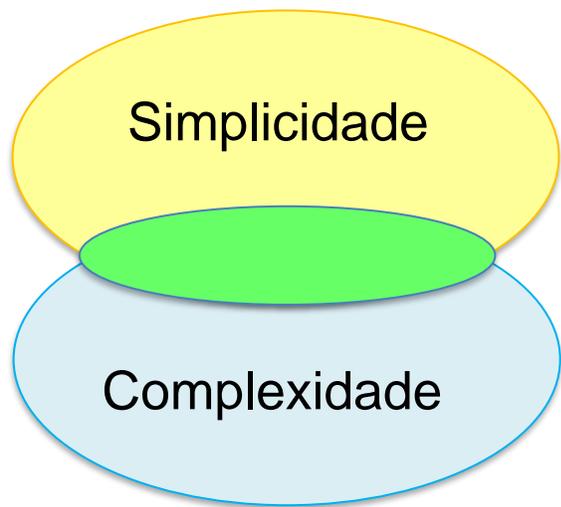
- Neurociencias
- Desenvolvimento
- Genetica
- Biologia celular
- Immunologia
- Epigenetica
- etc



Modelos de Doenças

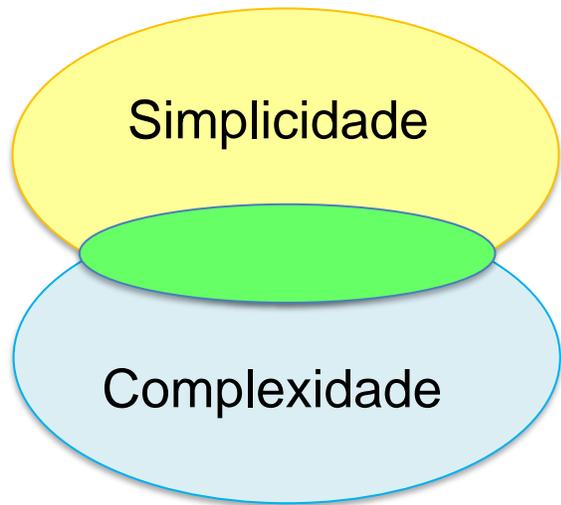
- Oncologia
- Hematopoiese
- Infecção/ Inflamação
- Cardiologia
- Doenças neurológica
- Degeneração óssea
- Psiquiatria
- etc

Peixe-zebra como modelo em neurociências

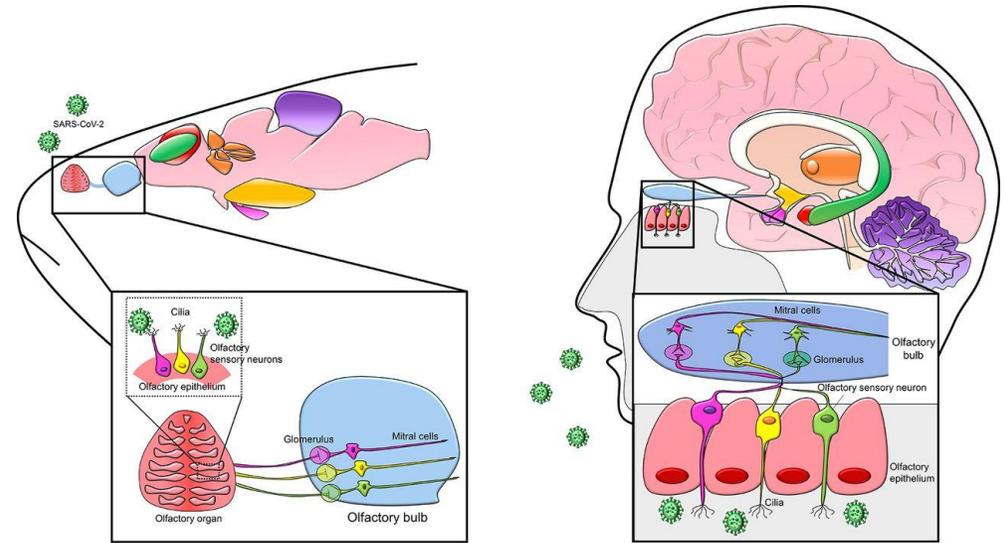


- Px-zebra: 10 million neurónios (100.000 em larvas)
- Humanos: 86 bilhões neurónios

Peixe-zebra como modelo em neurociências



➤ Organização/ morfologia celular, estrutural e funcional holomogas, que afectam comportamentos/ patologias em comum



ZEBRAFISH BRAIN AREAS	HUMAN BRAIN AREAS
 Olfactory bulb	 Olfactory bulb
 Lateral Pallium	 Hippocampus
 Medial Pallium	 Amygdala
 Thalamus	 Thalamus
 Hypothalamus	 Hypothalamus
 Pituitary gland	 Pituitary gland
 Cerebellum	 Cerebellum

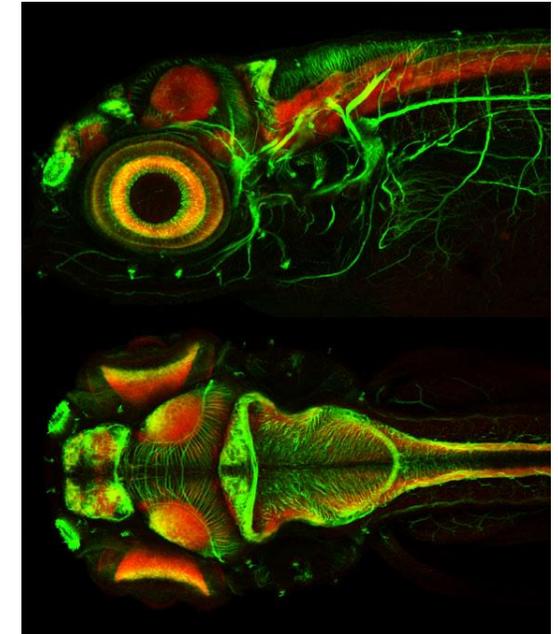
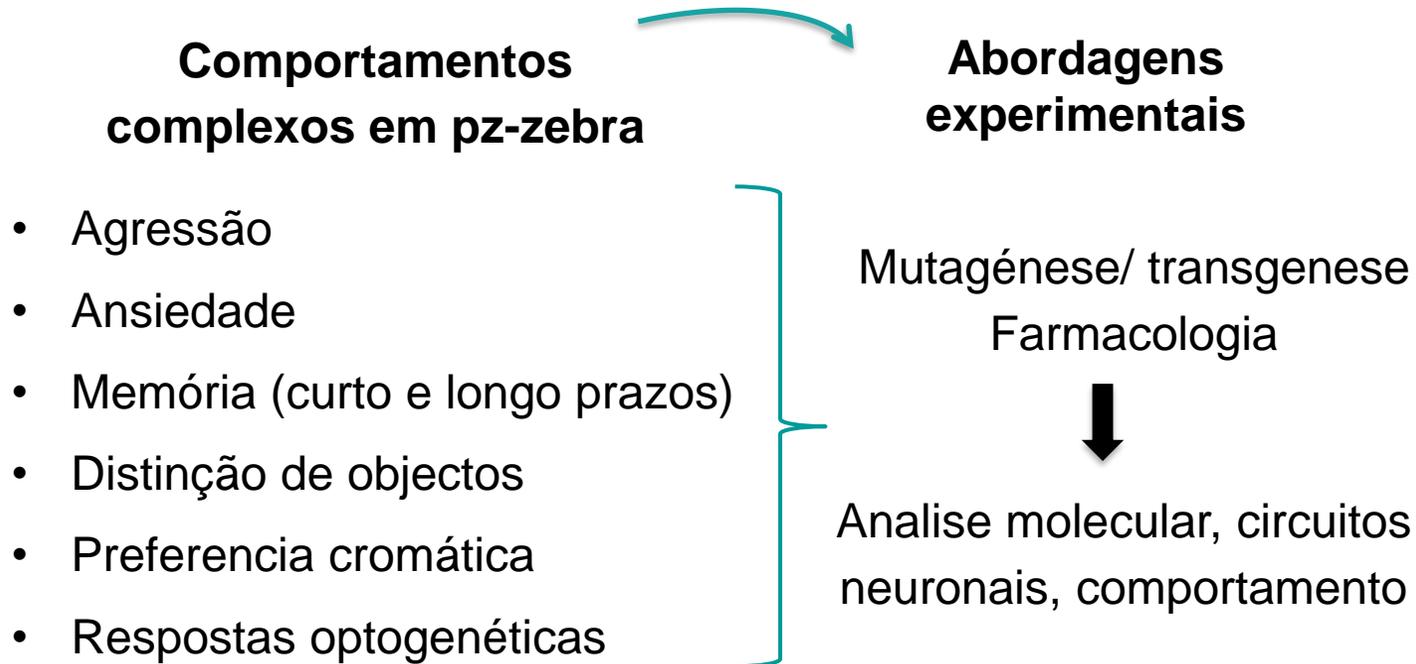
Peixe-zebra como modelo em neurociências

Humanos e peixe-zebra:

- Capacidade de decisão complexa
- Resposta ao stress idêntica (em roedores não!): Cortisol como hormona de stress, activada pelas mesmas cascatas de hormonas hipotalamo-pituitaria e actuam sobre os mesmos receptors glucocorticoides
- Resposta idêntica a agentes farmacológicos
- Muitos genes ortólogos, associados a distúrbios cerebrais



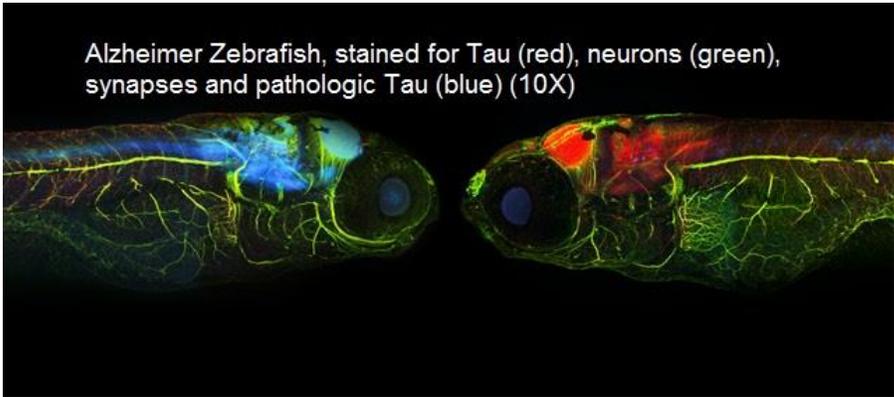
Peixe-zebra como modelo em neurociências



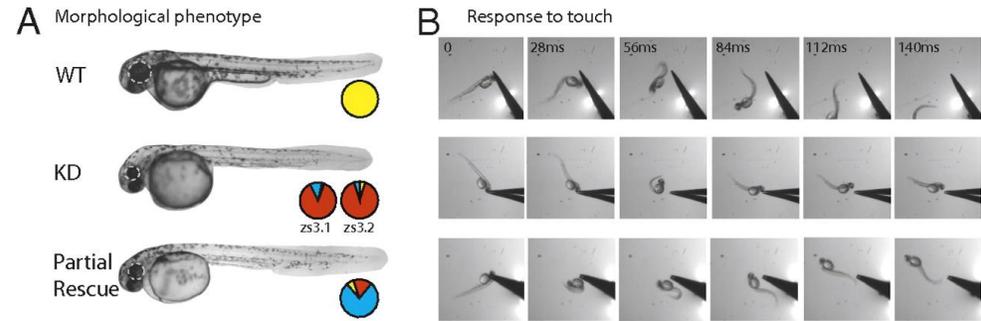
Benefícios:

Conhecimento morfológico e funcional do cérebro humano
Potenciais tratamentos para perturbações psiquiátricas e neurológicas

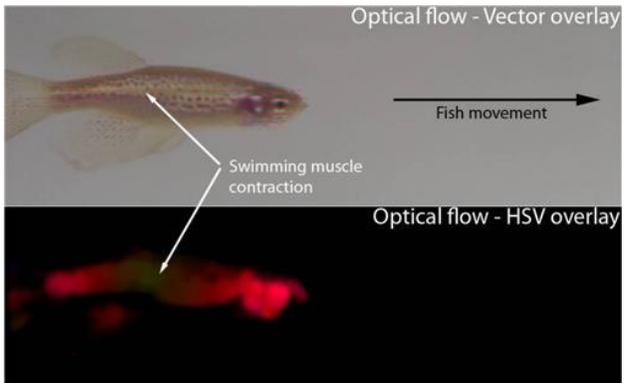
Alzheimer



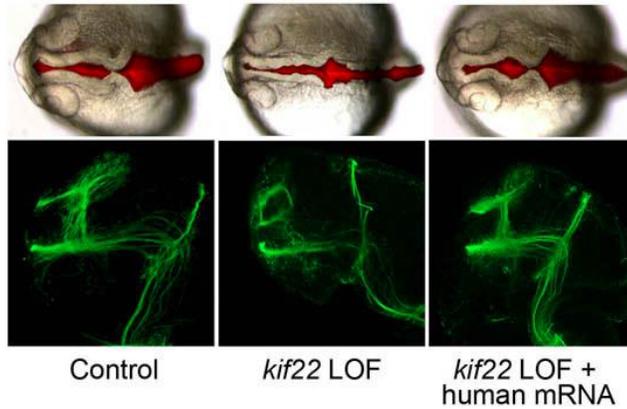
Esquizofrenia



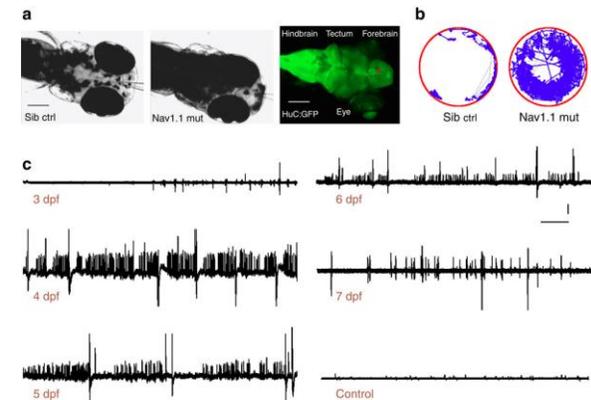
Parkinson



Autismo



Epilepsia



Ferramentas para estudo da actividade neuronal

1. Electrofisiologia



Métodos invasivos (craniotomi - implante de eléctrodos)

Métodos não invasivos (electrodos de superfície)

Células individuais (eg. patch clump)

Actividade geral (whole brain electroencephalogram (EEG))

Actividade no cérebro e notocorda em simultâneo

Medição de actividade neuronal

mediante estímulos apresentados

 Estudos de propensão a convulsões, dor, após determinados estímulos

 Animais imóveis, pouco específicos na informação obtida

Ferramentas para estudo da actividade neuronal

- Actividade neuronal implica aumento dos níveis de cálcio no citoplasma
- Alterações dos níveis de cálcio intracellular indicam a actividade neuronal existente

2. **Dyes sintéticas:**  Moléculas pequenas muito sensíveis e resposta muito rápida

 Métodos de entrega invasivos (electroporação, microinjecção)

 Pouco específicas (a nível celular e subcellular)

 Transientes

3. **GECI** – *Genetically Encoded Ca²⁺ Indicators*:  Monitorização de actividade neuronal *in vivo*

 Visualização de neurónios individuais/ populações

 Expressão estável a longo prazo/ em populações

 Sensibilidade/ rapidez de resposta

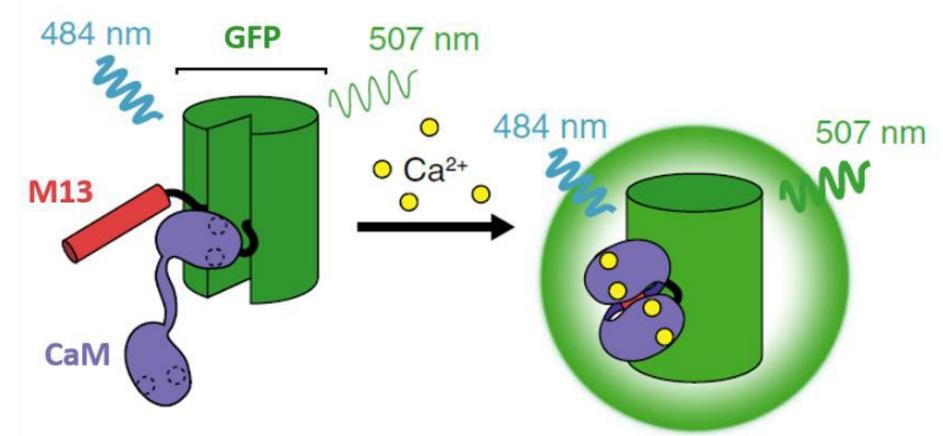
 Intensidade de fluorescência

Genetically Encoded Ca^{2+} Indicators - GCaMP

GCaMP: GFP + CaM (calmodulina) + M13 (peptido da miosina quinase de cadeia leve)

Ausência de Ca^{2+} : GFP protonada,
Fluorescência mínima

- Presença de Ca^{2+} :
1. CaM altera conformação
 2. CaM liga-se ao M13
 3. GFP desprotonada,
Emissão de fluorescência



Genetically Encoded Ca^{+2} Indicators - GCaMP

GCaMP: GFP + CaM (calmodulina) + **M13** (peptido da miosina quinase de cadeia leve)

Variantes GCaMP:

1. Nível base de fluorescência vs Max contraste de nível base/max fluo (*single cells/* populações)
2. Rapidez vs Sensibilidade
 - Slow* (s): + brilhantes, + sensíveis a oscilações Ca^{2+} – detecção de actividade de single cells
 - Fast* (f): - sensíveis; + rápida a reagir - actividade temporal mais precisa.
 - Medium* (m): cinéticas intermédias
3. Proteínas com emissão de fluorescência noutros comprimentos de onda (RFP, YFP, CFP)

Ferramentas para estudo da actividade neuronal

4. **Optogenética:** Controlo e visualização da actividade celular através do uso de luz

Fases para aplicação da optogenética

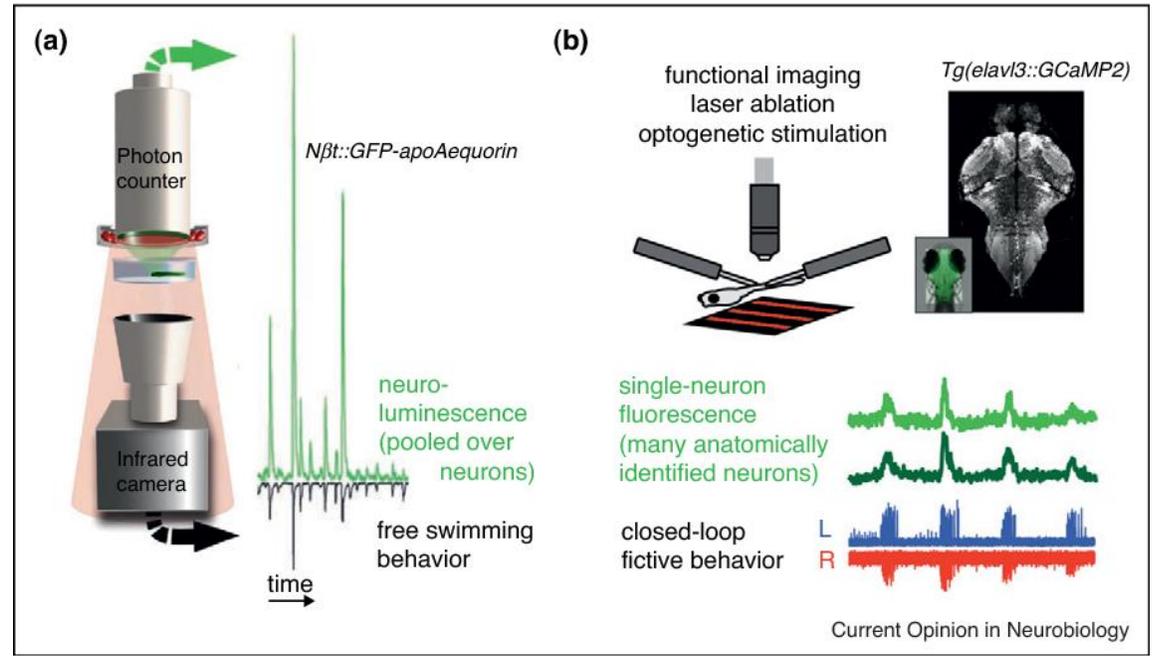
1. Identificação e síntese de uma proteína sensível à luz
2. Criação de animais transgénicos com opsin expressão em gene alvo ou de forma ubíqua
3. Aplicação de luz (comp.de onda adequado), na presença ou não de estímulos comportamentais
4. Recolha e análise de imagens
- 5- Identificação de relações entre células, zonas cerebrias, neurónios-comportamento

Exemplos de opsinas (canais e bombas iónicas, enzimas sensíveis à luz)

- Channelrhodopsins (ChR2, ChR1, VChR1, SFOs): excitação/ inibição neuronal
- Bombas iónicas (halorhodopsin (NpHR), archaerhodopsin (Arch), inibição de active neuronal

Imagiologia e tratamento de imagem

- ✓ Lasers de alta precisão e elevada penetração (precisão do estímulo óptico)
- ✓ Microscopia de alta ampliação e resolução
- ✓ Sistemas de iluminação de elevada penetração/ alcance
- ✓ Câmaras e softwares – aquisição de alta velocidade (aquisição e análise de respostas muito rápidas, mesmo em movimento livre)



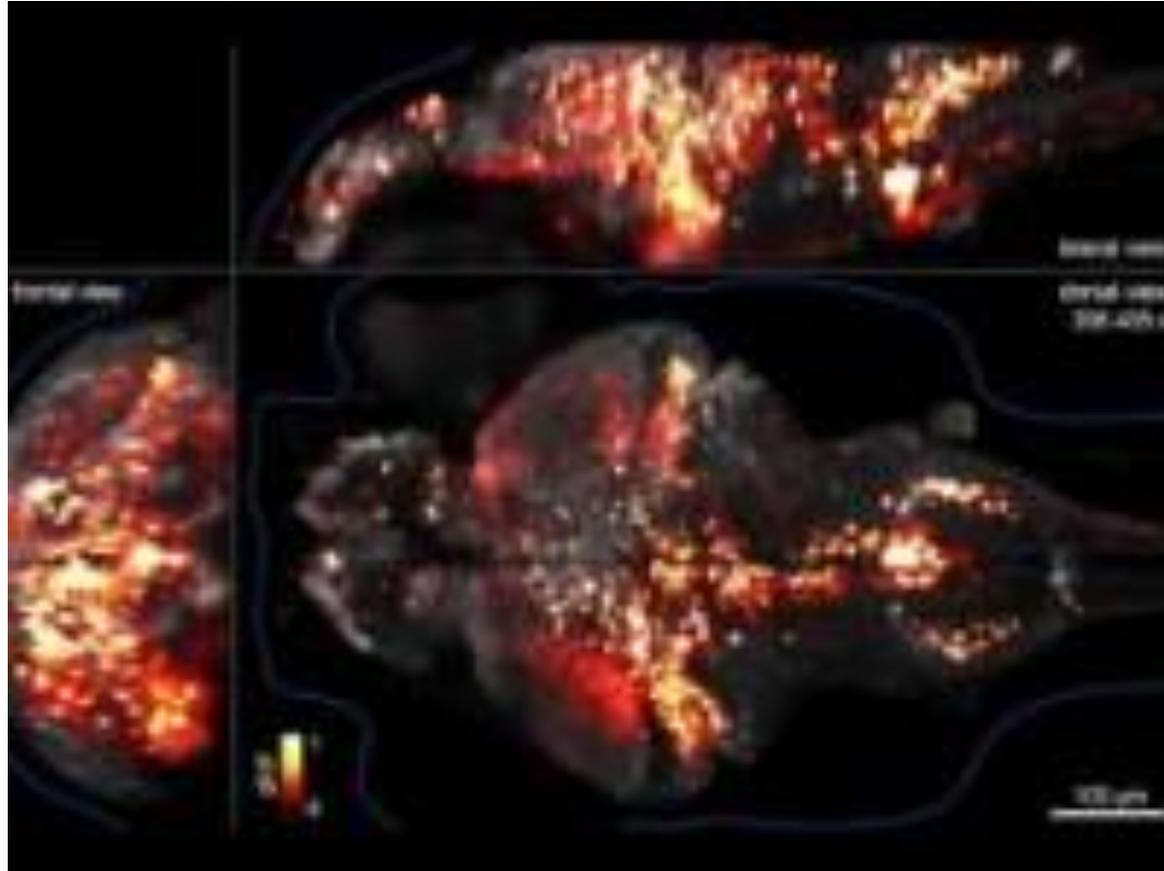
Ferramentas optogenéticas

Video:

Optogenetic Activation of Zebrafish Somatosensory Neurons using ChEF-tdTomato

Link: <https://www.jove.com/v/50184/optogenetic-activation-zebrafish-somatosensory-neurons-using-chef>

Visualização in vivo da actividade neuronal



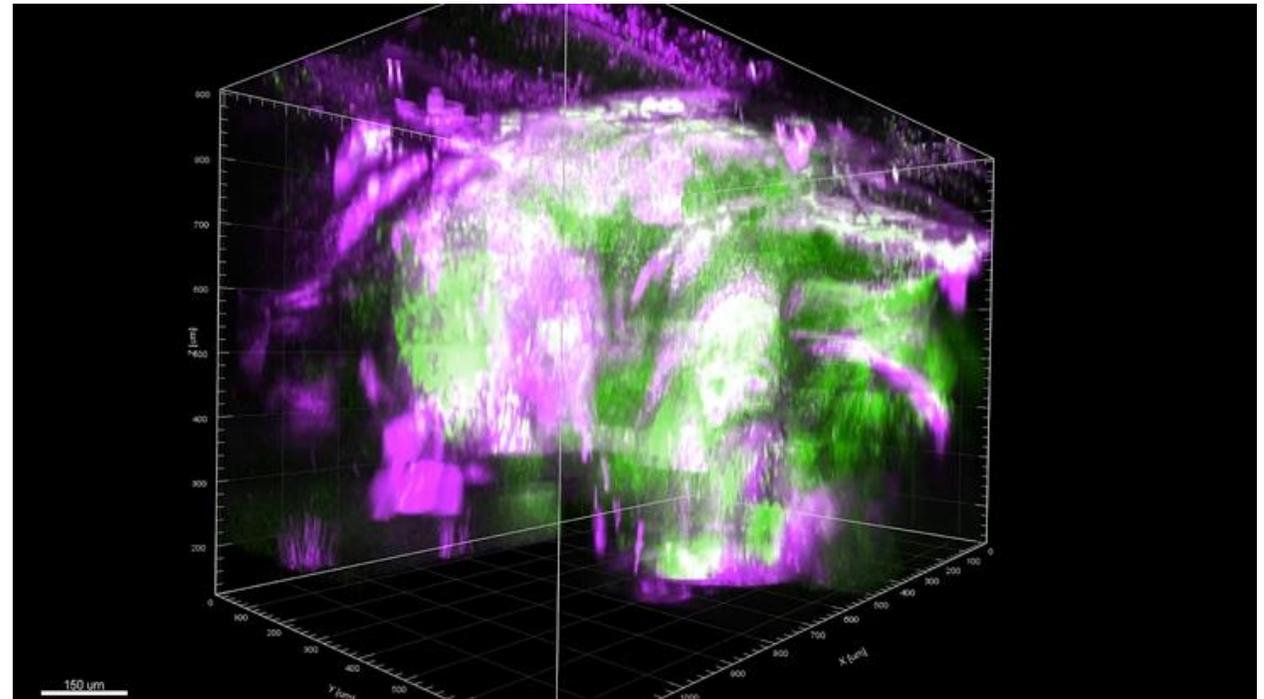
https://www.youtube.com/watch?v=Nxa19uWC_oA

Atlas neuronal

- Mapzebrain
- Zbb
- Z-brain
- ViBE-Z

Registration of different types of data:

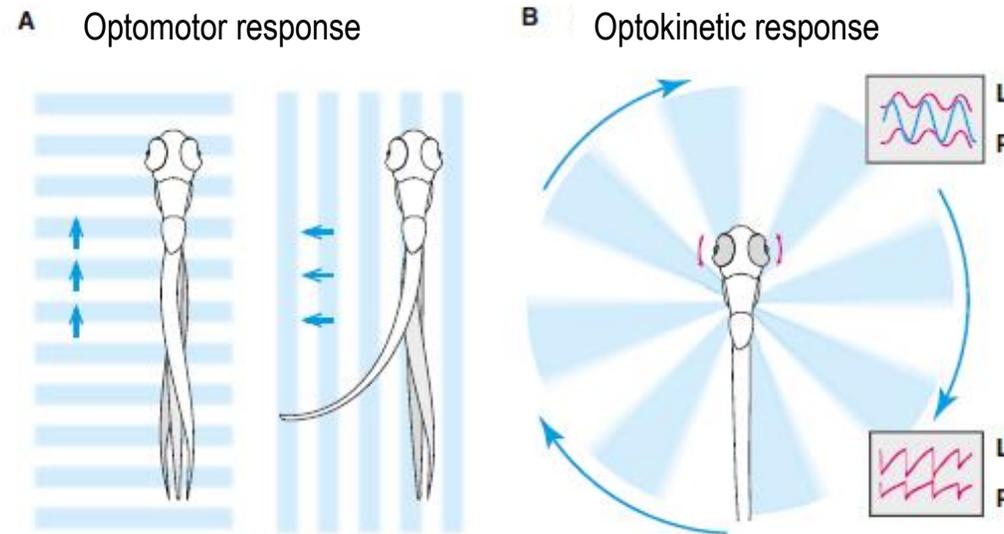
- In vivo/ ex vivo
- Developmental stage
- Anatomical / Funcional / Funcional + molecular-genetic
- Resolution (single cell/ tissue level)



[3D reconstruction of adult zebrafish brain](http://www.cornell.edu/video/new-technique-images-adult-living-zebrafish-brain)
<http://www.cornell.edu/video/new-technique-images-adult-living-zebrafish-brain>

Exemplo prático I: resposta neuro-motora

- Organização neuro-motora – quais os neurónios e regiões do cérebro envolvidas na resposta motora a estímulos visuais
- Movimento dos olhos e respostas motoras a estímulos visuais



Exemplo prático II: comportamento individual/ social



ID tracker

**He's not just a fish.
He's hope.**

