

Il pesce zebra e i suoi usi nella ricerca.

Luca Caneparo, PhD

King' College

London

Lo scorso anno un piccolo pesce originario dei fiumi del sud-est asiatico è salito alla ribalta come uno dei sistemi modello più importanti nella biologia dello sviluppo e riconosciuto come tale dal NIH (National Institute of Health) americano. Il pesce zebra o *Danio rerio* noto anche con il nome inglese zebrafish e fino a pochi anni fa famoso più nei negozi per animali che nei laboratori di ricerca sta assumendo un ruolo sempre più predominante in ambito scientifico, non solo nella ricerca di base, ma anche negli studi comportamentali, nella patogenesi di alcuni batteri (Neely et al., 2002; Prouty et al., 2003), nelle neurodegenerazioni (Taylor et al., 2004; Tomasiewicz et al., 2002), nella ricerca farmaceutica e in particolare nello studio di malattie ereditarie e congenite (Vedere elenco prima di bibliografia) (Ernest et al., 2000);(Bassett and Currie, 2003; Wang et al., 1998). Questo piccolo pesce (2-3 cm di lunghezza in età adulta) ha fatto la sua entrata nella Storia della biologia grazie alla trasparenza dell'embrione, una grande capacità proliferativa, la fecondazione esterna ed un breve intervallo fra una generazione e la successiva. Oltre quanto menzionato in precedenza, la possibilità di indurre mutazioni puntiformi su singoli geni, isolare mutanti e l'uso di tecnologia di biologia cellulare quali il trapianto di cellule e l'eliminazione selettiva di attività geniche specifiche ha permesso il suo utilizzo in uno spettro scientifico sempre più ampio. In via di completamento, sulle orme del progetto genoma umano, è il sequenziamento dell'intero genoma di zebrafish da parte del Sanger centre (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio).

Il pesce zebra è stato utilizzato in diversi ambiti della biologia che vanno dalla biochimica alla biologia comportamentale. Nelle prossime sezione cercherò di descrivere brevemente i vari ambiti in cui il pesce zebra viene utilizzato.

Prima di discutere dei vari settori parlerò dello sviluppo del pesce zebra non solo per una migliore comprensione della anatomia di questo pesce, ma anche perchè questo è stato l'ambito della biologia in cui "storicamente" questo pesce ha raggiunto il livello scientifico ad oggi riconosciutogli.

Sviluppo del pesce zebra: una visione generale

Lo sviluppo dello zebrafish avviene ad una temperature fra i 26 ed i 28 gradi centigradi. In realtà lo sviluppo avviene normalmente in un ambito di temperature più ampio che va dai 21 ai 32°C. Questo garantisce la possibilità di studi eterocronici durante lo sviluppo utilizzando tecniche di trapianto cellulare.

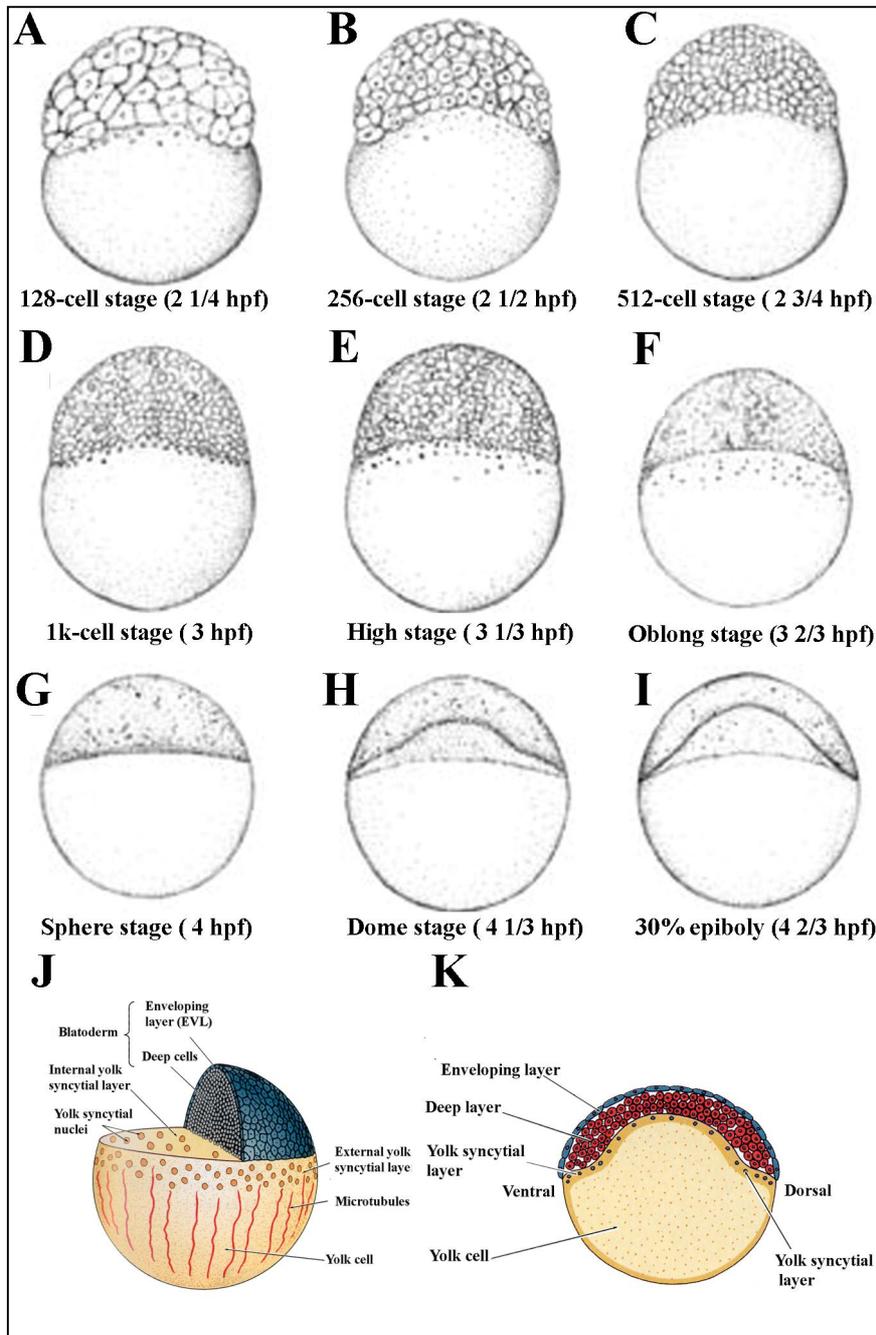


Figura 1 Disegni alla camera lucida di embrioni di zebrafish nelle prime fasi di sviluppo (A-I) e schema delle varie componenti cellulari (modificato da: (Gilbert, 2003; Kimmel et al., 1995)

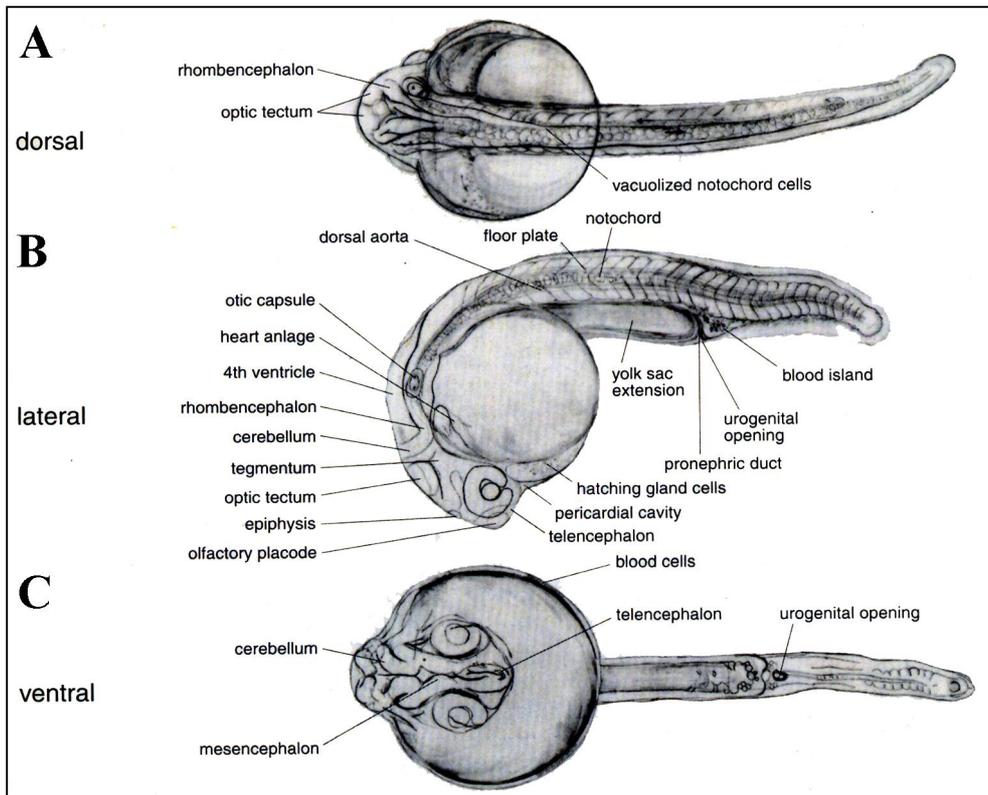


Figura 2 disegni alla camera lucida di embrioni di zebrafish a 24 ore di sviluppo (Kimmel et al., 1995)

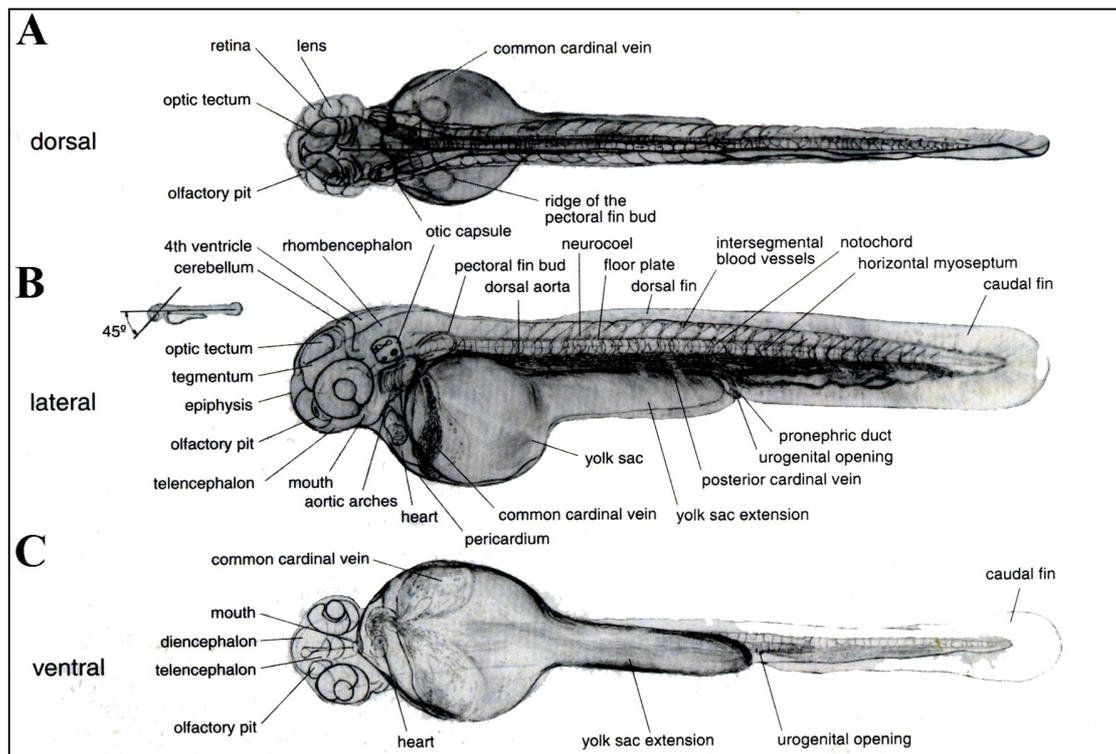


Figura 3 Disegni alla camera lucida di embrioni a 48 ore di sviluppo (Kimmel et al., 1995)

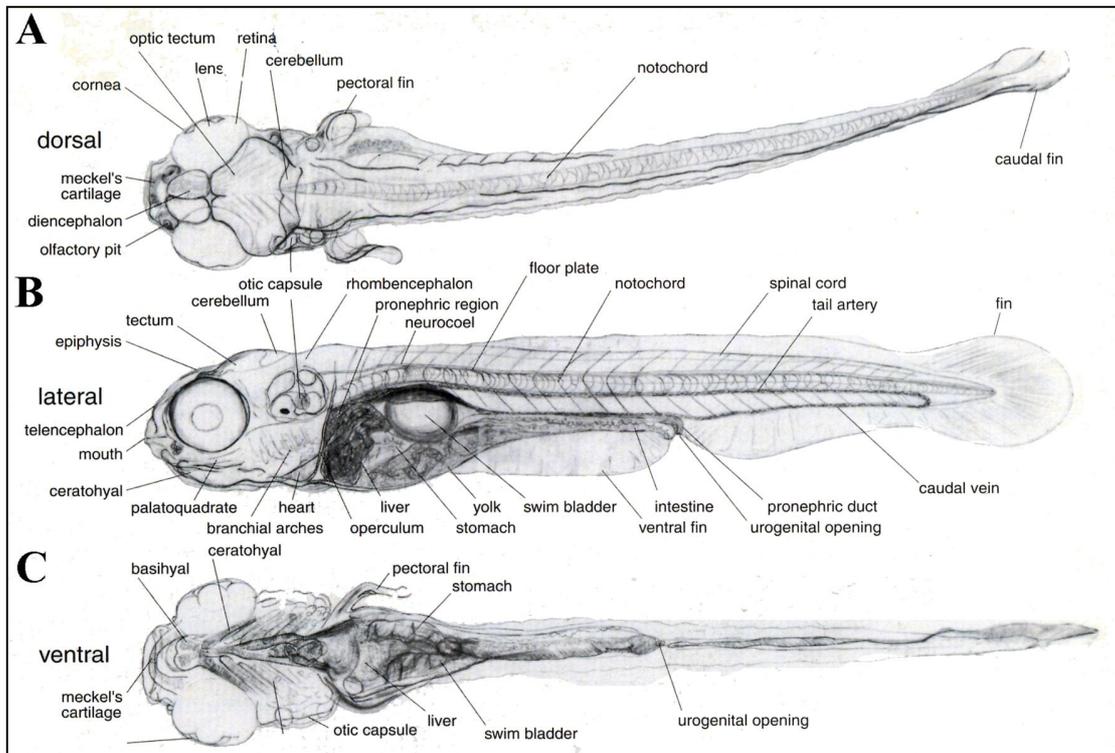


Figura 4 Disegni alla camera lucida di embrioni di zebrafish a 5 giorni (Kimmel et al., 1995)

La prima divisione cellulare avviene dopo $\frac{3}{4}$ d'ora e nel giro di 24 ore il pesce zebra mostra caratteristiche morfologiche ben distinte. La semplice osservazione al microscopio permette di riconoscere gli occhi, gli otoliti, i somiti, i dotti pronefritici, i precursori delle cellule del sangue, un sistema vascolare, dei placodi olfattivi e l'epifisi. Inoltre utilizzando anticorpi o marker genetici è possibile evidenziare un sistema nervoso ben organizzato e definito seppur più semplice rispetto a quello dei mammiferi. Nel giro di altre 48 ore si potrà osservare una pompa cardiaca e la dinamica delle cellule sanguigne. Utilizzando marcatori molecolari opportuni si inizieranno a distinguere diversi tipi di neuroni ed un apparato gastrointestinale in formazione che potrà essere osservato morfologicamente al quinto giorno. Si distingue un fegato istologicamente molto simile a quello dei mammiferi (vedi figura),

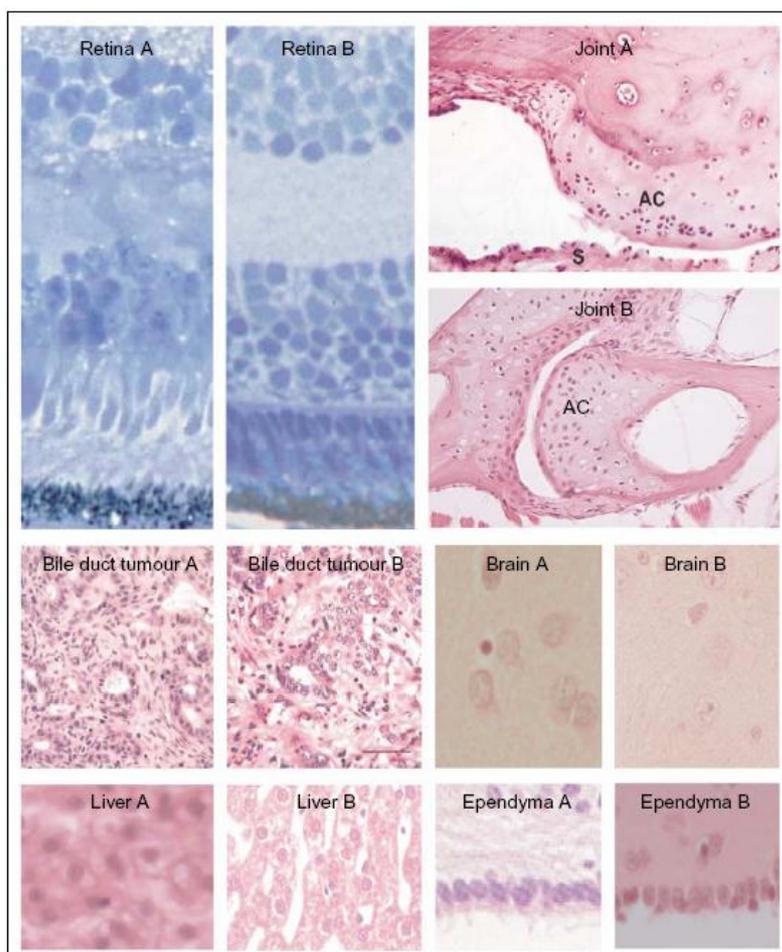


Figura 5 Sezioni di vari organi di zebrafish e di uomo. Le scale di riferimento non sono in proporzione, ma si può notare la somiglianza a livello istologico. Quali di queste è la versione umana? (risposte a fondo legenda) Le immagini mostrano le seguenti sezioni: retinica, articolare, di un dotto biliare tumorale, cervello, fegato e ependima. (Risposte: Retina A uomo, B Zebrafish. Articolazione A uomo, B zebrafish. Dotto biliare A zebrafish B uomo. Cervello A zebrafish B uomo. Fegato A zebrafish B uomo. Ependima A uomo B zebrafish (modificato da (Goldsmith, 2004).

dei reni, ma la cosa più importate è data dal fatto che geni causa di difetti congeniti nell'uomo se mutati nel pesce zebra conferiscono difetti paragonabili, se non del tutto simili, alle mutazioni che avvengono nell'uomo. Va da se il fatto che le possibilità di studio sono fortemente amplificate in zebrafish, sia grazie alle tecniche di manipolazione embrionale, sia alla numerosa progenie.

Un aspetto molto spesso sottovalutato è la somiglianza genica fra i diversi organismi del regno animale. Dei primi cento farmaci al mondo si conosce in parte il meccanismo d'azione. Tali farmaci lavorano sul prodotto di 62 geni (umani), di questi solo 7 non hanno corrispondente nel pesce zebra (dati personali). Volendo estendere il nostro paragone anche ad invertebrati come il moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster*) si avranno solo 9 geni non presenti appena 2 in più di un vertebrato. Non solo questa somiglianza è numerica, ma gli studi sull'evoluzione molecolare hanno dimostrato che i siti attivi delle proteine sono molto spesso identici nei vari organismi e questi sono in genere i luoghi in cui i principi di azione dei farmaci agiscono. Chiaramente non si può attendere una completa somiglianza e probabilmente non tutti i farmaci umani avranno sempre un loro interlocutore molecolare noto o presente nel vertebrato "minore", ma questo si verificherà nella maggior parte dei casi.

Lo zebrafish come sistema modello per lo sviluppo e la malattia.

Come abbiamo visto lo zebrafish si sviluppa velocemente e permette di osservare la maggioranza dei suoi organi nei primi giorni di sviluppo. Le sue dimensioni embrionali (pochi millimetri dopo 5 giorni di sviluppo), permettono di manipolarlo in maniera quasi del tutto automatizzata, garantendo così il trattamento e l'analisi di molti embrioni simultaneamente. Inoltre la numerosa progenie fino a 200 embrioni la settimana per copia e la possibilità di mantenere circa 10 adulti in 5 litri d'acqua, garantisce una quantità di unità sperimentali vastissima nell'arco di un anno. Inoltre il mantenimento dello zebrafish è da 1/100 a 1/1000 economicamente più vantaggioso rispetto al topo (sistema animale principe nelle industrie farmaceutiche). Non solo i costi di mantenimento spiegano la sua forte crescita nell'utilizzo a scopo di ricerca per sviluppare nuovi farmaci, ma anche considerazioni di natura economica sulla quantità di prodotto utilizzato per effettuare l'analisi. Questo rende lo zebrafish utilizzabile,

restando nel campo dell'industria farmaceutica, nelle prime fasi di ricerca dove cioè si trovano i saggi cellulari. Gli ovvi vantaggi sono che questi potenziali farmaci possono essere analizzati su un organismo (o su un mutante) anziché una linea cellulare in pratica nello stesso tempo e allo stesso costo. Inoltre un approccio simile potrebbe incrementare la percentuale di farmaci che superano le fasi I e II della sperimentazione farmacologica.

Lo zebrafish è stato usato storicamente principalmente come modello per comprendere l'embriologia grazie alla alta fecondità la fecondazione esterna e la trasparenza ottica dell'embrione che permette sia la visualizzazione diretta dei vari destini cellulari, sia la visualizzazione di proteine fluorescenti (come la GFP green fluorescent protein). Ad oggi due grandi screening sono stati effettuati in zebrafish allo scopo di isolare mutanti. Uno screening chimico utilizzando l'etil nitroso urea (ENU) come agente mutagenizzante (Brand et al., 1996) ed uno screening per inserzione (Amsterdam et al., 2004). Il risultato di questi screening è stata una collezione di migliaia di mutanti di zebrafish.

Recenti sviluppi tecnici usati per lo studio dello sviluppo hanno aperto nuove strade nell'investigazione delle diverse funzioni geniche. In particolare è risultata di grande importanza la possibilità di effettuare "knockdown", ovvero ablazioni geniche funzionali utilizzando il fosforodiammidato morfolino oligonucleotide (morfolino), in grado di bloccare in maniera sequenza specifica la traduzione degli RNA messaggero (Nasevicius and Ekker, 2000).

Inoltre tecniche per l'espressione condizionale dei geni in zebrafish è stata effettuata accoppiando l'attività genica ad un raggio laser a bassa intensità e la possibilità di effettuare una espressione genica condizionata dalla regolazione ormonale è in via di perfezionamento, purtroppo al momento non si è ancora perfezionata la possibilità di ablare geneticamente geni specifici come avviene in topo.

La possibilità di usufruire di mutanti chimicamente indotti e di ablazioni funzionali ha portato lo zebrafish ad essere utilizzato come modello per diverse malattie umane. Lo zebrafish è utilizzato per modellizzare il sistema ematopoietico, cardiovascolare (Stainier et al., 1996; Xu et al., 2002), visivo (Goldsmith and Harris, 2003) ed i disordini renali (Drummond et al., 1998).

In particolare la ricerca in ambito cardiovascolare ha fornito informazioni importanti sullo sviluppo in generale del cuore grazie alla capacità dello zebrafish di non dipendere, nelle prime fasi dello sviluppo, dalla circolazione sanguigna. Lo zebrafish

è stato utilizzato anche in studi sull' angiogenesi (Lawson and Weinstein, 2002), sull'udito (Whitfield, 2002) e come modello per la sordità genetica umana (Whitfield, 2002). Lo zebrafish sta inoltre risultando un modello emergente per lo studio dei modelli neurodegenerativi e neuromuscolari come l'Alzheimer (Tomasiewicz et al., 2002), la distrofia muscolare Duchenne e diverse miopatie (Bassett and Currie, 2003).

Analisi dell'espressione genica e perturbazione chimica: lo zebrafish e la chimica genomica.

Una tra le tecniche più recenti utilizzate nella genomica è il "microarray" che permette di monitorare contemporaneamente l'attività di migliaia di geni e comparare la loro attività in diverse condizioni. Questo sta permettendo di catalogare diversi profili genici e comparare l'espressione genica in condizioni normali con quella di mutanti sia temporalmente, che in diverse porzioni dell'organismo. Sebbene tali variazioni a livello di RNA messaggeri non comportino necessariamente variazioni a livello proteico la possibilità di monitorare tali cambiamenti in seguito a variazioni chimiche o genetiche è un primo passo per apprendere caratteristiche metaboliche o per avere informazione riguardo a patologie. Questa tecnica è sempre più utilizzata nella farmacologia in particolare al fine di evidenziare nuovi farmaci o di caratterizzare in maggior dettaglio le perturbazioni a seguito di malattie ereditarie.

Le tecniche di microarray sono state utilizzate per valutare la diversa efficacia di farmaci in diversi tessuti e per conoscere il profilo genico indotto da farmaci di nuova generazione al fine di facilitare il riconoscimento di molecole bersaglio. In una prima fase questi studi sono stati effettuati su culture cellulari con lo svantaggio di avere una rapida selezione cellulare e conseguentemente avvantaggiare la compensazione indotta farmacologicamente oltre a perdere la complessità che si trova in un organismo. In alternativa studi simili sono stati fatti su tessuti di topo dove però data la scarsa economicità lo screening è generalmente effettuato in piccola scala e con costi elevati. La tecnica dei microarray utile nel monitorare variazioni cellulari nel caso in cui non si conosca niente circa le vie metaboliche e geniche non è un mezzo potente per effettuare screening su farmaci.

Le linee cellulari come abbiamo detto seppur presentino caratteristiche economiche vantaggiose non danno un sufficiente grado di complessità e possono portare a compensazioni dovute alla selezione cellulare non volute. L'uso di zebrafish negli

screening alla ricerca di nuovi farmaci si sta rivelando sempre più centrale. La possibilità di effettuare screening in larga scala e ad un costo paragonabile a quello di un saggio cellulare oltre alla possibilità di analizzare diverse finestre temporali. Questi fattori risultano utili per comprendere la variabilità nell'espressione genica e per effettuare studi di tossico-genomica. Lo screening di piccole molecole chimiche, metabolizzabili dallo zebrafish semplicemente sciogliendole nell'acqua dove il pesce sviluppa, hanno garantito permesso l'isolamento di molecole attive. Peterson et al. hanno screenato circa 1100 molecole sintetiche in embrioni di zebrafish allineati in piastre con 96 pozzetti al fine di identificare molecole in grado di modulare processi di sviluppo. L'isolamento tra queste di una molecola in grado di interferire con lo sviluppo degli otoliti ha permesso di comprendere il periodo in cui questi si sviluppano.

Un altro esempio in cui lo zebrafish è stato utilizzato per evidenziare effetti secondari è stato l'esposizione a degli embrioni di pesce ad un potente inibitore della angiogenesi che era stato indicato come possibile inibitore dei vasi sanguigni durante la formazione di tumori. Il trattamento con questo tipo di farmaco ha mostrato un incremento nei processi di morte cellulare.

Sicuramente più interessante è stato lo screening effettuato recentemente in zebrafish su un mutante "gridlock" dove a causa di una malformazione aortica il sangue non riesce a circolare correttamente e si accumula nella cavità toracica. Una malformazione simile è riscontrabile in forme congenite di displasia aortica nell'uomo dove si verifica una costrizione aortica del tutto simile a quella riscontrata nel pesce. Nel mutante di zebrafish sono stati screenati circa 5000 composti al fine di isolare possibili farmaci capaci di recuperare tale difetto genico. Di questi 5000 composti 2 erano in grado di recuperare completamente tale difetto genico

Un simile approccio per scoprire composti biologicamente attivi mostra sicuramente un vantaggio superiore rispetto ad uno screening simile effettuato in colture cellulari. I vantaggi, come in parte già menzionato, precedentemente sono la possibilità a costi del tutto simili a quelli attuale di testare molecole attive direttamente in un organismo, inoltre la possibilità di creare artificialmente con tecniche di ingegneria genetica modelli *ad hoc* permette una specificità unica. La possibilità di visualizzare un organismo porta inoltre benefici circa i possibili effetti secondari del principio attivo. A tale riguardo lo zebrafish può venire utilizzato per andare a verificare le possibili attività secondarie di un principio attivo andando a valutare anatomicamente le

strutture di interesse per esempio farmaci sospettati di avere effetti secondari a carico del sistema cardiovascolare possono essere testati in questo organismo modello.

Un ultimo aspetto in cui lo zebrafish è stato utilizzato è la possibilità di monitorare attività enzimatiche in vivo. Molecole substrato dell'enzima HMG e fluorescenti solo se metabolizzate. La metabolizzazione di tali composti rende parte dell'apparato digerente dello zebrafish durante lo sviluppo fluorescente, quando vengono somministrate statine queste impediscono l'insorgenza della fluorescenza. Questo semplice saggio mostra con eleganza la possibilità di utilizzare un approccio simile per testare a livello di un organismo vertebrato specifiche attività enzimatiche e teoricamente aprire metodi per lo sviluppo di nuovi farmaci.

Zebrafish come modello

- Cancro (Amatruda et al., 2002)
- Ematopoiesi (Amatruda and Zon, 1999)
- Anemia congenital sideroblastica (Brownlie et al., 1998)
- Porfiria epatoeritropoietica (HEP) and porfiria cutanea tarda (PCT) (Wang et al., 1998)
- Anemia ipercromica Hyperochormic anaemia (Ransom et al., 1996)
- Obesità (Vogel, 2000)
- Osteogenesi imperfecta (Vogel, 2000)
- Hunter-Thompson condrodysplasia
- Sindrome di Kalmann
- Sviluppo craniofaciale e sindromi cartilaginee.
- Syndrome policistica renale Polycystic kidney disease (by morpholino) (Liu et al., 2002)
- Sindrome congenite cardiache (gridlock) (Peterson et al., 2004)
- Neurotoxicological model (Linney et al., 2004)
- Teratogenic potential of marine sediment (Kammann et al., 2004)
- Mycobacterial pathogenesis (Prouty et al., 2003)
- human Senior-Loken and Bardet-Biedl syndromes (OMIM 266900 and 209900) (Drummond et al., 1998)
- possible human Walker-Warburg, oculo-cerebro-renal and muscle-eye-brain syndromes (OMIM 236670, 309000 and 253280). (Wei and Malicki, 2002)
- It is possible that similar mutations may underlie congenital optic nerve aplasia (OMIM 165550). (Kay et al., 2001)
- lens opacities being particularly relevant given the clinical importance of cataracts (Vihtelic and Hyde, 2002)
- Reversed optokinetic nystagmus (OKN): optic nerve pathology (Halmagyi et al., 1980; Rick et al., 2000)
- Streptococcus-Zebrafish Model of Bacterial Pathogenesis (Neely et al., 2002)
- Zebrafish presenilin
- Susceptibility of zebrafish (*Danio rerio*) to a model pathogen, spring viremia of carp virus (Sanders et al., 2003)

- muscular dystrophy and congenital myopathy (Bassett and Currie, 2004; Bassett et al., 2003; Bassett and Currie, 2003).
- Cardiomyopathy (Xu et al., 2002)
- Pyruvate dehydrogenase deficiency (Taylor et al., 2004)
- Branchio-Oto-Renal syndrome (BOR), morpholino phenocopy (David J. Kozlowska and Wai K. Lamb, 2005)b.
- Zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of *Salmonella typhimurium* infections (van der Sar et al., 2003)
- human diseases MODY5 (maturity-onset diabetes of the young, type V) (Sun and Hopkins, 2001)
- GCKD (glomerulocystic kidney disease) (Sun and Hopkins, 2001)
- Arrhythmia (Langheinrich et al., 2003)
- p53 specific drugs (Langheinrich et al., 2002)
- gerontological model (Gerhard, 2003)
- Hemophilia model (Jagadeeswaran and Liu, 1997)
- Fetal alcohol syndrome (Bilotta et al., 2004)
- model for pancreatic cancer (Yee and Pack 2004)
- Inflammatory bowel disease (Goldsmith zebrafish meeting 2004)
- Myelin (M. Halpern zebrafish meeting 2004)
- Development of a zebrafish 4 day embryo larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety, In Press, Corrected Proof, Available online 1January 2005* Benoit Fraysse, Raphael Mons and Jeanne Garric
- **Novel use of zebrafish as a vertebrate model to screen radiation protectors and sensitizers** *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics, Volume 61, Issue 1, January 2005, Pages 10-13* Mary Frances McAleer, Christian Davidson, William Robert Davidson, Brad Yentzer, Steven A. Farber, Ulrich Rodeck and Adam P. Dicker

Zebrafish fluorescent assay

- Mitochondria number via MitoTracker Green (Molecular probe).

- Thyroid assay (Klaus Roth zebrafish meeting 2004)

Amatruda, J. F., Shepard, J. L., Stern, H. M. and Zon, L. I. (2002). Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell* **1**, 229-31.

Amatruda, J. F. and Zon, L. I. (1999). Dissecting hematopoiesis and disease using the zebrafish. *Dev Biol* **216**, 1-15.

Bassett, D. and Currie, P. D. (2004). Identification of a zebrafish model of muscular dystrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **31**, 537-40.

Bassett, D. I., Bryson-Richardson, R. J., Daggett, D. F., Gautier, P., Keenan, D. G. and Currie, P. D. (2003). Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development* **130**, 5851-60.

Bassett, D. I. and Currie, P. D. (2003). The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 2**, R265-70.

Bilotta, J., Barnett, J. A., Hancock, L. and Saszik, S. (2004). Ethanol exposure alters zebrafish development: a novel model of fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicol Teratol* **26**, 737-43.

Brownlie, A., Donovan, A., Pratt, S. J., Paw, B. H., Oates, A. C., Brugnara, C., Witkowska, H. E., Sassa, S. and Zon, L. I. (1998). Positional cloning of the zebrafish sauternes gene: a model for congenital sideroblastic anaemia. *Nat Genet* **20**, 244-50.

David J. Kozłowska, b., Tanya T. Whitfieldc, Neil A. Hukrieded,1, and Wai K. Lamb, E. S. W., *. (2005). The zebrafish dog-eared mutation disrupts *eya1*, a gene required for cell survival and differentiation in the inner ear and lateral line. *Dev Biol* **277**.

Drummond, I. A., Majumdar, A., Hentschel, H., Elger, M., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Stemple, D. L., Zwartkruis, F., Rangini, Z. et al. (1998). Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development* **125**, 4655-67.

Gerhard, G. S. (2003). Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. *Exp Gerontol* **38**, 1333-41.

Halmagyi, G. M., Gresty, M. A. and Leech, J. (1980). Reversed optokinetic nystagmus (OKN): mechanism and clinical significance. *Ann Neurol* **7**, 429-35.

Jagadeeswaran, P. and Liu, Y. C. (1997). A hemophilia model in zebrafish: analysis of hemostasis. *Blood Cells Mol Dis* **23**, 52-7.

Kammann, U., Biselli, S., Huhnerfuss, H., Reineke, N., Theobald, N., Vobach, M. and Wosniok, W. (2004). Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environ Pollut* **132**, 279-87.

Kay, J. N., Finger-Baier, K. C., Roeser, T., Staub, W. and Baier, H. (2001). Retinal ganglion cell genesis requires lakritz, a Zebrafish atonal Homolog. *Neuron* **30**, 725-36.

Langheinrich, U., Hennen, E., Stott, G. and Vacun, G. (2002). Zebrafish as a model organism for the identification and characterization of drugs and genes affecting p53 signaling. *Curr Biol* **12**, 2023-8.

Langheinrich, U., Vacun, G. and Wagner, T. (2003). Zebrafish embryos express an orthologue of HERG and are sensitive toward a range of QT-prolonging drugs inducing severe arrhythmia. *Toxicol Appl Pharmacol* **193**, 370-82.

Linney, E., Upchurch, L. and Donerly, S. (2004). Zebrafish as a neurotoxicological model. *Neurotoxicol Teratol* **26**, 709-18.

- Liu, S., Lu, W., Obara, T., Kuida, S., Lehoczky, J., Dewar, K., Drummond, I. A. and Beier, D. R.** (2002). A defect in a novel Nek-family kinase causes cystic kidney disease in the mouse and in zebrafish. *Development* **129**, 5839-46.
- Neely, M. N., Pfeifer, J. D. and Caparon, M.** (2002). Streptococcus-zebrafish model of bacterial pathogenesis. *Infect Immun* **70**, 3904-14.
- Peterson, R. T., Shaw, S. Y., Peterson, T. A., Milan, D. J., Zhong, T. P., Schreiber, S. L., MacRae, C. A. and Fishman, M. C.** (2004). Chemical suppression of a genetic mutation in a zebrafish model of aortic coarctation. *Nat Biotechnol* **22**, 595-9.
- Prouty, M. G., Correa, N. E., Barker, L. P., Jagadeeswaran, P. and Kloise, K. E.** (2003). Zebrafish-Mycobacterium marinum model for mycobacterial pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* **225**, 177-82.
- Ransom, D. G., Haffter, P., Odenthal, J., Brownlie, A., Vogelsang, E., Kelsh, R. N., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M. et al.** (1996). Characterization of zebrafish mutants with defects in embryonic hematopoiesis. *Development* **123**, 311-9.
- Rick, J. M., Horschke, I. and Neuhauss, S. C.** (2000). Optokinetic behavior is reversed in achiasmatic mutant zebrafish larvae. *Curr Biol* **10**, 595-8.
- Sanders, G. E., Batts, W. N. and Winton, J. R.** (2003). Susceptibility of zebrafish (Danio rerio) to a model pathogen, spring viremia of carp virus. *Comp Med* **53**, 514-21.
- Sun, Z. and Hopkins, N.** (2001). vhnf1, the MODY5 and familial GCKD-associated gene, regulates regional specification of the zebrafish gut, pronephros, and hindbrain. *Genes Dev* **15**, 3217-29.
- Taylor, M. R., Hurley, J. B., Van Epps, H. A. and Brockerhoff, S. E.** (2004). A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4584-9.
- van der Sar, A. M., Musters, R. J., van Eeden, F. J., Appelmelk, B. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. and Bitter, W.** (2003). Zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of Salmonella typhimurium infections. *Cell Microbiol* **5**, 601-11.
- Vihtelic, T. S. and Hyde, D. R.** (2002). Zebrafish mutagenesis yields eye morphological mutants with retinal and lens defects. *Vision Res* **42**, 535-40.
- Vogel, G.** (2000). Zebrafish earns its stripes in genetic screens. *Science* **288**, 1160-1.
- Wang, H., Long, Q., Marty, S. D., Sassa, S. and Lin, S.** (1998). A zebrafish model for hepatoerythropoietic porphyria. *Nat Genet* **20**, 239-43.
- Wei, X. and Malicki, J.** (2002). nagie oko, encoding a MAGUK-family protein, is essential for cellular patterning of the retina. *Nat Genet* **31**, 150-7.
- Xu, X., Meiler, S. E., Zhong, T. P., Mohideen, M., Crossley, D. A., Burggren, W. W. and Fishman, M. C.** (2002). Cardiomyopathy in zebrafish due to mutation in an alternatively spliced exon of titin. *Nat Genet* **30**, 205-9.

Bibliografia

- Amsterdam, A., Nissen, R. M., Sun, Z., Swindell, E. C., Farrington, S. and Hopkins, N.** (2004). Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12792-7.
- Bassett, D. I. and Currie, P. D.** (2003). The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 2**, R265-70.
- Brand, M., Heisenberg, C. P., Jiang, Y. J., Beuchle, D., Lun, K., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D. A. et al.** (1996). Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development* **123**, 179-90.
- Drummond, I. A., Majumdar, A., Hentschel, H., Elger, M., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhaus, S. C., Stemple, D. L., Zwartkruis, F., Rangini, Z. et al.** (1998). Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development* **125**, 4655-67.
- Ernest, S., Rauch, G. J., Haffter, P., Geisler, R., Petit, C. and Nicolson, T.** (2000). Mariner is defective in myosin VIIA: a zebrafish model for human hereditary deafness. *Hum Mol Genet* **9**, 2189-96.
- Gilbert, S. F.** (2003). *Developmental Biology*.
- Goldsmith, P.** (2004). Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol* **4**, 504-12.
- Goldsmith, P. and Harris, W. A.** (2003). The zebrafish as a tool for understanding the biology of visual disorders. *Semin Cell Dev Biol* **14**, 11-8.
- http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio. The Sanger Centre, (ed).
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **203**, 253-310.
- Lawson, N. D. and Weinstein, B. M.** (2002). Arteries and veins: making a difference with zebrafish. *Nat Rev Genet* **3**, 674-82.
- Nasevicius, A. and Ekker, S. C.** (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* **26**, 216-20.
- Neely, M. N., Pfeifer, J. D. and Caparon, M.** (2002). Streptococcus-zebrafish model of bacterial pathogenesis. *Infect Immun* **70**, 3904-14.
- Prouty, M. G., Correa, N. E., Barker, L. P., Jagadeeswaran, P. and Klose, K. E.** (2003). Zebrafish-*Mycobacterium marinum* model for mycobacterial pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* **225**, 177-82.
- Stainier, D. Y., Fouquet, B., Chen, J. N., Warren, K. S., Weinstein, B. M., Meiler, S. E., Mohideen, M. A., Neuhaus, S. C., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F. et al.** (1996). Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development* **123**, 285-92.
- Taylor, M. R., Hurley, J. B., Van Epps, H. A. and Brockerhoff, S. E.** (2004). A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4584-9.
- Tomasiewicz, H. G., Flaherty, D. B., Soria, J. P. and Wood, J. G.** (2002). Transgenic zebrafish model of neurodegeneration. *J Neurosci Res* **70**, 734-45.
- Wang, H., Long, Q., Marty, S. D., Sassa, S. and Lin, S.** (1998). A zebrafish model for hepatoerythropoietic porphyria. *Nat Genet* **20**, 239-43.
- Whitfield, T. T.** (2002). Zebrafish as a model for hearing and deafness. *J Neurobiol* **53**, 157-71.

Xu, X., Meiler, S. E., Zhong, T. P., Mohideen, M., Crossley, D. A., Burggren, W. W. and Fishman, M. C. (2002). Cardiomyopathy in zebrafish due to mutation in an alternatively spliced exon of titin. *Nat Genet* **30**, 205-9.