

Model Zebrafish (*Danio rerio*) Pada Uji Farmakologi dan Toksikologi

Niken Indriyanti¹, Vita Olivia Siregar¹, Sestia Wulandari²

¹Departemen Farmakologi, Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman

²Program Studi Sarjana Farmasi Klinis, Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman

Info Artikel

Riwayat Artikel :

Diterima 07 11, 2024

Direvisi 07 17, 2024

Terbit 07 28, 2024

Keywords:

Drug

Model

Zebrafish

ABSTRACT

*Drug development testing methods continue to result in representative data. The use of rodent experimental animals can still be replaced by using smaller experimental animals, namely zebrafish (*Danio rerio*). Pharmacological activity test can use zebrafish models that are induced a pathophysiology condition like leukemia, melanoma, pancreatic cancer, myocardial infarction, atherosclerosis, diabetes, obesity, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, anxiety, muscular dystrophy, osteoporosis, psoriasis, wound, and inflammation. Toxicity tests using zebrafish include acute and chronic toxicity tests, toxicity tests on the heart and liver, and neurotoxic effects. Zebrafish is an ideal model for measuring disease-specific biomarkers and toxicity biomarkers in humans.*



Journal of Agropharmacy is licensed under [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Email Koresponden Penulis: niken@farmasi.unmul.ac.id

1. PENDAHULUAN

Zebrafish merupakan salah satu hewan coba yang secara genetic memiliki kemiripan dengan manusia. Biomarker yang dapat diukur pada zebrafish dapat dimanfaatkan untuk pengujian aktivitas dan toksisitas obat. Zebrafish sangat efisien digunakan untuk skrining aktivitas menggunakan banyak jenis bahan uji, bahkan yang tidak memungkinkan dilakukan pada mencit. Kelemahan zebrafish adalah dosis yang belum bisa dikonversi ke dosis manusia, sehingga hasil skrining yang telah mengerucut pada sampel tertentu tetap diujikan pada mencit atau tikus (golongan *rodent*) (Wang, 2021; Saito, 2020). Kajian literatur ini membahas rasionalisasi beberapa pengujian farmakologi dan toksikologi menggunakan model zebrafish dilihat dari metode uji dan biomarker yang dipilih.

2. TOPIK

Kajian literatur ini membahas mengenai keuntungan penggunaan zebrafish (*Danio rerio*) untuk penelitian kefarmasian dan jenis pengujian yang dapat dilakukan menggunakan zebrafish. Pengujian tersebut meliputi pengujian aktivitas farmakologi dengan membuat pemodelan zebrafish pada berbagai penyakit. Selain itu, zebrafish juga digunakan sebagai hewan coba pada uji toksisitas dan penelitian manipulasi genetik.

2.1. Keuntungan Penggunaan Zebrafish

Penelitian aktivitas obat menggunakan makhluk hidup berdampak pada masalah etik yang muncul. Prinsip *Reduce, Replace, Refinement* (3R) penggunaan hewan coba mengarahkan pilihan hewan pada tingkatan terkecil yang masih bisa menghasilkan data yang valid (Verderio, 2023), dengan jumlah sekecil mungkin, dan tanpa menimbulkan rasa sakit (David, 2019). Maka, penggunaan kelinci, tikus, dan mencit masih bisa diganti dengan zebrafish pada pemodelan penyakit tertentu. Penggunaan zebrafish juga lebih efisien untuk pengujian skrining yang menggunakan banyak sampel (Patton, 2021).

2.1.1 Zebrafish mudah dikembangbiakkan

Pembiakan zebrafish lebih mudah daripada hewan coba mamalia. Zebrafish berusia 3 bulan dapat menjadi indukan dewasa untuk pembiakan berkesinambungan sampai usia 12-15 bulan. Produktivitas tinggi dengan masa hidup yang lebih pendek sangat ideal untuk penelitian obat-obat dengan penggunaan jangka panjang. Pengujian skrining aktivitas obat juga dapat dilakukan dalam waktu yang cepat. Selain itu, dari sisi pemeliharaan, zebrafish tidak memerlukan ruangan khusus. Pemeliharaan berkaitan dengan pakan dan pH air bisa dikondisikan tanpa memerlukan banyak biaya. Kondisi pemeliharaan ini perlu distandardisasi supaya bisa menghasilkan kualitas zebrafish yang seragam (Longkumer, 2022; Tsang, 2020).

2.1.2 Kemiripan Genetik Zebrafish dengan Manusia

Zebrafish memiliki kemiripan genetik sekitar 70% dengan manusia. Kemiripan ini membuat pemodelan penyakit manusia ke zebrafish bisa dilakukan dengan tingkat keberhasilan tinggi (Raby, 2020). Respon obat juga dapat diukur sebagai cerminan aktivitas yang muncul jika obat tersebut digunakan pada manusia. Berbeda dengan hewan coba lain, dosis zebrafish belum dapat dikonversi ke dosis manusia. Hal ini menjadikan zebrafish sangat praktis digunakan sebagai skrining aktivitas sebelum pengujian *in vivo* menggunakan hewan rodent dilakukan (Tsang, 2020).

2.1.3 Embrio dan Larva Zebrafish Transparan

Beberapa pengujian memerlukan pengamatan organ dalam kondisi hewan coba hidup. Hal ini sulit diamati pada mamalia. Pada zebrafish, pengamatan ini memungkinkan dilakukan pada embrio dan larva. Zebrafish dewasa yang dapat digunakan untuk pengamatan organ seperti ini hanya pada zebrafish transgenik. Pada embrio dan larva, pengamatan organ secara langsung dan penilaian

perkembangan organ internal dapat diukur dengan cara observasi biasa dan menggunakan teknik *imaging* menggunakan zat kontras tertentu (Lumaquin, 2020).

2.2. Pemodelan Penyakit Pada Zebrafish

Zebrafish dapat digunakan sebagai model hewan untuk penyakit pada manusia, seperti kanker, penyakit kardiovaskular, penyakit metabolik seperti diabetes mellitus, serta penyakit yang berkaitan dengan saraf (Fazio, 2020, Wang, 2021).

2.2.1 Kanker

Pemodelan kanker pada hewan coba sangat berisiko terhadap peneliti. Tingkat keberhasilan pemodelan kanker pada mamalia belum dapat dicapai maksimal, dan stadium hewan coba yang terinduksi cukup bervariasi (Fazio, 2020). Zebrafish dapat digunakan sebagai model alternatif hewan coba kanker seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Jenis pemodelan kanker pada zebrafish.

Pemodelan	Rasionalisasi	Penggunaan
Leukemia dan limfoma (Yi, 2022)	Zebrafish transgenik mengekspresikan <i>human oncogenes</i> atau <i>tumor suppressor genes</i> yang berkembang menjadi kanker darah yang menyerupai leukemia dan limfoma pada manusia.	Pemodelan ini digunakan untuk meneliti perkembangan kanker dan penelitian obat antikanker.
Melanoma (Biagini, 2022)	Induksi melanoma pada zebrafish dilakukan dengan membuat mutasi gen, misalnya BRAF. Mutasi tersebut biasa menghasilkan human melanoma.	Meneliti patogenesis melanoma dan pengujian obat baru
Kanker pankreas (Franco, 2020)	Zebrafish mengekspresikan onkogen KRAS dan sejenisnya pada pankreas. Onkogen ini menyerupai kondisi pada kanker pankreas manusia. Penelitian dilakukan secara <i>in vivo xenotransplantation</i> .	Pengujian obat baru

Pemodelan kanker menggunakan tikus dan mencit memerlukan waktu yang lama dan biaya tinggi. Zebrafish menjadi model alternatif spesifik untuk skrining obat antikanker baru ataupun menilai aktivitas terkait. Penelitian kanker pada model zebrafish menggunakan parameter spesifik genomik pencetus patogenesis kanker. Model zebrafish yang diinduksi melanoma, leukemia, dan kanker pankreas menghasilkan data parameter yang dapat mencerminkan hasil pengujian jika obat yang dipaparkan pada manusia karena biomarker yang digunakan pada zebrafish adalah biomarker penyakit pada manusia (Ti, 2022; Biagiani; 2022; Franco, 2020)

2.2.2 Pemodelan Zebrafish Pada Penyakit Kardiovaskular dan Penyakit Metabolik Lain

Penelitian *in vivo* pada penyakit metabolik sangat banyak dipublikasikan. Kendala induksi seringkali muncul. Kendala efisiensi hewan coba juga sering terjadi pada jumlah sampel yang sangat banyak. Tabel 2 menyajikan beberapa penyakit metabolik yang dapat menggunakan model zebrafish.

Tabel 2 Pemodelan penyakit metabolik pada zebrafish.

Pemodelan	Rasionalisasi	Penggunaan
Infark myocard (Bowley, 2022)	Zebrafish mampu meregenerasi jantung	Penelitian regenerasi jantung dan penelitian obat penyakit jantung
Atherosclerosis (Fan, 2020)	Zebrafish dapat dimodifikasi genetik atau diinduksi menggunakan diet tinggi kolesterol supaya menghasilkan lesi aterosklerosis menyerupai kondisi lesi pada manusia	Penelitian metabolisme lipid dan uji aktivitas anti-aterosklerosis.
Diabetes (Mohammadi, 2020)	Zebrafish dapat dimanipulasi secara genetik atau induksi menggunakan bahan kimia untuk menghasilkan kondisi menyerupai diabetes tipe 1 dan 2.	Penelitian metabolisme glukosa, obat antidiabetes, insulin, komplikasi penyakit diabetes
Obesitas (Smolinska, 2024)	Zebrafish dapat diinduksi obesitas menggunakan diet spesifik tinggi lemak	Penelitian obat antiobesitas

Penyakit metabolik merupakan penyakit tidak menular yang sangat banyak ditemukan. Sebagian besar riset obat baru berfokus pada penyakit ini. Induksi penyakit perlu waktu yang lama. Potensi kegagalan induksi belum diketahui apakah setara atau lebih kecil daripada potensi kegagalan induksi menggunakan zebrafish. Zebrafish dapat digunakan sebagai model skrining obat antara lain pada penyakit jantung, diabetes, dan obesitas (Bowley, 2022; Fan, 2020; Mohammadi, 2020; Smolinska, 2024).

2.2.3 Pemodelan Zebrafish Pada Penyakit Saraf, Otot, dan Tulang

Penyakit neuromuskular dan skeletal memerlukan hewan coba yang mudah diinduksi dan ditangani. Zebrafish dapat digunakan untuk jenis penyakit tersebut. Beberapa jenis penyakit yang dapat menggunakan zebrafish ada pada Tabel 3.

Tabel 3. Jenis penyakit saraf , otot, tulang yang bisa menggunakan zebrafish (Wang, 2021).

Pemodelan	Rasionalisasi	Penggunaan
Parkinson (Vaz, 2018)	Model zebrafish Parkinson dibuat dengan induksi gen seperti LRRK2 atau dengan mengekspos ikan pada neurotoksin MPTP	Penelitian mekanisme penyakit dan penelitian obat neuroprotektif
Alzheimer (Wang, 2021)	Zebrafish transgenik mengekspresikan <i>amyloid precursor protein</i> (APP) atau protein tau menghasilkan plak menyerupai kondisi penyakit Alzheimer	Penelitian patofisiologi Alzheimer dan obat untuk Alzheimer
Kecemasan (Ferreira, 2020)	Zebrafish dewasa memiliki sistem, serotonergic (5 HT) mirip dengan manusia	Penelitian obat untuk mengatasi kecemasan
Epilepsi (Scott, 2021)	Zebrafish diinduksi epilepsi dengan menginduksi mutasi gen yang berkaitan dengan patofisiologi epilepsi, atau dengan menggunakan senyawa kimia yang menimbulkan konvulsi	Penelitian obat antiepilepsi
Distrofi muskular (Wasala, 2020)	Induksi dengan cara mutasi gen distrofin. Distrofin juga bermutasi pada manusia yang terkena distrofi muskular	Penelitian degenerasi otot dan terapinya
Osteoporosis (Fu, 2020; Saito, 2020)	Zebrafish menjadi model osteoporosis dengan cara manipulasi gen yang berkaitan dengan pembentukan tulang, atau dengan intervensi diet	Penelitian metabolisme tulang dan penelitian obat untuk osteoporosis

Penyakit saraf seperti Parkinson, Alzheimer, dan kecemasan memerlukan teknik khusus dalam menginduksi dan mengamati parameter penyakit. Biomarker yang dipilih sangat bervariasi. Biomarker yang ada pada manusia seperti APP, protein tau, dan serotonin juga ada pada zebrafish sehingga menjadi parameter ukur yang valid. Pada gangguan otot dan tulang, manipulasi genetik dilakukan pada zebrafish. Belum dapat dipastikan angka tingkat keberhasilan induksi penyakit, namun penelitian ini telah dipublikasikan pada beberapa artikel penelitian (Wang, 2021; Scott, 2021; Fu, 2020).

2.2.4 Pemodelan Zebrafish Pada Penyakit Kulit

Gangguan kulit cukup banyak diteliti pada tikus dan kelinci. Pengamatan visual mudah dilakukan. Zebrafish juga dapat digunakan untuk beberapa penyakit kulit antara lain ada pada Tabel 4.

Tabel 4. Jenis gangguan kulit yang dapat diujikan pada zebrafish.

Pemodelan	Rasionalisasi	Penggunaan
Psoriasis (Yuan, 2020)	Induksi overekspresi sitokin pro-inflamasi misalnya TNF alfa sehingga menghasilkan lesi inflamasi kulit seperti psoriasis pada manusia	Pengujian aktivitas antiinflamasi
Inflamasi (Rodrigo, 2020)	Zebrafish memiliki mediator inflamasi, sel, dan reseptor yang menyerupai mamalia. Inflamasi dapat diinduksikan pada larva atau zebrafish dewasa	Uji aktivitas antiinflamasi berbagai penyakit
Luka sayat (Naomi, 2021)	Zebrafish memiliki kapasitas regenerasi kulit yang cepat.	Pengujian obat luka

Penyakit pada kulit yang memiliki salah satu gejala berupa inflamasi lebih banyak muncul pada kondisi penyakit kronis. Psoriasis, alergi dan sejenisnya adalah penyakit yang sampai saat ini tidak ada obat penyembuhnya. Terapi hanya terbatas pada mengurangi gejala inflamasi. Kondisi ini yang membuat penelitian skrining obat baru untuk antiinflamasi terus dilakukan (Rodrigo, 2020). Penggunaan zebrafish untuk pengamatan molekular mediator inflamasi dan sitokin pro inflamasi menjadi satu terobosan penting penelitian obat antiinflamasi yang efektif. Sedangkan, karakteristik kecepatan regenerasi sel pada zebrafish mempermudah peneliti mengamati efek bahan yang dapat dikembangkan menjadi agen yang mempercepat penutupan luka.

2.3. Uji Toksisitas Menggunakan Zebrafish

Zebrafish banyak digunakan pada penelitian toksikologi untuk mengevaluasi keamanan obat dan senyawa kimia. Zebrafish sensitif terhadap toksikan lingkungan sehingga mampu memunculkan gejala toksisitas dalam waktu cepat dan pada konsentrasi toksikan rendah. Beberapa pengujian toksisitas menggunakan zebrafish ada pada tabel Tabel 5.

Tabel 5. Jenis uji toksisitas menggunakan zebrafish.

Pemodelan	Rasionalisasi	Penggunaan
Uji toksisitas akut (Von Helfeld, 2020)	Embrio dan larva zebrafish dipaparkan pada berbagai konsentrasi suatu bahan kimia untuk mengukur toksisitas akut.	Mendapatkan dosis letal dan abnormalitas organ
Uji toksisitas kronis (Ma, 2023)	Embrio dan larva dipaparkan dengan konsentrasi lebih kecil untuk meneliti efek jangka panjang penggunaan suatu bahan pada pertumbuhan, reproduksi, dan perilaku hewan coba	Mendapatkan data skrining efek merugikan bahan uji yang dipaparkan jangka panjang

Uji neurotoksik (Wang, 2022)	Zebrafish dipaparkan pada suatu bahan uji kemudian diamati perubahan perilaku, aktivitas motorik, kemampuan menghindari predator dan sejenisnya	Perubahan perilaku menunjukkan adanya gangguan pada perkembangan dan fungsi saraf
Uji hepatotoksitas (Katoch, 2020)	Larva zebrafish transparan sehingga bisa diamati menggunakan teknik <i>real-time imaging</i> . Zebrafish juga memiliki enzim sitokrom P-450 yang memungkinkan biotransformasi obat dengan jalur yang mirip dengan mamalia.	Pengujian efek bahan uji terhadap hepar, uji biotransformasi obat
Kardiotoksitas (Wang, 2021)	Analisis transkriptomik mengindikasikan bahwa <i>NOTCH signaling pathway</i> dapat berkorelasi dengan kardiotoksitas pada embrio zebrafish. <i>NOTCH signaling</i> menghasilkan pembengkakan pericardium, fibrosis miokard, dan kongesti jantung.	Uji toksisitas obat terhadap organ jantung
Analisis efek toksikan pada respon molekuler dan genetik (Audira, 2021; Wang, 2021)	Respon molekuler dapat diukur menggunakan Teknik proteomik dan menggunakan <i>real-time PCR</i> . Biomarker yang dipilih untuk pengamatan adalah biomarker yang relevan dan juga ada pada manusia pada kondisi tersebut.	Identifikasi biomarker yang muncul akibat paparan toksikan sehingga mekanisme toksisitas dapat ditelusuri
Analisis toksisitas pada organ dengan pengamatan <i>imaging</i> (Qin, 2024)	Efek toksikan dapat diamati secara visual dengan mikroskop fluoresens pada organ dan jaringan zebrafish	Menghasilkan data perubahan morfologi dan fisiologi jaringan dan organ

Bahan uji toksisitas pada berbagai penelitian antara lain obat-obatan, nanopartikel, hormon, pencemar lingkungan. Zebrafish yang digunakan bisa dalam bentuk larva, embrio, dan zebrafish dewasa. Masa hidup yang singkat, perkembangan organ yang cepat, dan sensitivitas tinggi membuat zebrafish menjadi pilihan skrining uji toksisitas. Berbagai metode pengamatan biomarker toksisitas telah dikembangkan dan dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya (Ma, 2023; Audira, 2021).

2.4. Manipulasi Genetik Zebrafish

Teknik seperti CRISPR-Cas9, TALENs, dan *morpholino antisense oligonucleotide* digunakan untuk menciptakan *gene knockout* dan *knockdown* pada zebrafish. Modifikasi genetik ini membantu mengukur peran gen spesifik pada penyakit dan efek obat. Beberapa contoh cara manipulasi genetik zebrafish ada pada Tabel 6.

Tabel 6. Beberapa teknik manipulasi gen pada zebrafish.

Pemodelan	Rasionalisasi	Penggunaan
CRISPR-Cas9 (Rubini, 2020)	Sistem ini menggunakan <i>guide RNA</i> (gRNA) untuk mengarahkan Cas9 nuclease ke lokasi genomik spesifik dan menghasilkan pemecahan ikatan <i>double stranded</i> . Pemecahan ini diperbaiki menggunakan <i>non-homologous end joining</i> (NHEJ) atau <i>homology-directed repair</i> (HDR)	Mutasi gen target
<i>Transcription activator-like effector nucleases</i> (TALENs) (Li, 2021)	TALENs merupakan protein yang mengikat untaian DNA spesifik dan menghasilkan pemecahan <i>double stranded</i> . Pemecahan ini diperbaiki menggunakan NHEJ atau HDR	Penelitian peran gen tertentu pada efek dan toksisitas obat
<i>Morpholino antisense oligonucleotide</i> (Dulla, 2021)	Morpholino adalah molekul sintetik yang mengikat untaian <i>complementary DNA</i> , memblokir translasi dan <i>splicing</i> . Perubahan genetik yang dihasilkan berupa <i>gene knockdown</i>	Penelitian fungsi gen pada penelitian efek obat
Transgenesis (Choe, 2021)	Transgenesis merupakan insersi DNA asing ke dalam genom zebrafish. Proses ini menggunakan mikroinjeksi plasmid DNA atau <i>bacterial artificial chromosom</i> (BAC) ke dalam embrio zebrafish	Zebrafish transgenik digunakan untuk penelitian regulasi gen dan mekanisme kerja obat.

Teknik tersebut memerlukan keahlian spesifik pada bidang genomik. Zebrafish transgenik yang dihasilkan dapat digunakan untuk berbagai penyakit. Zebrafish transgenik dewasa yang transparan sangat ideal digunakan untuk pengujian obat dengan pengamatan langsung pada fungsi semua organ pada kondisi hewan masih hidup. Namun, kelemahan transgenik adalah masa hidupnya jauh lebih pendek dari zebrafish normal (Choe, 2021).

2.5. Tantangan Penentuan Dosis Pengujian Obat Pada Zebrafish

Penelitian menggunakan zebrafish memerlukan teknik khusus pada penentuan dosis. Obat yang dipaparkan akan dilarutkan dalam air aquarium tempat zebrafish dipelihara. Larva dan embrio zebrafish dapat menyerap obat melalui kulit dan insang. Obat yang paling sesuai untuk penelitian menggunakan zebrafish adalah obat-obat yang dapat larut sempurna dalam air. Obat yang tidak larut air tidak dapat diformulasi menjadi sejenis kosolven, suspensi, atau emulsi karena akan mempengaruhi pH optimal air untuk kehidupan zebrafish. Pada awal pengujian, sebaiknya dilakukan percobaan dosis optimal yang dapat menghasilkan pengukuran efek yang benar. Usia, jenis kelamin, dan berat badan zebrafish yang digunakan sebaiknya yang setara supaya standar deviasi hasil pengamatan lebih rendah.

3. KESIMPULAN

Zebrafish dapat digunakan untuk berbagai penelitian skrining uji aktivitas farmakologi dan toksikologi obat atau bahan uji yang larut air. Uji aktivitas farmakologi menggunakan zebrafish meliputi pengujian obat pada model zebrafish yang diinduksi kanker, gangguan saraf, penyakit metabolik, gangguan otot dan tulang. Uji toksisitas menggunakan zebrafish dapat dilakukan pada uji toksisitas akut, kronis, dan uji toksisitas khusus.

4. UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman yang telah mendanai penelitian ini melalui skema Hibah Penelitian Fakultas.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Audira, G., Lai, Y.-H., Huang, J., Chen, K. H.-C., & Hsiao, C.-D. 2021. Phenomics approach to investigate behavioral toxicity of environmental or occupational toxicants in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Current Protocols*. 1 (e223): 1-18.
- Biagini, V., Busi, F., Anelli, V., Kerschbamer, E., Baghini, M., Gurrieri, E., Notarangelo, M., Pesce, I., van Niel, G., D'Agostino, V.G., et al. 2022. Zebrafish Melanoma-Derived Interstitial EVs Are Carriers of ncRNAs That Induce Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* 23(5510): 1-20.
- Bowley, G., Kugler, E., Wilkinson, R., Lawrie, A., van Eeden, F., Chico, T. J. A., Evans, P. C., Noël, E. S., & Serbanovic-Canic, J. 2022. Zebrafish as a tractable model of human cardiovascular disease. *British Journal of Pharmacology*. 179(5): 900-917.
- Choe, C.P., Choi, S.Y., Kee, Y. et al. 2021. Transgenic fluorescent zebrafish lines that have revolutionized biomedical research. *Lab Anim Res.* 37(26): 1-29.
- David, I. L. 2019. Animal experimentation: implementation and application of the 3Rs. *Emerg Top Life Sci.* 3 (6): 675-679.

- Dulla K., Slijkerman R., Diepen H.C., Adamson P.A., Vieze E. 2021. Antisense oligonucleotide-based treatment of retinitis pigmentosa caused by USH2A exon 13 mutations. *Molecular Therapy*. 29(8): 2441-2455.
- Fazio, M., Ablain, J., Chuan, Y. et al. 2020. Zebrafish patient avatars in cancer biology and precision cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 20: 263–273.
- Fan, X., Han, J., Zhu, L., Chen, Z., Li, J., Gu, Y., Wang, F., Wang, Tao, Y., Yunyun, S. 2020. Protective Activities of *Dendrobium huoshanense* Polysaccharide against High-Cholesterol Diet-Induced Atherosclerosis in Zebrafish. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020(8365056):1-10.
- Franco, G., Usai, A., Funel, N., Palmeri, M., Montesanti, I.E.R., et al. 2021. Use of zebrafish embryos as avatar of patients with pancreatic cancer: A new xenotransplantation model towards personalized medicine. *World Journal of Gastroenterology*. 26(21): 2792–2809.
- Ferreira, M.K.A., Silva, A.W., Neto, E.V., Campos, A.R., Santos, S.A.A.R. 2020. Anxiolytic-like effect of chalcone N-4'[(2E)-3-(3-nitrophenyl)-1-(phenyl)prop-2-en-1-one] acetamide on adult zebrafish (*Danio rerio*): Involvement of the 5-HT system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 526(2): 505-511.
- Fu, S.Q., Wang, Z.Y., Jiang, Z.M., Bi, Z.M., Liu, E.H. 2020. Integration of Zebrafish Model and Network Pharmacology to Explore Possible Action Mechanisms on *Morinda officinalis* for Treating Osteoporosis. *Biochemistry and Biodiversity*. 17(e2000056):1-18.
- Hellfeld, R., Brotzmann, K., Baumann, L. et al. 2020. Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Sci Eur*. 32(122): 1-18.
- Huang, J., Feng, Y., Zhao, B., Gou, B., Xie J. 2024. Spatiotemporal Visualization of Paraquat Distribution, Toxicokinetics, and Its Detoxification in Zebrafish Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging. *Chem. Res. Toxicol*. 37(2):385–394.
- Katoch S., Patial V. 2021. Zebrafish: An emerging model system to study liver diseases and related drug discovery. *Journal of Applied Toxicology*. 41(1):33-51.
- Li, Y., Zhao, T.T., Liu, Y., Lin, H., Li, S., Zhang, Y. 2021. Knockout of *tac3* genes in zebrafish shows no impairment of reproduction. *General and Comparative Endocrinology*. 311: 113839.
- Longkumer, S., Jamir, A., Pankaj, P. 2022. Maintenance and Breeding of Zebrafish under Laboratory Conditions for Animal Research. *Agricultural Science Digest*. 44(3): 551-555. <https://10.18805/ag.D-5599>.

- Lumaquin, D., Johns, E., Montal, E., Weiss, J.M., Abuhashem, D.O., White, R.M. 2021. An in vivo reporter for tracking lipid droplet dynamics in transparent zebrafish. *eLife*. 10(e64744).
- Mohammadi, H., Manouchehri, H., Changizi, R. et al. 2020. Concurrent metformin and silibinin therapy in diabetes: assessments in zebrafish (*Danio rerio*) animal model. *J Diabetes Metab Disord*. 19: 1233–1244.
- Naomi, R., Bahari, H., Yazid, M.D., Embong, H.; Othman, F. 2021. Zebrafish as a Model System to Study the Mechanism of Cutaneous Wound Healing and Drug Discovery: Advantages and Challenges. *Pharmaceuticals*. 14(1058): 1-19.
- Ma, I., Yin, Z., Xie, X., Xu, Y., Chen, Y., Huang, Y., Li, Z., Zhu, X. 2023. Metabolomics and mass spectrometry imaging reveal the chronic toxicity of indoxacarb to adult zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Journal of Hazardous Materials*. 453(131304): 1-12.
- Patton, E.E., Zon, L.I., Langenau, D.M. 2021. Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. *Nat Rev Drug Discov*. 20(2021): 611–628.
- Rodrigo, Z., Carla, D. B., Maria M.C. 2020. Zebrafish as a model for inflammation and drug discovery. *Drug Discovery Today*. 25(12): 2201-2211.
- Raby, L., Völkel, P., Le Bourhis, X., Angrand, P.O. 2020. Genetic Engineering of Zebrafish in Cancer Research. *Cancers*. 12(2168): 1-37.
- Rubbini, D., Cornet, C., Terriente, J., Donato, V.D. 2020. Advancing the Science of Drug Discovery CRISPR Meets Zebrafish: Accelerating the Discovery of New Therapeutic Targets. *Slas Discovery*. 25(6): 552-567.
- Saito, Y., Nakamura, S., Chinen, N., Shimazawa, M., Hara, H. 2020. Effects of anti-osteoporosis drugs against dexamethasone-induced osteoporosis-like phenotype using a zebrafish scale-regeneration model. *Journal of Pharmacological Sciences*. 143(2): 117-121.
- Scott, C. B. 2021. A zebrafish-centric approach to antiepileptic drug development. *Discovery Model Mechanism*. 14 (7): 1-14.
- Tsang, B., Ansari, R., Gerlai, R.T. 2020. Maintenance and breeding of zebrafish, with some ethological and ecological considerations in mind, Robert T. Gerlai, *Behavioral and Neural Genetics of Zebrafish*. Academic: 17-32.
- Smolińska, K., Sobczyński, J., Szopa, A. et al. 2024. Innovative high fat diet establishes a novel zebrafish model for the study of visceral obesity. *Sci Rep*. 14(3012): 1-15.
- Vaz Rita, L., Outeiro, T.F., Ferreira, J. J. 2018. Zebrafish as an Animal Model for Drug Discovery in Parkinson's Disease and Other Movement Disorders: A Systematic Review. *Frontiers in Neurology*. 9: 1-23.

- Verderio, P., Lecchi, M., Ciniselli, C.M., Shishmani, B., Apolone, G., Manenti, G. 2023. 3Rs Principle and Legislative Decrees to Achieve High Standard of Animal Research. *Animals*. 13(277): 1-14.
- Wang, D., Yu, Z., Fan, Z., Fang, Y., He, L., Peng, M., Chen, Y. 2021. Cardiac developmental toxicity and transcriptome analyses of zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to Mancozeb, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 226(112798): 1-11.
- Wang, X.M Bao, Z.J., Jie, H.K., Fen, W., Feng, L.C. 2021. Advances of Zebrafish in Neurodegenerative Disease: From Models to Drug Discovery. *Frontiers in Pharmacology*. 12:1-23.
- Wang, K., Wang, C., Wang, J., Dong, Y., Che, W., Li X.. 2022. Acute toxicity of broflanilide on neurosecretory system and locomotory behavior of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*. 305(135426): 1-11.
- Wasala, N. B., Chen, S. J., & Duan, D. 2020. Duchenne muscular dystrophy animal models for high-throughput drug discovery and precision medicine. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 15(4): 443-445.
- Yi, Z.N., Chen, X., Ma, A.C. 2022. Modeling leukemia with zebrafish (*Danio rerio*): Towards precision medicine. *Experimental Cell Research*. 421(2)113401: 1-18.
- Yuan, X., Huang, L., Lei, J., Long, Y., Li, C. 2020 Study on Anti-Inflammatory Effect and Major Anti-Inflammatory Components of PSORI-CM02 by Zebrafish Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 5604654: 1-10.