

# Princípios bioéticos aplicados a los estudios ecotoxicológicos acuáticos

Josielma dos Santos Silva<sup>1</sup>, Iolanda Karoline Barros dos Santos Rocha<sup>2</sup>, Lucenilde Carvalho de Freitas<sup>3</sup>, Natália Jovita Pereira<sup>4</sup>, Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta<sup>5</sup>

## Resumen

La ecotoxicología acuática analiza los efectos adversos de los contaminantes químicos en la biota, utilizando animales en las pruebas de laboratorio. En este trabajo se tuvo como objetivo analizar la adecuación de las pruebas de laboratorio realizadas con organismos acuáticos basadas en los principios de las 3Rs. Se realizaron revisiones en 20 artículos sobre Ecotoxicología acuática, publicados en el periodo de 2010 a 2014. Se verificó el número de animales utilizados en las pruebas ecotoxicológicas y en la aclimatación. La investigación fue aprobada por el comité de ética y para la utilización de anestésicos. Los resultados indican que los principios Refinamiento y Sustitución, del programa de las 3Rs, fueron los más encontrados en los estudios, pero que la mayoría no citó aprobación de los protocolos experimentales por un comité de ética, ni para el uso de anestésicos en los organismos durante los experimentos. Las investigaciones publicadas indican la necesidad de reducir el número de organismos en las biopruebas, así como la aplicación de los principios de la bioética en la experimentación realizada con los organismos acuáticos.

**Palabras-clave:** Ecotoxicología. Experimentación animal. Bioética. Ética-Animales.

## Resumo

### Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos

A ecotoxicologia aquática analisa os efeitos adversos dos poluentes químicos na biota, utilizando-se de animais nos ensaios laboratoriais. Neste trabalho, objetivou-se analisar a adequação dos ensaios laboratoriais realizados com organismos aquáticos com base nos princípios dos 3 R. Foram realizadas revisões de 20 artigos sobre ecotoxicologia aquática, publicados no período de 2010 a 2014. A análise verificou o número de animais utilizados nos ensaios ecotoxicológicos, aclimatação, aprovação da pesquisa por comitê de ética e uso de anestésicos. Os resultados indicam que os princípios de refinamento e substituição, do programa dos 3R, foram os que mais ocorreram nas pesquisas, porém a maioria delas não citou aprovação dos protocolos experimentais por um comitê de ética nem o uso de anestésicos nos organismos durante os experimentos. As pesquisas publicadas indicam a necessidade de redução do número de organismos nos bioensaios, bem como a aplicação dos princípios bioéticos na experimentação realizada com organismos aquáticos.

**Palavras-chave:** Ecotoxicologia. Experimentação animal. Bioética. Ética-Animais.

## Abstract

### Bioethical principles applied to aquatic ecotoxicological studies

Aquatic ecotoxicology analyzes the adverse effects of chemical pollutants in the biota. The aim of this study was to analyze the adequacy of the laboratory trials with aquatic organisms, based on the principles of the 3Rs. Twenty articles on aquatic ecotoxicology published from 2010 to 2014 were reviewed. The numbers of animals utilized in ecotoxicology trials, acclimatization, research approved by the committee on ethics and utilization of anesthetics were verified. The findings indicate that the principles of refinement and replacement, of the 3Rs program, were the most encountered in the research; while most did not cite approval of experimental protocols by an ethics committee, nor the use of anesthetics on the organisms during the experiments. The research published indicates a need to reduce the number of in the bio-trials, and to apply principles of bioethics in experimentation with aquatic organisms.

**Keywords:** Ecotoxicology. Animal experimentation. Bioethics. Ethics-Animals.

1. **Graduanda** josielmasilva@hotmail.com.br 2. **Graduanda** iolanda.rbarros@gmail.com 3. **Graduanda** lucenildecf@hotmail.com 4. **Graduanda** natalia.jovita@hotmail.com 5. **Doutora** raifortes@gmail.com – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís/MA, Brasil.

## Correspondência

Josielma dos Santos Silva – Rua 6, quadra 92, bloco A, casa 3, Cidade Olímpica CEP 65058-501. São Luís/MA, Brasil.

Declararam não haver conflito de interesse.

La ecotoxicología describe la relación entre los contaminantes químicos y el ambiente en que son liberados y los organismos que allí viven. Estudios más profundos de esas sustancias se hacen necesarios, a fin de que sus riesgos potenciales puedan ser minimizados y medidas saneadoras puedan ser efectivizadas, de modo de atenuar sus probables impactos<sup>1</sup>. Luego, la ecotoxicología se presenta como herramienta destinada a analizar la exposición de los diversos cenobiontes en el medio en que fueron insertados<sup>2</sup> y los efectos adversos de contaminantes exógenos al ambiente y en los organismos acuáticos<sup>3</sup>.

La evaluación ecotoxicológica es de extrema importancia en el control, reglamentación y clasificación de las sustancias tóxicas en cuanto a su potencial de riesgo ambiental. La identificación de los efectos y la evaluación de la relación de la dosis-respuesta son etapas iniciales en el proceso de análisis del riesgo ambiental<sup>4</sup>. Muchos ensayos también son realizados con el propósito de evaluar tanto la sensibilidad relativa de organismos acuáticos en relación a determinado agente tóxico en cuanto a la eficiencia de diferentes métodos de tratamiento de efluentes industriales<sup>5</sup>.

La bioética exige a conjunción de varias disciplinas, buscando la correcta utilización de los conocimientos adquiridos por la ciencia, así como valores éticos y hechos biológicos. Su primera y más conocida línea teórica, la bioética principialista es orientada por los principios de la beneficencia, de la no maleficencia, de la autonomía y de la justicia<sup>6</sup>. La beneficencia es definida como el análisis de los beneficios generados al individuo participante de la investigación y posteriormente a la sociedad; la no maleficencia es caracterizada por evitar daños considerados consecuencias de la realización del estudio, los cuales podrían afectar al sujeto de la investigación; la autonomía es definida como el respeto a la capacidad de la elección del individuo; y la justicia está relacionada a una distribución equitativa de los beneficios a los seres<sup>7</sup>. En relación a los principios propuestos por la Declaración Universal de la Bioética y los Derechos Humanos (DUBH)<sup>8</sup>, beneficio y daño se refieren a la maximización de los bienes y a la minimización de los daños a los individuos del estudio y otros implicados; y a la protección del medio ambiente, la biosfera y la biodiversidad, caracterizada por la comprensión de la interdependencia entre seres humanos y otras formas de vida.

En muchos casos, los principios de la bioética – que incluyen, además de la teoría del principialismo y de la DUBH<sup>8</sup>, las ideas de los 3 R, propuestas por los estudiosos Russell y Burch<sup>9</sup> – no son observados

cuando se trabaja con la mayoría de los organismos utilizados en procedimientos, o esas informaciones no son citadas en los artículos científicos publicados. Además, las discusiones bioéticas proponen diversas metodologías alternativas, cuyo desarrollo e implantación en las instituciones que utilizan animales en trabajos científicos son procesos complejos y amplios<sup>10</sup>.

El uso de animales en la investigación ha sido razón de diversas discusiones bioéticas enfocadas en el número elevado de animales y en el sufrimiento causado hacia ellos. El programa de las 3 R –reducción (*reduction*), refinamiento (*refinement*) y sustitución (*replacement*)– tiene como objetivo disminuir el número de animales, minimizar su dolor, su falta de comodidad y proporcionar alternativas para la sustitución de los exámenes in vivo<sup>10</sup>. Y, con base en los principios de las 3 R, este trabajo busca analizar la adecuación de ensayos de laboratorio realizados sobre organismos acuáticos en artículos publicados entre 2010 y 2014.

## La bioética y sus principios

El término “bioética” fue difundido por el oncólogo y biólogo norteamericano Van Rensselaer Potter en su libro “Bioethics: bridge to the future”<sup>11</sup>. La disciplina fue creada con el objetivo de posibilitar que las ciencias biológicas se tornen mantenedoras de la cualidad y mejoría de la vida de las futuras generaciones<sup>12</sup>. Con el avance de las tecnologías, creció el uso de animales en experimentos científicos, tornándose necesaria la ampliación de las discusiones éticas acerca de las investigaciones. Como ya hemos mencionado, el zoólogo William M. S. Russell, junto con el microbiologista Rex L. Burch, propuso en 1959 los principios de las 3 R, conocidos como reducción (*reduction*), refinamiento (*refinement*) y sustitución (*replacement*)<sup>13</sup>. Tales principios redireccionan los trabajos científicos implicando la investigación con animales para el uso de modelos alternativos, con el fin de reducir la utilización de animales en experimentos, así como también el sufrimiento y el dolor que esos ensayos les causan<sup>14</sup>.

Históricamente, la discusión bioética estuvo más ligada a contextos médicos, tanto que, inicialmente, la formulación de los principios éticos orientados a la actividad científica se dio más en función de estudios implicando seres humanos. Tal concepción, más tarde conocida como la teoría principialista, es moldeada a partir de cuatro principios: beneficencia, de la no maleficencia, de la autonomía

y de la justicia<sup>15</sup>. La no maleficencia supone no hacer mal o evitar daños a los seres vivos; la beneficencia se refiere a la realización del bien y a la máxima reducción del mal que se le pueda causar al otro, reconociendo sus valores morales; la justicia tiene a la equidad como eje, esto es, todos deben ser atendidos de la misma forma; y el respeto a la autonomía es descrito como la aceptación de la autodecisión operante en las situaciones del medio<sup>16</sup>, entendiendo a la autonomía como la capacidad de elección propia del individuo<sup>7</sup>.

Otro marco fundamental, relacionado con la organización y el direccionamiento de las cuestiones bioéticas, fue la *Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos*, aprobada en octubre de 2005 por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (Unesco)<sup>8</sup>. En el documento constan algunos principios, como la dignidad humana y los derechos humanos, la autonomía y la responsabilidad individual, consentimiento, privacidad y confidencialidad, responsabilidad social y salud. Además, cabe resaltar otros dos preceptos contemplados en la *DUBDH*, que son de particular interés en la investigación científica: beneficio y daño, referente a la maximización de los bienes y la minimización de los daños a los participantes de la investigación y a otros implicados; protección del medio ambiente, de la biosfera y de la biodiversidad, que presupone la interdependencia de los sujetos humanos con las otras formas de vida.

Tales principios son mucho más aplicados en estudios vinculados a los seres humanos que a los animales de las diferentes categorías taxonómicas, razón por la cual todavía persisten inúmeras cuestiones éticas a ser discutidas, entre las cuales se incluye una, bastante pertinente a este artículo: ¿será que esos principios de la bioética pueden ser aplicados a todos los grupos de organismos?

### Los ensayos ecotoxicológicos acuáticos y la bioética

Con una alta demanda por nuevos productos tecnológicos y la continua destrucción de los recursos naturales por las acciones humanas, varios cenobiontes han sido incorporados al medio por vía directa o indirecta, en fuentes puntuales o difusas<sup>17</sup>. Estudios sobre estos pueden ser conducidos directamente en el ambiente o por bioensayos en laboratorio (pruebas experimentales con metodologías distintas), regulados, inclusive, por normas

nacionales o internacionales en cuanto a la utilización de organismos bioindicadores en exámenes de este tipo<sup>18</sup>. Los organismos acuáticos son usualmente utilizados en exámenes ecotoxicológicos por varios motivos<sup>19</sup>, entre ellos sus procesos fisiológicos, como la nutrición y respiración, ya que muchos respiran por las branquias, que están en contacto directo con el agua, lo que puede acarrear diversos contaminantes para el interior de estos organismos, causándoles alteraciones morfofisiológicas<sup>20</sup>.

Para la identificación de esos cambios morfofisiológicos (biomarcadores) en las especies acuáticas, es necesario el uso de técnicas de laboratorio capaces de evaluar el grado de contaminación de un área por cierto contaminada<sup>21</sup>. En esos bioensayos, es posible verificar daños a los organismos (que mueren o quedan inmóviles), estimándose la extensión de sus impactos en el ambiente y en los seres humanos<sup>22</sup>. Los principales organismos utilizados en esos estudios son los peces y los macro invertebrados bentónicos, como, por ejemplo, los crustáceos del género *Daphnia*, que son fácilmente cultivados *in situ* y presentan características reproductivas que satisfacen la finalidad de esos estudios<sup>23</sup>. En el caso de los peces, entre las especies consideradas estándar de referencia internacional está el *Danio rerio*, principalmente porque el secuenciamiento de su genoma es semejante a los demás vertebrados, inclusive a los seres humanos<sup>24</sup>.

Actualmente, la comunidad científica se ha concentrado en los aspectos éticos ligados a la investigación con animales de filo *Chordata* (subfilo *Vertebrata*), para el cual existe legislación brasilera específica<sup>25</sup>. Existen también comités de ética que evalúan estudios realizados con insectos cefalópodos, pero su atención todavía es restricta, ya que la legislación actual prioriza los organismos sensibles, que abarcan a los animales vertebrados, cuya sensibilidad es ampliamente reconocida por el medio científico<sup>26</sup>; ya los organismos considerados no sensibles entre los cuales se incluyen los invertebrados, no reciben la misma protección destinada a los seres sensibles<sup>27</sup>.

En la mayoría de las veces, las investigaciones que implican ensayos ecotoxicológicos (o con invertebrados, o con vertebrados) ocurren sin aprobación de los comités de ética. Además de eso, muchos investigadores del área de ecotoxicología acuática todavía mantienen poco contacto con la bioética, sea en su formación inicial, sea en su actuación de laboratorio. Esa situación necesita ser considerada y alterada para que pueda tener influencia positiva sobre los resultados de las investigaciones que

llegan a ser publicadas y que sirven de referencia a nuevos trabajos en el área.

Frente a lo aquí expuesto, se presentó como objetivo, en este trabajo, analizar la adecuación de los ensayos de laboratorio realizados con organismos acuáticos en artículos publicados en el período de 2010 y 2014, basado en los principios de las 3 R. En ese sentido, fueron objeto de análisis 20 artículos científicos publicados en 16 periódicos distintos, que abordan estudios ecotoxicológicos con animales de diferentes categorías taxonómicas, buscando la identificación de los principios bioéticos aplicados a la experimentación animal más difundidos entre los investigadores.

### Recorrido metodológico

Este estudio es revisión bibliográfica, cuyas informaciones fueron recolectadas en artículos científicos sobre los procedimientos realizados en ensayos ecotoxicológicos acuáticos producidos entre los años 2010 y 2014. Fueron analizados 20 artículos, a partir de la búsqueda definida sistemáticamente en las bases de datos registradas por la Coordinación de Perfeccionamiento de Personal de Nivel Superior (Capes) y el Scientific Electronic Online (SciELO), conteniendo los siguientes descriptores: “ecotoxicología”; “estudios ecotoxicológicos”; “bioética”; “ética”.

Primeramente, en la organización de los datos, se realizó la lectura de los resúmenes de las 20 publicaciones científicas seleccionadas, a fin de identificar los objetos de estudio de trabajos, priorizando los ensayos ecotoxicológicos<sup>28,29</sup>. Fueron observados por lo menos uno de los principios bioéticos en todos los 20 trabajos. La técnica adoptada por las autoras en el análisis de contenido se basó en la lectura de los trabajos científicos escogidos mediante el examen de las principales informaciones, como número de animales utilizados en los ensayos ecotoxicológicos, fase de desarrollo y aclimatación, origen de los organismos (*in situ* o *ex situ*) e investigación aprobada por el comité de ética. Por el análisis de contenido de cada trabajo, se verificó la adecuación de esos datos a los principios de las 3 R (*replacement, reduction e refinement*)<sup>13</sup>. El “refinamiento” fue analizado teniendo como base la aclimatación, la investigación aprobada por el comité de ética, protocolos metodológicos de la ABNT (NBR 12713/2009<sup>30</sup> y 13373/2010<sup>31</sup>), la utilización de anestésicos. La técnica de identificación de los principios bioéticos de William S. Russell y Rex L. Burch<sup>9</sup> fue el análisis de contenido “temático-categorial”, implicando las siguientes etapas: preanálisis; exploración del material o codificación; tratamiento de los resultados; inferencia e interpretación. En la organización de los datos referentes a las producciones científicas, fueron utilizados *software* estadísticos, con el fin de obtener un gráfico de porcentajes. Los 20 trabajos están listados en el Cuadro 1, presentado a continuación.

**Cuadro 1.** Artículos publicados entre los años 2010 y 2014 y utilizados en la revisión bibliográfica de este estudio

Nº	Autores	Nombre del artículo	Revista	Año
1	Rechenmacher C, Siebel AM, Goldoni A, Klauck CR, Sartori T, Rodrigues MT, Rodrigues MAS, Gehlen G, Ardenghi PG, Silva LB <sup>28</sup>	A multibiomarker approach in rats to assess the impact of pollution on Sinos River, Southern Brazil	Brazilian Journal of Biology	2010
2	Nepomuceno JC, Silva AC <sup>32</sup>	Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos periféricos de bagre pintado ( <i>Pimelodus maculatus</i> ) del río Paranaíba	Perquirere: Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do Unipam	2010
3	Brandolt TD, Lobo E <sup>33</sup>	Evaluación ecotoxicológica utilizando bioensayos con <i>Daphnia magna</i> en agua de labranza de arroz en el municipio de Mostardas, RS, Brasil	Tecno-Lógica	2010
4	Barbola IF, Moraes MFPG, Anazawa TM, Nascimento EA, Sepka ER, Polegatto CM, Milléo J, Schühli GS <sup>34</sup>	Evaluación de la comunidad de macroinvertebrados acuáticos como herramienta para el monitoreo de un reservorio en la cuenca del río Pitangui, Paraná, Brasil	Iheringia, Série Zoologia	2011

Continúa

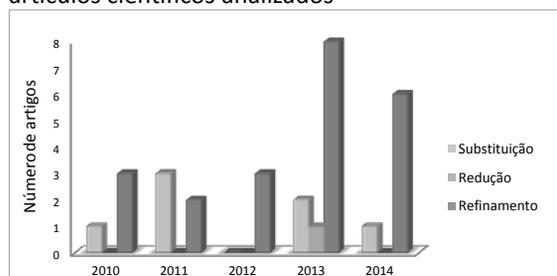
Nº	Autores	Nombre del artículo	Revista	Año
5	Morais AV, Cortez FS, Bretas ES, Cesar E, Pereira CDS, Santos AR <sup>35</sup>	Evaluación de la cualidad ambiental del río Itagaré, Bertioga-SP, con base en exámenes de toxicidad e indicadores microbiológicos de capacidad de baño	O Mundo da Saúde	2011
6	Mendes BG, Budziak D, Stolberg J, Peixer ZI, Dalmarco JB, Simionatto EL, Pedrosa RC, Felipe KB, Ogawa J, Pegoraro C, Scheffer L, Besen MR, Oliveira LJGG, Geremias R <sup>36</sup>	Estudio de cualidad de las aguas del río Marombas (SC/Brasil), utilizando parámetros físico-químicos y bioensayos	Revista de Ciências Ambientais	2011
7	Holanda JN, Maciel AP, Santos RL <sup>37</sup>	Evaluación ecotoxicológica del agua de labranza de la purificación de biodiesel de soja metílico utilizando <i>Danio rerio</i> con el organismo de prueba	Boletim do Laboratório de Hidrobiologia	2012
8	Damato M, Barbieri E <sup>38</sup>	Estudio de la toxicidad aguda y alteraciones metabólicas provocadas por la exposición del cadmio sobre el pez <i>Hyphessobrycon callistus</i> utilizando como indicador de salud ambiental	O Mundo da Saúde	2012
9	Mannarino CF, Moreira JC, Ferreira JA, Arias ARL <sup>39</sup>	Evaluación de impactos de efluente del tratamiento combinado de lejía de aterramiento de residuos sólidos urbanos y desagüe doméstico sobre la biota acuática	Ciência & Saúde Coletiva	2013
10	Mohr G, Lobo EA <sup>40</sup>	Evaluación de la eficiencia de un sistema de tratamiento del agua en una pequeña propiedad rural, utilizando bioensayos	Revista Jovens Pesquisadores	2013
11	Gaspar N, Gago J, Repolho T, Luís O <sup>41</sup>	Evaluación de la toxicidad de los barros de cal sobre los erizos de mar <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816). Perspectivas para las nuevas aplicaciones de estos residuos industriales	Revista da Unidade de Investigação do Instituto Politécnico de Santarém	2013
12	Hernandez OD, Castro F, Paez M <sup>42</sup>	Bioacumulación de mercurio en larvas de anuros en la zona afectada por la minería de oro en el río Dagua, Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia	Acta Biológica Colombiana	2013
13	Canto T, Pich CT, Geremias R <sup>43</sup>	Bioensayos de toxicidad en los coladores de aterramiento sanitario del municipio de Araranguá (Santa Catarina, Brasil)	Revista Biociências	2013
14	Sousa DBP, Almeida ZS, Carvalho-Neta RNF <sup>44</sup>	Biomarcadores histológicos en dos especies de bagres estuarianos de La costa la costa maranaense, Brasil	Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia	2013
15	Jacobowski AC, Zobiolo NN, Padilha PM, Moreno SE, Arruda EJ <sup>45</sup>	Efecto mutagénico del edetato de cobre ([Cu(EDTA)]-2) libre y nanoencapsulado en el ratón doméstico ( <i>Mus musculus</i> ) y peces	Ecotoxicology and Environmental Contamination – EEC	2013
16	Rezende KFO, Santos RM, Santos RM, Shimada JCB, Silva JRMC, Muniz CASD <sup>46</sup>	Histopatología de las branquias de tilapia de Nilo <i>Oreochromis niloticus</i> , provenientes de la represa Billings, área de protección ambiental Bororé-Colônia	Atlas de Saúde Ambiental – ASA	2013

Nº	Autores	Nombre del artículo	Revista	Conclusão
				Año
17	Pereira DP, Santos DMS, Carvalho Neta AV, Cruz CF, Carvalho Neta RNF <sup>47</sup>	Alteraciones morfológicas en branquias de <i>Oreochromis niloticus</i> (Pisces, Cichlidae) como biomarcadores de polución acuática en la laguna de Jansen, São Luís, MA (Brasil)	Bioscience Journal	2014
18	Benites LM, Doncato KB, Minho TS, Perazzo GX <sup>48</sup>	Evaluación del potencial mutagénico de cobre del agua del río Uruguay	Ciência e Natura	2014
19	Franco-Bernardes MF, Maschio LR, Azeredo-Oliveira MTV, Almeida EA <sup>49</sup>	Biochemical and genotoxic effects of a commercial formulation of the herbicide tebuthiuron in <i>Oreochromis niloticus</i> of different sizes	Ecotoxicology and Environmental Contamination – EEC	2014
20	Nour EAA, Candello FP, Santos EMR, Barretto AS, Domingues LM <sup>29</sup>	Tratamiento biológico de formaldehído: toxicidad residual monitoreada por bioensayos con <i>Daphnia similis</i>	Ecotoxicology and Environmental Contamination – EEC	2014

### Uso de los principios de la bioética en los ensayos ecotoxicológicos

Los datos obtenidos en los análisis de los artículos científicos anteriormente enlistados demuestran que hay cierta preocupación en los autores con el programa de las 3 R, ya que la mayoría de los trabajos presentaba algún tipo de información relacionada al cuidado de los animales utilizados en estudios ecotoxicológicos. De acuerdo con ese programa, los conceptos encontrados fueron refinamiento, sustitución y reducción (Gráfico 1), de los cuales los dos primeros aparecerán con mayor frecuencia.

**Gráfico 1.** Distribución de las 3 R en relación de los artículos científicos analizados



En relación al número de animales usados en los procedimientos ecotoxicológicos, 4 artículos no citaron la cantidad de animales, aunque los demás trabajos (16) presentaron esa información. La mayoría de los trabajos analizados (14) utilizó entre 11 y 50 individuos en las investigaciones; todavía, 4 trabajos utilizaron entre 300 y 18.473 ejemplares. Solamente un artículo científico utilizó hasta 10 individuos, adecuándose al concepto “reducción”

del programa 3 R<sup>50</sup>. El gran número de organismos usados en un experimento científico puede ser explicado por la ausencia de legislación que limita el uso de invertebrados en estudios científicos<sup>24</sup>, a la vista que esos estudios fueron realizados con macroinvertebrados acuáticos y semiacuáticos. Esos tipos de estudio, que usan millares de individuos, todavía no contemplan el programa de las 3 R<sup>29, 50</sup>.

Hasta el presente momento, la preocupación con los aspectos éticos se concentra en los ensayos con animales del filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*. Existen algunos grupos y comités de ética que también evalúan estudios realizados en insectos y cefalópodos. Tal hecho es, sin embargo, una excepción. En función de eso, también pueden ser usados, en lugar de los animales vertebrados, organismos inferiores en la escala zoológica, clasificados como no protegidos, caracterizando el concepto de “sustitución”. Un ejemplo de esto es el uso de la *Daphnia pulgans*, *Artemia salina* y abejas en estudios, principalmente de ecotoxicología<sup>51</sup>. De esa forma, 30% de los trabajos analizados que usan especies como *Daphnia similis*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* y *Artemia sp.* Fueron evaluados como importantes en el ítem “sustitución” del programa de las 3 R.

Poco más de la mitad de los trabajos analizados (53%) informó que fue realizada la aclimatación de los organismos antes de los procedimientos ecotoxicológicos, indicando que se observó el principio de refinamiento, ya que los animales fueron mantenidos en condiciones que minimizaran su dolor y estrés<sup>52</sup>. Ese tipo de procedimiento es, inclusive, previsto por la legislación brasileña<sup>53</sup>. La aclimatación es caracterizada por duraderos ajustamientos

fisiológicos adaptativos de los organismos, que resultan en aumento de la tolerancia a las continuas o repetitivas exposiciones a varios estresadores climáticos, normalmente producidos bajo condiciones de campo<sup>54</sup>. La aclimatación y la reducción o alivio del dolor son consideradas mejoramientos en el cuidado de los animales, ya que los investigadores deben saber cómo evaluar y monitorear el dolor de modo de proporcionar tratamiento ético a los animales<sup>55</sup>. Además de las preocupaciones éticas, el dolor y el estrés de los animales acarrear variables indeseables de la investigación, ya que pueden interferir significativamente en la interpretación de los resultados de los estudios<sup>56</sup>.

La utilización de anestesia fue informada en 15% artículos analizados, indicando que se consideró el principio de refinamiento, una vez que esa técnica proporciona disminución del sufrimiento de los organismos utilizados en los experimentos<sup>52</sup>. Durante la práctica de algunos de los procedimientos de laboratorio, los animales son sometidos y variados tipos de dolor y sufrimiento; luego, deben ser sedados y anestesiados correctamente<sup>57, 58</sup>.

Es importante resaltar que 20% de los trabajos científicos realizados *in situ* recolectaron sangre periférica para la confección de fajas de láminas y, en seguida, los animales fueron devueltos a su *habitat*. Investigaciones de ese tipo –que efectúan la devolución de todos los organismos al ambiente, beneficiando tanto los investigadores cuanto a los animales investigados– son deseables porque disminuyen los impactos sobre la fauna local y producen informaciones más fidedignas sobre la real situación del *habitat* natural de las especies analizadas, lo que torna posible trabajar hasta con mamíferos y especies amenazadas de extinción<sup>59</sup>.

Poquísimos artículos (20%) citaron la aprobación de su protocolo experimental por un comité de ética institucional. La gran mayoría de los trabajos (80%) no informó tal aprobación, ni destacó que la investigación implicaba larvas de especies que se clasificaban en la categoría de “menor preocupación” por la International Union for Conservation of Nature (IUCN), y solamente 25% citaron el uso de protocolos estandarizados por la ABNT (NBR 12713/2009<sup>30</sup>

y 13373/2010<sup>31</sup>). Trabajos científicos implicando animales deben ser analizados por un comité de ética, cuya función es orientar y revisar protocolos, así como ampliar los conocimientos sobre la conducta moral apropiada para con los animales<sup>60</sup>. Es importante que el protocolo de experimentación sea analizado en cuanto al aspecto de las metodologías utilizadas, con el fin de identificar los impactos causados a los animales en relación al dolor, el sufrimiento, confinamiento, estrés y muerte<sup>14</sup>.

Los investigadores tienen la responsabilidad de someter sus protocolos de investigación de un comité de ética que garantiza la posibilidad de adaptar guías de buenas prácticas que aseguran el bienestar de los organismos sometidos al estudio. El uso de especies animales en diferentes contextos (desde pruebas ecotoxicológicas hasta la producción animal y gestión de poblaciones en el ámbito de programas de conservación) merece la observación de los principios de la bioética<sup>61</sup>, a fin de que la ciencia pueda evolucionar en el sentido de respetar todas las formas de vida del planeta.

## Consideraciones finales

La discusión sobre las metodologías y conceptos innovadores, introducidos en la investigación científica con animales, ha sido creciente en las publicaciones científicas en los últimos años. Todavía, en los trabajos publicados conteniendo resultados de exámenes ecotoxicológicos en ambientes acuáticos, aún persisten diversas cuestiones que precisan ser debatidas, tales como la necesidad concreta de aprobación de los protocolos experimentales por comités de ética; observación de los principios bioéticos junto a las metodologías de laboratorio; uso de anestesia para minimizar el sufrimiento de los animales; reducción del número de organismos en las pruebas de laboratorio, y adopción de métodos alternativos a la utilización del animal, sin afectar necesariamente el resultado de la investigación. Discutir ideas bioéticas es fundamental, y los principios de las 3 R deben ser considerados en la elaboración de proyectos y en las prácticas de la investigación científica actual en el área de ecotoxicología acuática.

## Referências

1. Stützer G, Guimarães G. Aspectos toxicológicos e ambientais relacionados com o uso de produtos fitossanitários. In: Zambolim L, Conceição MZ, Santiago T, organizadores. O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários. Viçosa: UFV; 2003. p. 69-84.

2. Carvalho NL, Pivoto TS. Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agrônômica. Monografias Ambientais. [Internet]. 2011 [acesso 6 fev 2015];2(2):176-92. Disponível: <http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/remoa/article/view/2315/1598>
3. Lombardi JV, Ferreira CM, Rodrigues EL. Toxicologia aquática. In: Ranzani-Paiva MJT, Takemoto RM, Lizama MAP, organizadores. Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Varela; 2004. p. 262-97.
4. United States Environmental Protection Agency. Short-term methods for estimating the toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. [Internet]. 4ª ed. Washington: EPA; 2002 [acesso 6 fev 2015]. Disponível: [http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/wet/upload/2007\\_07\\_10\\_methods\\_wet\\_disk3\\_ctf1-6.pdf](http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/wet/upload/2007_07_10_methods_wet_disk3_ctf1-6.pdf)
5. Metcalf L, Eddy HP. Wastewater engineering: treatment in reuse. [Internet]. 4ª ed. Boston: McGraw Hill; 2003 [acesso 6 fev 2015]. Disponível: [http://www.mumbaaidp24seven.in/reference/Ch\\_1WastewaterEngineering4thed\\_byMetcalfandEddy.pdf](http://www.mumbaaidp24seven.in/reference/Ch_1WastewaterEngineering4thed_byMetcalfandEddy.pdf)
6. Schatzmayr HG, Müller CA. As interfaces da bioética nas pesquisas com seres humanos e animais com a biossegurança. Ciênc Vet Tróp. [Internet]. 2008 [acesso 6 fev 2015];11(Supl 1):130-4. Disponível: <http://www.rcvt.org.br/suplemento11/130-134.pdf>
7. Silva JACD, Teixeira RKC, Monma CA, Neotti T. Perfil bioético dos anteprojetos enviados ao comitê de ética em pesquisa da Universidade do Estado do Pará. Rev. bioét. (Impr.). [Internet]. 2011 [acesso 6 fev 2015];19(2):563-75. Disponível: [http://revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista\\_bioetica/article/view/645/673](http://revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista_bioetica/article/view/645/673)
8. Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (Unesco). Declaração Universal sobre Bioética e Direitos Humanos. [Internet]. Paris: Unesco; 2006 [acesso 17 mar 2015]. Disponível: <http://unesdoc.unesco.org/images/0014/001461/146180por.pdf>
9. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. Londres: Ufaw ; 1992.
10. Cazarin KCC, Corrêa CL, Zambone FAD. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas – RBCF. [Internet]. 2004 [acesso 6 fev 2015];40(3):289-99. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v40n3/04.pdf>
11. Potter VR. Bioethics: bridge to the future. Upper Saddle River: Prentice Hall; 1971.
12. Clotet J. Por que bioética? Revista Bioética. [Internet]. 1993 [acesso 6 fev 2015];1(1):13-9. Disponível: [http://www.revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista\\_bioetica/article/view/474/291](http://www.revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista_bioetica/article/view/474/291)
13. Franco AL, Nogueira MNM, Guimarães KS, Frota MF, Fernandes CMS, Sena MC. Animal research: a bioethical reflection. Acta bioeth. [Internet]. 2014 [acesso 6 fev 2015];20(2):247-53. Disponível: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1726-569X2014000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1726-569X2014000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=en)
14. Feijó AGS, Sanders A, Centurião AD, Rodrigues GS, Schwanke CHA. Análise de indicadores éticos do uso de animais na investigação científica e no ensino em uma amostra universitária da área da saúde e das ciências biológicas. Sci Med. [Internet]. 2008 [acesso 6 fev 2015];18(1):10-9. Disponível: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/article/viewFile/2234/2807>
15. Hossne WS. Bioética: princípios ou referenciais. Mundo Saúde. [Internet]. 2006 [acesso 6 fev 2015];30(4):673-6. Disponível: [http://www.saocamilo-sp.br/pdf/mundo\\_saude/41/20\\_bioetica\\_principio.pdf](http://www.saocamilo-sp.br/pdf/mundo_saude/41/20_bioetica_principio.pdf)
16. Koerich MS, Machado RR, Costa E. Ética e bioética: para dar início à reflexão. Texto Contexto Enferm. [Internet]. 2005 [acesso 6 fev 2015];14(1):106-10. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/tce/v14n1/a14v14n1.pdf>
17. Andréa MM. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. Acta Zoológica Mexicana. [Internet]. 2010 [acesso 6 fev 2015];26(número especial 2):95-107. Disponível: <http://www.scielo.org.mx/pdf/azm/v26nspe2/v26nspe2a7.pdf>
18. Torres GA, González SP, Peña ES. Descripción anatómica, histológica y ultraestructural de la branquia e hígado de tilapia (*Oreochromis niloticus*). Int J Morphol. [Internet]. 2010 [acesso 6 fev 2015];28(3):703-12. Disponível: [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-95022010000300008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-95022010000300008&script=sci_arttext)
19. Montes CS, Ferreira MAP, Santos SSD, Von Ledebur EICF, Rocha RM. Branchial histopathological study of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) in the Guajará bay, Belém, Pará State, Brazil. Acta Scientiarum: Biological Sciences. [Internet]. 2010 [acesso 6 fev 2015];32(1):93-99. Disponível: <http://eduem.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/viewFile/4800/5085>
20. Cantanhêde SM, Medeiros AM, Ferreira FS, Ferreira JRC, Alves LMC, Cutrim MVJ et al. Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís-MA. Arq Bras Med Vet Zootec. [Internet]. 2014 [acesso 6 fev 2015];66(2):593-601. Disponível: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352014000200037&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352014000200037&script=sci_arttext)
21. Costa CR, Olivi P, Botta CMR, Espíndola ELG. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Quim Nova. [Internet]. 2008 [acesso 6 fev 2015];31(7):1820-30. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n7/v31n7a38.pdf>

22. Linde-Arias AR, Inácio AF, Novo LA, Albuquerque C, Moreira JC. Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large brazilian river, Paraíba do Sul. *Environmental Pollution*. [Internet]. 2008 [acesso 6 fev 2015];156(3):974-9. Disponível: [http://ac.els-cdn.com/S0269749108002522/1-s2.0-S0269749108002522-main.pdf?\\_tid=5807f0ee-ae40-11e4-ac4e-00000aacb360&acdnat=1423255390\\_213d451feb2b30287c588875e3bdd976](http://ac.els-cdn.com/S0269749108002522/1-s2.0-S0269749108002522-main.pdf?_tid=5807f0ee-ae40-11e4-ac4e-00000aacb360&acdnat=1423255390_213d451feb2b30287c588875e3bdd976)
23. Domingos, FXV. Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes [tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.
24. Oliveira EM, Goldim JR. Legislação de proteção animal para fins científicos e a não inclusão dos invertebrados: análise bioética. *Rev. bioét. (Impr.)*. [Internet]. 2014 [acesso 6 fev 2015];22(1):45-56. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/bioet/v22n1/a06v22n1.pdf>
25. Brasil. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Procedimentos para o uso científico de animais. *Diário Oficial da União*. 10 set 2008;145(196): Seção 1, p. 1-2.
26. Presgrave OAF. The need for the establishment of a Brazilian Centre for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM). *Altern Lab Anim*. [Internet]. 2008 [acesso 6 fev 2015];36(6):705-8. Disponível: [http://www.incqs.fiocruz.br/images/stories/incqs/bracvam/ATLA\\_BraCVAM\\_2008.pdf](http://www.incqs.fiocruz.br/images/stories/incqs/bracvam/ATLA_BraCVAM_2008.pdf)
27. Luna SPL. Dor, sensibilidade e bem-estar em animais: sensibilidade e dor. *Revista Ciência Veterinária nos Trópicos*. [Internet]. 2008 [acesso 6 fev 2015];11(Supl 1):17-21. Disponível: <http://www.rcvt.org.br/suplemento11/17-21.pdf>
28. Rechenmacher C, Siebel AM, Goldoni A, Klauck CR, Sartori T, Rodrigues M T et al. A multibiomarker approach in rats to assess the impact of pollution on Sinos River, Southern Brazil. *Braz J Biol*. [Internet]. 2010 [acesso 6 fev 2015];70(4 Supl):1223-30. Disponível: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-69842010000600012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-69842010000600012&script=sci_arttext)
29. Nour EAA, Candello FP, Santos EMR, Barretto, AS, Domingues LM. Tratamento biológico de formaldeído: toxicidade residual monitorada por bioensaios com *Daphnia similis*. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. [Internet]. 2014 [acesso 6 fev 2015];9(1):77-85. Disponível: <http://saiweb06.univali.br/seer/index.php/eec/article/view/4557/3647>
30. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12713: ecotoxicologia aquática, toxicidade aguda: método de ensaio com *Daphnia spp (Cladocera, Crustacea)*. Rio de Janeiro: ABNT; 2009.
31. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 13373: ecotoxicologia aquática, toxicidade crônica: método de ensaio com *Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera)*. Rio de Janeiro: ABNT; 2010.
32. Nepomuceno JC, Silva AC. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. *Perquirere*. [Internet]. 2010 [acesso 6 fev 2015];7(1):167-79. Disponível: [http://perquirere.unipam.edu.br/documents/23456/36602/Avaliacao\\_da\\_frequencia\\_de\\_micronucleos\\_em\\_e\\_ritrocitos.pdf](http://perquirere.unipam.edu.br/documents/23456/36602/Avaliacao_da_frequencia_de_micronucleos_em_e_ritrocitos.pdf)
33. Brandolt TD, Lobo EA. Avaliação ecotoxicológica utilizando bioensaios com *Daphnia magna* em água de lavoura de arroz no município de Mostardas, RS, Brasil. *Tecno-Lógica*. [Internet]. 2010 [acesso 6 fev 2015];14(2):47-51. Disponível: <https://online.unisc.br/seer/index.php/tecnologica/article/view/1580/1147>
34. Barbola IF, Moraes MFPG, Anazawa TM, Nascimento EA, Sepka ER, Polegatto CM et al. Avaliação da comunidade de macroinvertebrados aquáticos como ferramenta para o monitoramento de um reservatório na bacia do rio Pitangui, Paraná, Brasil. *Iheringia, Sér Zool*. [Internet]. 2011 [acesso 6 fev 2015];101(1-2):15-23. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/isz/v101n1-2/v101n1-2a02.pdf>
35. Morais AV, Cortez FS, Bretas ES, Cesar A, Pereira CDS, Santos AR. Avaliação da qualidade ambiental do rio Itaguaí, Bertioga-SP, com base em testes de toxicidade e indicadores microbiológicos de balneabilidade. *Mundo Saúde (Impr.)*. [Internet]. 2011 [acesso 6 fev 2015];35(1):55-63. Disponível: [http://saocamillo-sp.br/pdf/mundo\\_saude/83/55a63.pdf](http://saocamillo-sp.br/pdf/mundo_saude/83/55a63.pdf)
36. Mendes BG, Budziak D, Stolberg J, Peixer ZI, Dalmarco JB, Simionatto EL et al. Estudo da qualidade das águas do rio Marombas (SC/Brasil), utilizando parâmetros físico-químicos e bioensaios. *Revista de Ciências Ambientais*. [Internet]. 2011 [acesso 7 fev 2015];5(2):43-58. Disponível: <http://revistas.unilasalle.edu.br/index.php/Rbca/article/view/260/252>
37. Holanda JN, Maciel AP, Santos RL. Avaliação ecotoxicológica da água de lavagem da purificação de biodiesel de soja metílico utilizando *Danio rerio* como organismo-teste. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*. [Internet]. 2012 [acesso 6 fev 2015];25(1):13-20. Disponível: <http://www.periodicoseltronicos.ufma.br/index.php/blabohidro/article/viewFile/1924/73>
38. Damato M, Barbieri E. Estudo da toxicidade aguda e alterações metabólicas provocadas pela exposição do cádmio sobre o peixe *Hypophessobrycon callistus* utilizado como indicador de saúde ambiental. *Mundo Saúde (Impr.)*. [Internet]. 2012 [acesso 6 fev 2015];36(4):574-81. Disponível: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/artigos/mundo\\_saude/estudo\\_toxicidade\\_aguda\\_alteracoes\\_metabolicas.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/artigos/mundo_saude/estudo_toxicidade_aguda_alteracoes_metabolicas.pdf)
39. Mannarino CF, Moreira JC, Ferreira JA, Arias ARL. Avaliação de impactos do efluente do tratamento combinado de lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos e esgoto doméstico sobre a biota aquática. *Ciênc Saúde Coletiva*. [Internet]. 2013 [acesso 6 fev 2015];18(11):3235-43. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/csc/v18n11/14.pdf>
40. Mohr G, Lobo EA. Avaliação da eficiência de um sistema de tratamento da água em pequena propriedade rural, utilizando bioensaios. *Revista Jovens Pesquisadores*. [Internet]. 2013 [acesso 6 fev 2015];3(1):12-22. Disponível: <http://online.unisc.br/seer/index.php/jovenspesquisadores/article/view/3752/2660>

41. Gaspar N, Gago J, Repolho T, Luís O. Avaliação da toxicidade das lamas de cal sobre o ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). Perspectivas para novas aplicações destes resíduos industriais. *Revista da UIIPS*. [Internet]. 2013 [acesso 9 fev 2015];1(2):82-102. Disponível: [http://www.ipsantarem.pt/wp-content/uploads/2013/06/Revista-da-UIIPS\\_N2\\_Vol1\\_2013\\_ISSN-2182-9608.pdf](http://www.ipsantarem.pt/wp-content/uploads/2013/06/Revista-da-UIIPS_N2_Vol1_2013_ISSN-2182-9608.pdf)
42. Hernandez OD, Castro F, Paez M. Bioacumulación de mercurio en larvas de anuros en la zona afectada por la minería de oro en el río Dagua, Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia. *Acta Biol Colomb*. [Internet]. 2013 [acesso 6 fev 2015];18(2):341-8. Disponível: <http://www.redalyc.org/pdf/3190/319028011010.pdf>
43. Canto T, Pich CT, Geremias R. Bioensaio de toxicidade em percolados no aterro sanitário do município de Araranguá (Santa Catarina, Brasil). *Revista Biociências*. [Internet]. 2013 [acesso 6 fev 2015];19(2):53-60. Disponível: <http://revistas.unitau.br/ojs-2.2/index.php/biociencias/article/viewFile/1650/1263>
44. Sousa DBP, Almeida ZS, Carvalho-Neta RNF. Biomarcadores histológicos em duas espécies de bagres estuarinos da costa maranhense, Brasil. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. [Internet]. 2013 [acesso 6 fev 2015];65(2):369-76. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v65n2/11.pdf>
45. Jacobowski AC, Zobiolo NN, Padilha PM, Moreno SE, Arruda EJ. Efeito mutagênico do edetato de cobre ([Cu (EDTA)]-2) livre e nanoencapsulado em camundongos e peixes. *Ecotoxicol Environ Contam*. [Internet]. 2013 [acesso 6 fev 2015];8(1):13-9. Disponível: <http://siaiweb06.univali.br/seer/index.php/eec/article/view/4620/2544>
46. Rezende KFO, Santos RM, Santos RM, Shimada JCB, Silva JRMC, Muniz CASD. Histopatologia das brânquias de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, provenientes da represa Billings, área de proteção ambiental Bororé-Colônia. *Atas de Saúde Ambiental - ASA*. [Internet]. 2013 [acesso 6 fev 2015];1(1):57-68. Disponível: <http://revistaseletronicas.fmu.br/index.php/ASA/article/view/308/486>
47. Pereira DP, Santos DMS, Carvalho Neta AV, Cruz CF, Carvalho Neta RNF. Alterações morfológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) como biomarcadores de poluição aquática na laguna da Jansen, São Luís, MA (Brasil). *Biosc J*. [Internet]. 2014 [acesso 6 fev 2015];30(4):1213-21. Disponível: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/21852/14937>
48. Benites LM, Doncato KB, Minho TS, Perazzo GX. Avaliação do potencial mutagênico de cobre da água do rio Uruguai. *Ciência e Natura*. [Internet]. 2014 [acesso 6 fev 2015];36(2):107-13. Disponível: <http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/cienciaenatura/article/view/13610/pdf>
49. Bernardes MFF, Maschio LR, Azeredo-Oliveira MTV, Almeida EA. Biochemical and genotoxic effects of a commercial formulation of the herbicide tebuthiuron in *Oreochromis niloticus* of different sizes. *Ecotoxicological Environmental Contamination*. [Internet]. 2014 [acesso 6 fev 2015];9(1):59-67. Disponível: <http://www6.univali.br/seer/index.php/eec/article/view/5779/3440>
50. Muñoz DR. Bioética: a mudança da postura ética [editorial]. *Rev Bras Otorrinolaringol*. [Internet]. 2004 [acesso 6 fev 2015];70(5):578-9. Disponível: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-72992004000500001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992004000500001)
51. Presgrave OAF. Métodos alternativos. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM, organizadores. *Cuidados e manejo de animais de laboratório*. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 619-34.
52. Balls M. The three Rs and the humanity criterion. Nottingham: FRAME; 2009.
53. Alvim MS. A experimentação animal na nova Lei 11.794/08 à luz da interpretação conforme a Constituição. *Revista Brasileira de Direito Animal*. [Internet]. 2010 [acesso 6 fev 2015];7(5):221-49. Disponível: <http://www.portalseer.ufba.br/index.php/RBDA/article/viewFile/11045/7966>
54. Bridi AM. Adaptação e aclimação animal. [Internet]. s.d. [acesso 7 fev 2015]. Disponível: [http://www.uel.br/pessoal/ambриди/Bioclimatologia\\_arquivos/AdaptacaoeAclimatacaoAnimal.pdf](http://www.uel.br/pessoal/ambриди/Bioclimatologia_arquivos/AdaptacaoeAclimatacaoAnimal.pdf)
55. Flecknell PA. Refinement of animal use: assessment and alleviation of pain and distress. *Laboratory Animals*. [Internet]. 1994 [acesso 6 fev 2015];28(3):222-31. Disponível: <http://lan.sagepub.com/content/28/3/222.full.pdf+html>
56. Broom DM, Molento CFM. Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas: revisão. *Archives of Veterinary Science*. [Internet]. 2004 [acesso 6 fev 2015];9(2):1-11. Disponível: <http://www.unb.br/posgraduacao/docs/fav/BEMESTARANIMALCONCEITOQUESTOESRELACIONADAS.pdf>
57. Pereira CEM, Silva JDM, Romeiro VR. Aspectos éticos da experimentação animal. *Acta Cir Bras*. [Internet]. 1998 [acesso 15 abr 2015];13(2). Disponível: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86501998000200010>
58. Schnaider TB, Souza C. Aspectos éticos da experimentação animal. *Rev Bras Anestesiol*. [Internet]. 2003 [acesso 15 abr 2015];53(2):278-85. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/rba/v53n2/v53n2a14>
59. Rocha-Mendes F, Napoli RP, Mikich SB. Manejo, reabilitação e soltura de mamíferos selvagens. *Arq Ciên Vet Zool Unipar*. [Internet]. 2006 [acesso 6 fev 2015];9(2):105-9. Disponível: <http://revistas.unipar.br/veterinaria/article/download/351/318>
60. Feijó AGS. A função dos comitês de ética institucionais ao uso de animais na investigação científica e docência. *Bioética*. [Internet]. 2004 [acesso 6 fev 2015];12(2):11-22. Disponível: [http://www.revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista\\_bioetica/article/view/131/136](http://www.revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista_bioetica/article/view/131/136)

61. Oliveira RF, Galhardo L. Sobre a aplicação do conceito de bem-estar a peixes teleósteos e implicações para a piscicultura. Rev Bras Zootec. [Internet]. 2007 [acesso 7 fev 2015];36(Suppl):77-86. Disponível: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-35982007001000009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982007001000009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)

**Participação dos autores**

Joseilma dos Santos Silva contribuyó en la confección del mapa conceptual de elaboración del artículo, en la redacción de todas las partes del texto y en la revisión ortográfica. Iolanda Karoline Barros dos Santos Rocha contribuyó en la lectura de los artículos de revisión y en la elaboración del gráfico. Lucenilde Carvalho de Freitas contribuyó en la lectura y análisis de los artículos de revisión y en la redacción de la introducción. Natália Jovita Pereira contribuyó en la lectura y análisis de los artículos de revisión y en la elaboración del cuadro. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta contribuyó en la redacción y revisión de todas las partes del texto.

