

O peixe-zebra (*Danio rerio*) encontra a bioética: os princípios éticos dos 10Rs na pesquisa

Zebrafish (Danio rerio) meets bioethics: the 10Rs ethical principles in research

Aryelle Canedo¹ , Patrícia Saiki¹ , Andressa Liberal Santos¹ , Karla da Silva Carneiro¹ , Andreza Martins de Souza¹ , Gabriel Qualhato¹ , Rafaella da Silva Brito¹ , Franciyelli Mello-Andrade¹ , Thiago Lopes Rocha^{1*} 

¹ Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Ecotoxicologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

*Correspondente: thiagorochabio20@ufg.br

Resumo

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um peixe tropical amplamente usado em pesquisas em todo o mundo. Devido ao seu uso emergente em várias áreas de pesquisa, o desenvolvimento de animais geneticamente modificados e o aumento das instalações de peixe-zebra, novos desafios éticos surgem na pesquisa com o peixe-zebra. Além disso, é necessária a conscientização da comunidade científica sobre as normas éticas e leis vigentes na pesquisa com animais. Assim, o presente estudo teve como objetivo descrever os princípios éticos de 10 Rs usando o peixe-zebra como sistema modelo em pesquisa. Os 3 Rs clássicos relativos ao bem-estar animal (substituição, redução e refinamento) e 7 Rs adicionais relacionados aos princípios científicos (registro, relatório, robustez, reprodutibilidade e relevância) e de conduta (responsabilidade e respeito) na pesquisa do peixe-zebra são apresentados e discutido criticamente. Recomendamos o uso desses 10 Rs pelos pesquisadores, instituições e Comitê de Ética Animal na regulamentação, decisão e promoção da saúde e bem-estar do peixe-zebra em pesquisas.

Palavras-chave: saúde animal; bem-estar animal; comitês de ética animal; peixe; animais de laboratório.

Abstract

Zebrafish (*Danio rerio*) is a tropical fish species widely used in research, worldwide. The development of genetically modified animals and the increasing number of zebrafish breeding facilities due to their emerging use in several research fields, opened room for new ethical challenges for research carried out with this species. It is necessary to raise the scientific community's awareness of the ethical standards and laws in force, on animal research. Thus, the aim of the current study is to describe 10 Rs ethical principles by using zebrafish as model system in research. The classical 3 Rs concerning animal welfare, namely replacement, reduction and refinement; and the added 7 Rs related to scientific (registration, reporting, robustness, reproducibility and relevance) and conduct principles (responsibility, and respect) in zebrafish research are herein presented and critically discussed. The use of these 10 Rs by researchers, institutions and the Animal Ethics Committee is recommended to support regulations, decision-making about and the promotion of zebrafish health and welfare in research.

Keywords: animal health; animal welfare; animal ethics committees; fish; laboratory animals.

Recebido : 16 de novembro de 2021. Aceito: 11 de janeiro de 2022. Publicado: 21 de fevereiro de 2022.
www.revistas.ufg.br/vet visit the website to get the how to cite in the article page.

Introdução

O *zebrafish*, *Danio rerio* (Hamilton 1822), é uma pequena espécie de peixe tropical popular no aquarismo. No final da década de 1960, o *zebrafish* foi introduzido como um sistema modelo de vertebrados por George Streisinger. Diante disso, o *zebrafish* tem sido um sistema modelo bem estabelecido em várias áreas de pesquisa, como biologia do desenvolvimento^(1, 2), farmacologia e toxicologia^(3, 4, 5), ecotoxicologia^(6, 7), ciências veterinárias⁽⁸⁾, biologia da evolução⁽⁹⁾, nanotecnologia e nanomedicina^(10, 11), doenças humanas⁽¹²⁾, vacinação⁽¹³⁾, segurança alimentar⁽¹⁴⁾, entre outros (Figura 1). Além disso, *zebrafish* é um modelo *in vivo* para testes pré-clínico na medicina personalizada⁽¹⁵⁾ e nanomedicina⁽¹⁰⁾. Interessantemente, o *zebrafish* é um sistema modelo de vertebrado emergente no Sul Global⁽¹⁶⁾,

proporcionando uma descentralização das publicações científicas.

A utilização do *zebrafish* como sistema modelo tem várias vantagens, como embriões transparentes, alta taxa de reprodução e fertilização, desenvolvimento rápido, ciclo de vida curto, tamanho pequeno, baixo custo e fácil manutenção em condições laboratoriais, genoma sequenciado, semelhança genética com os humanos, comportamento complexo^(17, 18), bem como linhagens mutantes, transgênicas e *knockdown* disponíveis⁽¹⁹⁾. Além disso, os embriões e larvas de *zebrafish* são uma alternativa ao uso de adultos em teste de toxicidade⁽³⁾. De acordo com os regulamentos éticos internacionais, estudos com larvas de *zebrafish* até 120 horas pós-fertilização (hpf) são considerados modelos *in vitro*

(Diretiva 2010/63/UE)⁽²⁰⁾. Além disso, o teste de Toxicidade Aguda em Embrião de Peixe (*Fish Embryo Acute Toxicity* - FET) pode determinar os efeitos tóxicos de diferentes poluentes (por exemplo, nanomateriais, pesticidas, produtos farmacêuticos, químicos industriais, metais, dentre outros)⁽²¹⁾. A utilização de animais em pesquisa envolve desafios éticos. Em 1959, Russell e Burch publicaram o livro intitulado “*The principles of humane experimental technique*”, que se tornou referência em manejo animal baseado no princípio dos “3 Rs” (*replacement, reduction e refinement*)⁽²²⁾. Esse princípio recomenda a substituição de vertebrados por animais com menor potencial de percepção da dor, técnicas *in vitro* ou métodos computacionais (*in silico*), reduzindo o número de animais por experimento e utilização de técnicas que minimizam a dor e a sofrimento

dos animais⁽²³⁾. Por isto, foram criadas diretrizes para orientar os procedimentos éticos para cuidado e manejo de animais em pesquisa, incorporando o princípio dos “3 Rs”. Dentre elas, a Convenção Europeia para a proteção dos animais vertebrados utilizados para fins experimentais e outros fins científicos⁽²⁴⁾, a Diretiva 2010/63/UE sobre a proteção de animais usados para fins científicos⁽²⁵⁾, a Declaração de Basileia⁽²⁶⁾, o Guia para o cuidado e uso de animais de laboratório⁽²⁷⁾ e o Código de Ética⁽²⁸⁾. Desse modo, os pesquisadores são responsáveis pela validade ética e científica de seus estudos, enquanto instituições e agências governamentais buscam orientar e fazer cumprir o código de ética pelos pesquisadores, para aplicar estratégias, técnicas e instalações apropriadas para a utilização de animais em pesquisa^(24, 26, 27, 29).

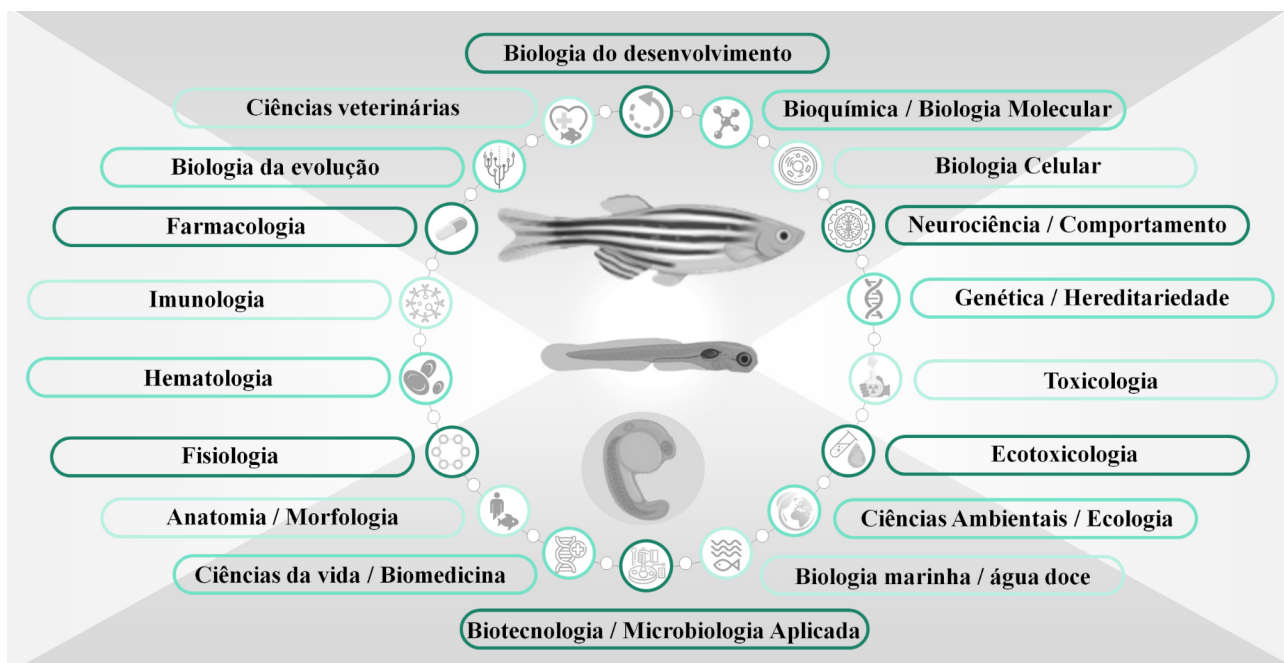


Figura 1. O uso do *zebrafish* em várias áreas da pesquisa científica.

Embora muitas áreas científicas utilizem peixes como sistema modelo em pesquisa, a aplicação de conceitos de bem-estar aos peixes tem recebido menor atenção em comparação com os mamíferos⁽³⁰⁾. No entanto, foram criadas diretrizes para procedimentos específicos com peixes, como diretrizes sobre o cuidado e a utilização de peixes em pesquisa, ensino e testes⁽³¹⁾ e orientações específicas para utilizar peixes em pesquisa⁽²⁹⁾. Esses guias visam garantir o bem-estar dos peixes nas instalações de piscicultura e condições laboratoriais, reforçando que é necessário (i) manter níveis adequados de água e alimentos, evitando a má nutrição; (ii) os animais devem estar livres de doenças ou lesões; (iii) não devem ser permitidas restrições comportamentais-iterativa e (iv) os animais não devem sofrer de estresse

ou por condições físicas^(29, 31).

Em 2014, uma reunião sobre “*Contemporary Topics in Zebrafish Management and Care*” foi realizada no Reino Unido, reunindo pesquisadores, técnicos e veterinários que discutiram temas como (i) protocolo de criação de larvas; (ii) implementação dos 3Rs; (iii) práticas de manejo, criopreservação e enriquecimento ambiental⁽³¹⁾. Todas essas medidas proporcionam melhorias na condição de bem-estar do *zebrafish* em condições de laboratório. Além disso, é necessário a padronização de linhagens e protocolos específicos para trazer benefícios à pesquisa⁽³²⁾.

O objetivo do presente estudo foi descrever os princípios éticos dos 10 Rs utilizando o *zebrafish* como sistema modelo em pesquisa, dada a utilização crescente desta

espécie como sistema modelo e a necessidade de assegurar o bem-estar e a saúde destes animais. A implementação dos 7 Rs é mais uma iniciativa para contribuir com os Comitês de Ética Animal para regulamentar, orientar estudos, relatar pesquisas realizadas com o *zebrafish*, aumentar a disponibilidade de informações sobre este modelo animal e minimizar estudos desnecessários, bem como contribuir para garantir o bem-estar e a saúde do *zebrafish* tanto nas instalações de criação de peixes como nos centros de pesquisa.

Os 10 Rs da pesquisa realizada com *zebrafish*

Aos 3 Rs clássicos relativos ao bem-estar animal (substituição, redução e refinamento; do inglês

“*replacement, reduction, and refinement*”), foram adicionados 7 Rs relacionados com os princípios científicos (registro, relatório, robustez, reprodutibilidade e relevância; do inglês “*registration, reporting, robustness, reproducibility and relevance*”) e de conduta (responsabilidade e respeito; do inglês “*responsibility and respect*”) a fim de ajudar os cientistas a melhorar o bem-estar e a saúde do *zebrafish* utilizados em pesquisa, bem como a integridade e relevância dos experimentos. Esses princípios englobam as diferentes fases do desenvolvimento do *zebrafish* utilizados em pesquisas como embrionária, larval, juvenil e adulta (Figura 2). Os 10 Rs da pesquisa realizada com *zebrafish* não têm escala de importância, contudo devem ser recomendados para a utilização do *zebrafish* na pesquisa.

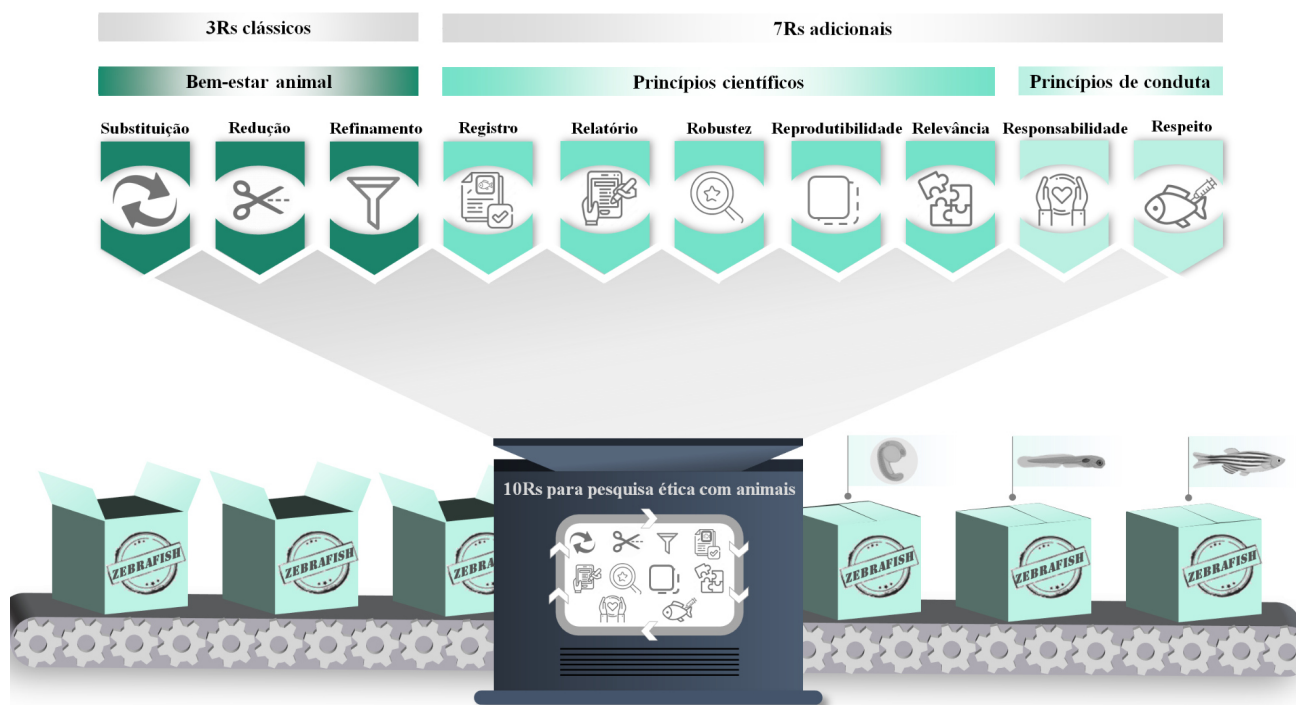


Figura 2. Os princípios éticos dos 10 Rs para utilizar o *zebrafish* como um sistema modelo em pesquisa. Os princípios foram classificados em três categorias: bem-estar (substituição, redução e refinamento; do inglês “*replacement, reduction, and refinement*”), princípios científicos (registro, relatório, robustez, reprodutibilidade e relevância; do inglês “*registration, reporting, robustness, reproducibility and relevance*”) e de conduta (responsabilidade e respeito; do inglês “*responsibility and respect*”).

Bem-estar animal

1R – Substituição

A discussão sobre princípios éticos e bem-estar na utilização de animais para fins educacionais e científicos aponta para a necessidade de substituir os sistemas modelo a fim de eliminar ou reduzir a dor, estresse e sofrimento⁽²⁵⁾. A substituição pode ser total ou parcial; a substituição total de animais, sem comprometer os resultados da pesquisa, pode ser realizada por meio de

técnicas emergentes e bem estabelecidas⁽³³⁾. Linhagens celulares, culturas de tecidos e organoides, chips de órgãos e modelagem computacional e matemática estão entre as metodologias comumente empregadas^(34, 35).

Durante muitos anos, as pesquisas foram realizadas com mamíferos, devido à sua ancestralidade comum com os seres humanos, o que permite extrapolar os resultados e aplicá-los às condições de saúde humana⁽³³⁾. No entanto, várias autoridades reguladoras recomendaram a redução

ou eliminação da utilização de modelos de mamíferos em pesquisas^(25, 36). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) deixará de realizar ou financiar estudos envolvendo modelos de mamíferos até 2035⁽³⁶⁾.

Foram publicadas muitas diretrizes para avaliar a toxicidade de substâncias químicas utilizando diferentes grupos de animais além dos mamíferos, tais como dípteros, crustáceos, espécies de minhocas, moluscos e peixes^(37, 38, 39, 40, 41, 42). Nesse contexto, o *zebrafish* surgiu como modelo para experimentação animal na década de 1980⁽⁴³⁾, podendo-se observar o aumento significativo do número de publicações baseadas neste modelo desde a década de 1990⁽⁴⁴⁾. Este pequeno peixe teleosteo possui uma variedade de características que o tornam um padrão ouro em pesquisas científicas, especialmente na substituição de mamíferos⁽⁴⁵⁾. Por exemplo, o *zebrafish* tem seu genoma totalmente sequenciado, compartilhando 70% de genes ortólogos com humanos⁽⁴⁶⁾, uma homologia que é muito semelhante à dos camundongos (aproximadamente 75%)⁽⁴⁷⁾. Além disso, existem milhares de linhagens mutantes e transgênicas de *zebrafish*⁽⁴⁸⁾.

Vários estudos têm mostrado que embriões e larvas de *zebrafish* apresentam respostas semelhantes às dos indivíduos adultos, o que otimiza a substituição do ponto de vista do bem-estar, uma vez que economiza recursos e minimiza a geração de resíduos^(3, 49, 50). Além disso, os testes com embriões e larvas de *zebrafish* não implicam em sofrimento aos animais do ponto de vista regulatório, uma vez que não ocorre alimentação extra-coriônica nestas fases do desenvolvimento^(25, 51). Os embriões de *zebrafish* destacam-se na substituição animal, mesmo nos estágios iniciais de desenvolvimento, uma vez que nesta fase ocorrem numerosas reações bioquímicas, diferenciação de órgãos e desenvolvimento morfológico, possibilitando a avaliação de poluentes e drogas no organismo vivo inteiro⁽¹⁸⁾, em tempo real devido à sua transparência.

2R – Redução

Redução é um princípio importante a ser considerado quando a substituição de animais durante a pesquisa científica não for possível⁽³³⁾. A redução significa diminuir o número de animais utilizados em protocolos e delineamentos experimentais⁽³³⁾. Portanto, o número mínimo de *zebrafish* deve ser utilizado para atingir os objetivos científicos ou educacionais quando não houver métodos alternativos, tais como modelos matemáticos, simulação computacional, sistemas biológicos *in vitro* ou outros métodos não animais disponíveis para substituir a utilização de animais vivos⁽⁵²⁾.

Os pesquisadores devem inicialmente escolher um sistema modelo adequado para a análise baseando-se em suas experiências e conhecimento, para evitar o uso desnecessário de animais. Além disso, o número de

animais a serem utilizados no experimento deve ser consistente e bem justificado. Este princípio deve ser aplicado nos casos em que a redução do número de animais não prejudique o rigor científico da análise⁽³⁰⁾. Alguns recursos podem ser usados para estimar o tamanho das amostras de peixe necessária antes de iniciar um experimento, entre eles o uso de *software* e análise de poder estatístico, que visam determinar o menor tamanho de amostra necessário para identificar um determinado efeito em um nível específico de significância⁽³⁰⁾.

Além disso, a Diretiva 2010/63/UE sugere que os pesquisadores devem compartilhar órgãos e tecidos de animais eutanasiados para favorecer o estabelecimento de novos métodos *in vitro*⁽³³⁾ ou para utilizar os mesmos indivíduos em análises diferentes, sempre que possível⁽⁵³⁾. Estas são formas respeitadas de minimizar a utilização de animais, em vez de se limitarem ao descarte de estruturas biológicas não utilizadas⁽³³⁾.

O modelo *zebrafish* reduz as demandas de tempo e uso de recursos, assim como as demandas de espaço e custos, quando comparado a modelos animais mais estabelecidos, como roedores. O *zebrafish* também proporciona maior potencial informativo e preditivo em relação aos resultados de experimentos *in vitro*. Assim, o modelo *zebrafish* pode reduzir a utilização de mamíferos em pesquisas e mitigar questões relacionados ao bem-estar desses animais⁽¹³⁾.

3R – Refinamento

Embora continue sendo necessário utilizar modelos não humanos na pesquisa científica, os padrões de excelência no cuidado prestado aos animais envolvidos na pesquisa devem atender integralmente à conduta de pesquisa^(54, 55, 56). Refinar a forma como os experimentos são realizados significa assegurar que os animais sofram o mínimo possível, e isso inclui melhor alojamento, parâmetros adequados de água, alimentação regular, procedimentos adequados de anestesia e analgesia^(57, 58, 59, 60, 61).

Assim como todos os outros vertebrados, os peixes passam por uma série de desafios ambientais devido a ajustes neuroendócrinos adaptativos conhecidos como resposta ao estresse; além disso, a ativação prolongada dessa resposta é prejudicial e leva à imunossupressão, redução do crescimento e disfunção reprodutiva. Os indicadores associados à resposta ao estresse crônico (desfechos fisiológicos, estado da doença e comportamento) são uma fonte de informação sobre o estado de bem-estar dos peixes^(62, 30). O desenvolvimento de alternativas para aumentar o bem-estar não só favorece a saúde e o bem-estar dos peixes, mas também melhora a confiabilidade e a repetibilidade dos dados científicos, fato que tem o potencial de reduzir o número de animais utilizados em pesquisas⁽⁶³⁾.

O *zebrafish* é normalmente mantido em sistemas de

recirculação de água, em tanques comerciais de policarbonato com coloração azulada ou aquário de vidro, a uma densidade de até 5 animais por litro de água. Essa medida prática possibilita a formação de grupos sociais típico do comportamento do *zebrafish* ^(64, 65, 66). Além de utilizar a coloração do aquário, recomenda-se também mimetizar seu ambiente natural, por exemplo: fotoperíodo controlado e disponibilidade de alimento vivo para estimular o comportamento natural de captura das presas e melhorar a qualidade nutricional ^(67, 68, 32). O *zebrafish* é mantido em tanques com água na temperatura variando de 26° a 28°C, pH entre 7 e 8, alcalinidade dentro da faixa de 50 a 150 mg de CaCO₃/L, dureza da água em níveis superiores a 75 mg/L, salinidade em torno de 0.5-2 g/L e níveis de oxigênio dissolvido de pelo menos 4 mg/L ⁽⁶⁹⁾. As linhagens utilizadas em laboratório são provenientes de linhagens estabelecidas com patrimônio genético, uma vez que leva a perda da capacidade adaptativa natural e reduz a tolerância às mudanças ambientais, principalmente relacionadas às condições físico-químicas da água ⁽⁷⁰⁾. Assim, é necessário manter sempre os parâmetros físico-químicos dentro dos valores de referência recomendados nos guias e manuais de criação da espécie a fim de evitar situações de estresse ⁽⁶⁹⁾.

A manipulação experimental que pode causar dor ou sofrimento deve ser realizada sob sedação, analgesia ou anestesia, pois os peixes apresentam respostas neuroendócrinas e fisiológicas robustas ao estresse causado por estímulos prejudiciais ^(71, 72). É necessário utilizar fármacos anestésicos, sedativos ou analgésicos quando o peixe tem que ser imobilizado para facilitar seu manejo, para alívio do desconforto de procedimentos de coleta ou quando submetidos à eutanásia. Estes são procedimentos fundamentais para promover o bem-estar dos peixes. É importante destacar que esses vertebrados podem apresentar sinais de estresse e/ou dor durante o manuseio, transporte, identificação, amostragem e procedimentos invasivos ⁽⁷²⁾.

A utilização de um protocolo anestésico inadequado pode comprometer não só o bem-estar dos peixes, mas também a confiabilidade dos resultados da pesquisa ⁽⁷³⁾. Estudos têm sido realizados para investigar os fármacos mais adequados para o *zebrafish*, levando em consideração os princípios do bem-estar como uma estratégia para refinar as técnicas utilizadas para analgesia e anestesia desta espécie ^(73, 74, 75, 76). O metanossulfonato de tricaina (60-300 mg/L), óleo de cravo (25-100 mg/L) e 2-fenoxietanol(2-PE) (0,1-0,5 mg/L) são os agentes anestésicos mais utilizados nos peixes ciprinídeos. Além disso, vários fatores podem interferir na anestesia, como a fase do desenvolvimento e fatores ambientais ⁽⁷⁷⁾.

Estudos focados na obtenção de DNA geralmente necessitam realizar o corte da nadadeira de peixes adultos sob anestesia não terminal ⁽⁷⁸⁾. O efeito do corte

das nadadeiras pode afetar negativamente os peixes e levar à infecção e alterar a sua sobrevivência, crescimento e comportamento, bem como diminuir a alimentação e induzir a liberação de cortisol ^(65, 79, 80), afetando o bem-estar do peixe. Os esforços para melhorar e refinar as técnicas de coleta de DNA têm aumentado, uma vez que tais alterações podem interferir drasticamente na qualidade dos dados experimentais ^(81, 82). Métodos alternativos de coleta de DNA, tais como escamação, amostra de muco e esperma, têm sido utilizados com sucesso e estão ganhando popularidade. Algumas dessas técnicas são menos invasivas do que o corte de nadadeiras, além de terem o potencial de melhorar o bem-estar animal ⁽⁸³⁾. Foi desenvolvida uma nova técnica de coleta com *swab* a partir do esfregaço da pele; é menos invasiva e estressante para os peixes do que o corte de nadadeiras, tal descoberta confirma que o *swab* é um método refinado para coletar DNA de peixes ⁽⁸⁴⁾.

Muitas técnicas de refinamento podem ser aplicadas durante os experimentos científicos, bem como ao longo da vida do animal e podem melhorar as condições de vida dos peixes nas instalações de criação e reprodução ⁽⁸⁵⁾. O refinamento não apenas favorece os animais, como também pode melhorar a qualidade dos resultados da pesquisa. Evidências sugerem que a dor e o sofrimento podem alterar o comportamento e a resposta fisiológica dos animais durante o período experimental. Essas alterações podem levar a variações nos resultados experimentais, e podem afetar tanto a confiabilidade quanto a repetibilidade dos estudos ^(86, 87). O desenvolvimento de métodos menos invasivos e mais refinados deve ser levado em consideração sempre que possível.

Princípios científicos

4R – Registro

Os princípios científicos agregam valor à ciência e à sociedade por meio de estudos relevantes utilizando o *zebrafish* como sistema modelo; portanto, devemos considerar o “R” (Registro)⁽⁸⁷⁾. A adesão a métodos centrados no Registro da informação disponível em estudos realizados com animais tem sido inadequada em alguns casos, levando a estudos tendenciosos, atrasados ou a resultados não relatados ⁽⁸⁸⁾. A Declaração de Helsinki já inclui o Registro como princípio obrigatório. Plataformas para estes Registros, tais como www.preclinicaltrials.eu e www.animalstudyregistry.org, foram criadas por iniciativas acadêmicas e organizações governamentais, respectivamente. Os Registros de protocolo podem ser realizados rapidamente nessas plataformas e pode aumentar a relevância da pesquisa. Assim, a utilização do *zebrafish* na pesquisa deve ser acompanhada de aprovação prévia por comitês de ética locais ou nacionais sobre a utilização de animais na pesquisa. As informações que são necessárias para o

Registro dos experimentos, conforme descrito na diretriz ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*), estão relacionadas com o delineamento do estudo, tamanho da amostra, critérios de inclusão e exclusão, randomização, indicadores de resultados, métodos estatísticos, modelos animais, procedimentos experimentais, resultados, resumo, antecedentes, objetivos, declarações éticas, alojamento e criação, cuidados e monitoramento dos animais, interpretação/implicações científicas, generalização/tradução, registro de protocolos, acesso a dados e declaração de interesses⁽⁸⁸⁾.

O Registro de estudos com *zebrafish* deve ser gratuito para acesso público porque os protocolos registrados permitem observações sobre estudos que apresentam os melhores resultados⁽⁸⁷⁾. Muitas controvérsias e embaraços podem ser mitigados por este Registro rápido e prático de estudos com *zebrafish*⁽⁸⁹⁾. O *zebrafish* tem várias linhagens que podem ter respostas diferentes; portanto, é necessário ter o Registro destas características⁽⁹⁰⁾. É provável que se pense em um aumento das tarefas administrativas ou mesmo em apropriação de ideias através do Registro de Estudos⁽⁸⁹⁾; contudo, o objetivo do Registro, e os seus principais resultados, concentram-se em tornar a investigação com *zebrafish* ainda mais eficiente.

5R – Relatório

Em suma, um relatório científico é um documento para descrever processos de investigação e/ou resultados, bem como a situação de um problema enfrentado por uma pesquisa técnica. Pode também conter recomendações, advertências e conclusões para a pesquisa⁽⁹¹⁾. Os dados acima mencionados podem ser publicados em notas técnicas, comunicações cinematográficas e artigos científicos; assim, os métodos e técnicas devem ser divulgados a fim de facilitar a padronização das técnicas e garantir a integridade e confiabilidade dos resultados⁽⁹¹⁾. Apesar da sua importância, os 3Rs podem ser inadequados para experimentos realizadas com animais, dado o seu enfoque limitado no princípio ético fundamental, devido à complexidade do princípio do "bem-estar animal". Esta situação pode levar à falta de princípios orientadores práticos que visem a promoção do segundo princípio ético fundamental, a saber: o "valor científico".

Os relatórios científicos para enfrentar o atual déficit de informações desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de métodos, normas e parâmetros que podem *i)* reforçar os 3 Rs, e *ii)* formular novos pensamentos que podem levar a descobertas para apoiar novos pilares bioéticos. A documentação e publicação de métodos e relatórios baseados em modelos são ações que influenciam diretamente os aspectos éticos e bioéticos da

utilização de animais. Caso não haja registro detalhado de novos métodos, técnicas ou mesmo estudos que já tenham sido realizados, não há possibilidade de otimizar a utilização e os teste em animais; portanto, não há sequer a garantia do cumprimento dos 3R já estabelecidos. Além disso, existe uma relação intrínseca e dependente entre ética em pesquisa, relatórios e registros gerados a partir da utilização de cada modelo animal aplicados na ciência.

Consequentemente, um relatório significativo deve ter métodos e análises apropriados baseados na confiabilidade estatística para garantir a qualidade e confiabilidade de um determinado experimento ou relatório. Contudo, muitos trabalhos científicos experimentais não são publicados (50%), ou não saem da situação de *pre-print*⁽⁸⁷⁾; estas incertezas apenas contribuem para a conhecida "crise de reprodutibilidade" que afeta aqueles que procuram novos métodos e técnicas para os seus experimentos⁽⁹²⁾.

Uma forma de melhorar os relatórios é considerar as responsabilidades éticas e morais dos pesquisadores, redatores, editores e financiadores, bem como tratá-los de uma forma responsável: *i)* os pesquisadores são responsáveis por relatórios claros e transparentes; *ii)* os redatores e editores de revistas ajudam a implementar melhorias por meio de suas críticas e sugestões⁽⁹³⁾.

Diante dos desafios acima descritos, o *D. rerio* pode ser uma excelente alternativa para desenvolver métodos que contribuam para reduzir relatórios inequívocos, pois seu modelo biológico bem avaliado fornece um amplo suporte por meio de publicações e periódicos. Os relatórios sobre o *D. rerio* são significativos devido a um modelo que apresenta combinações únicas de características de desenvolvimento e manutenção; tem uma coleção bem estabelecida de métodos que proporcionam um sistema com vantagens de executar testes *in vitro* e *in vivo*⁽⁹⁴⁾. Este processo melhora os testes e a capacidade de replicar métodos e experimentos favorecendo os pesquisadores a cumprir com sua responsabilidade técnica de publicar relatórios precisos e fiéis⁽⁹⁴⁾. Esse extenso acervo de publicações contribui para reforçar a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico, bem como fortalece aos outros Rs, uma vez que dependem precisamente da divulgação e dos resultados científicos para se desenvolverem e interagirem entre si.

6R – Robustez

Os fatores ambientais podem mudar o bem-estar, a saúde e a resposta do *zebrafish*. Por outro lado, a Robustez assegura que resultados semelhantes podem derivar de experimentos anteriores, mesmo quando há pequenas variações nos reagentes ou delineamento experimental. Os resultados são condicionais e não robustos quando dependem de condições experimentais específicas⁽⁹⁵⁾.

A Robustez da pesquisa realizada com *zebrafish* pode aumentar quando os resultados são confirmados por diferentes métodos e pesquisas em colaboração. Os seguintes aspectos podem melhorar a robustez de uma pesquisa: melhores práticas científicas; utilização de normas; qualidade e bem-estar do *zebrafish*; delineamento experimental; adição de grupos controles, negativos e solventes; estimativas do tamanho da amostra; efeitos das diferenças sexuais; análise estatística adequada; análise e interpretação adequada dos resultados; inclusão de dados negativos e de validação; treinamento e suporte.

7R – Reprodutibilidade

A Reprodutibilidade do estudo é um princípio científico fundamental. Os pesquisadores devem ser capazes de recriar experimentos e obter os mesmos (ou semelhantes) resultados e conclusões⁽⁹⁶⁾. No entanto, muitas vezes, a pesquisa não pode ser reproduzida e conduz a perdas de recursos, tempo e credibilidade científica^(97, 98). A irreprodutibilidade científica pode destacar questões de delineamento experimental, implementação de metodologia, qualidade ou integridade dos dados, erro de análise estatística ou interpretação dos resultados do estudo⁽⁹⁶⁾, bem como qualidade e bem-estar animal.

A reprodutibilidade é particularmente importante para sistemas modelo emergentes que têm disponível um número limitado de protocolos e informações⁽⁹⁹⁾. A *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) fornece atualmente diretrizes para o Teste de Toxicidade Aguda em Peixes⁽¹⁰⁰⁾, Toxicidade Aguda em Embriões de Peixes (FET)⁽²¹⁾, Teste de Crescimento Juvenil em Peixes⁽¹⁰¹⁾, Ensaio de 21 dias em Peixes⁽¹⁰²⁾ e Teste de Desenvolvimento Sexual em Peixes⁽¹⁰³⁾. No entanto, muitos campos de pesquisa carecem de protocolos específicos para peixes, tais como genotoxicidade⁽⁴⁾, mutagenicidade⁽⁵⁾, neurociência e estudos comportamentais⁽⁹⁹⁾. Gerlai⁽⁹⁹⁾, por exemplo, descreve questões metodológicas e soluções para assegurar a reprodutibilidade dos estudos de neurociência comportamental com *zebrafish*. Além disso, embora os 3Rs tenham sido incorporados às diretrizes ARRIVE, são necessários esforços adicionais para cumprir as leis vigentes, em diferentes países, para garantir a integridade da pesquisa⁽¹⁰⁴⁾.

Assim, medidas tais como (i) assegurar o acesso aos protocolos utilizados nos estudos; (ii) conduzir pesquisa reprodutível bem delineada e minimizar o erro experimental e o número de animais utilizados nos experimentos; (iii) ser transparente e claro sobre os resultados encontrados nos estudos; (iv) corrigir a análise de dados complexos; (v) evitar vieses cognitivos; (vi) identificar lacunas no conhecimento sobre estudos

realizados com *zebrafish*; (vii) padronizar protocolos para estudos com *zebrafish*^(98, 32, 105) devem ser aplicados para garantir a reprodutibilidade dos estudos com esta espécie.

8R – Relevância

As espécies animais devem ser capazes de cumprir todos os objetivos do estudo quando os animais são utilizados. Consequentemente, o planejamento deve ser efetuado antes de qualquer experimento ser implementado, a fim de evitar o uso desnecessária de animais. Portanto, os pesquisadores devem conhecer as características do sistema modelo que pretendem utilizar, tais como a sua anatomia, fisiologia, estágio de desenvolvimento, comportamentos específicos, entre outros⁽²²⁾. Mesmo que o objetivo do estudo seja investigar doenças humanas, realizar testes de toxicidade ou monitorização ambiental, a relevância do princípio aqui avaliado deve estar relacionada à transferibilidade de um teste em animais. Os experimentos só devem ser realizados com uma determinada espécie após levar em consideração a sua relevância para o avanço do conhecimento biológico⁽¹⁰⁶⁾.

O *zebrafish* tem muitas características relevantes para a pesquisa em desenvolvimento⁽¹⁰⁷⁾, genética⁽¹⁰⁸⁾, comportamento⁽¹⁰⁹⁾, descoberta de medicamentos⁽¹¹⁰⁾, doenças⁽¹¹¹⁾, vacinação⁽¹³⁾, segurança alimentar⁽¹⁴⁾, entre outras. Ao contrário de outros modelos de vertebrados, os embriões de *zebrafish* têm um plano corporal, no qual é possível observar o batimento cardíaco, vasos sanguíneos e intestino rudimentar em 48 hpf⁽¹⁷⁾. Embora os sistemas cardíaco e metabólico se formem precocemente no *zebrafish*, são possíveis manipulações experimentais, pois os embriões obtêm oxigênio da água por difusão passiva e nutrientes do vitelo⁽¹¹²⁾. Além disso, a fertilização e o desenvolvimento de embriões de *zebrafish* são externos, bem como os embriões são translúcidos, o que o torna um sistema modelo ideal para análise de imagens durante o desenvolvimento^(113, 114). Outra característica relevante é que o sistema imune inato do *zebrafish* desenvolve-se nos dois primeiros dias da embriogênese⁽¹¹⁵⁾, assim como o desenvolvimento e a maturação do sistema imune adaptativo ocorrem entre 4-6 semanas pós-fertilização⁽¹¹⁶⁾, tornando-se um sistema modelo ideal para estudos em imunologia.

O genoma do *zebrafish* foi sequenciado em 2013 pelo *Cambridge's Welcome Trust Sanger Institute*. O *zebrafish* possui 26.206 genes codificadores de proteínas, e aproximadamente 70% deles têm pelo menos um ortólogo em humanos⁽⁴⁵⁾. Deve notar-se que aproximadamente 84% dos genes conhecidos relacionados a doenças humanas possuem um gene ortólogo em *zebrafish*⁽⁴⁵⁾. Atualmente, devido ao desenvolvimento de ferramenta, tais como CRISPR-Cas9, TALENs, ZFNs, para edição de genes, foram desenvolvidas várias linhagens mutantes de *zebrafish*, transgênicos e *knockdown* para estudos sobre

doenças, biologia do desenvolvimento, toxicologia, entre outras áreas⁽¹⁹⁾. Por fim, informações sobre a anatomia, fisiologia, desenvolvimento e genética do *zebrafish* foram depositadas em uma base de dados para facilitar a comunicação científica sobre esta espécie (www.zfin.org). Todas estas características tornam o *zebrafish* um modelo relevante para a pesquisa científica.

Princípios de conduta

9R – Responsabilidade

Todas as pessoas envolvidas na pesquisa com animais são responsáveis pelos cuidados e utilização que lhes são prestados. As instituições, comitê de ética animal, pesquisadores e cuidadores de animais devem compreender e aceitar suas responsabilidades^(67, 117, 118). As instituições são responsáveis por apoiar os comitês de ética animal, pesquisadores e cuidadores de animais. Assegurar o acesso a aconselhamento veterinário, educação e treinamento, políticas e procedimentos em atendimento aos princípios da pesquisa animal são exemplos de tal apoio^(67, 117). Os comitês de ética animal são responsáveis pela validação, aprovação e monitoramento dos cuidados prestados aos animais e da sua utilização para fins científicos e educacionais^(117, 118). Pesquisadores e cuidadores de animais, incluindo o veterinário associado, são responsáveis pela aplicação de elevados padrões de cuidado e manejo na utilização de animais em pesquisa^(117, 118, 119, 120, 121).

A utilização experimental de animais, questões sociais, integridade científica e bem-estar dos animais estão relacionados com a responsabilidade na pesquisa com animais⁽¹²²⁾. A utilização experimental de animais para fins científicos e de ensino, devendo ser justificada e conduzida com base na aceitabilidade ética⁽¹¹⁸⁾. A responsabilidade pelas questões sociais inclui compartilhar com o público as razões pelas quais a pesquisa com animais é necessária a fim de melhorar os problemas de saúde dos animais, dos seres humanos e do meio ambiente⁽¹²³⁾. O objetivo é mostrar o impacto dos propósitos científicos em posições que vão além do desenvolvimento do conhecimento científico, tais como sobre as consequências sociais, bem como compartilhar as práticas e procedimentos adotados em pesquisas com animais⁽¹²⁴⁾. A responsabilidade pela integridade científica compreende a concepção e a condução de pesquisas com animais, incluindo as responsabilidades legais. Recomenda-se a aplicação do Planejamento de Pesquisa e Procedimentos Experimentais em Animais (do inglês, Planning Research and Experimental Procedures on Animals - PREPARE) para garantir a adoção das melhores práticas atuais relativas aos cuidados e manejo de animais utilizados em propostas de pesquisa⁽¹²¹⁾. Finalmente, a responsabilidade com o bem-estar animal requer procedimentos de cuidado e manejo adequados à espécie selecionada ao longo de sua vida⁽¹¹⁸⁾, e incluem

número de animais, origem dos animais, estado biológico, transporte, prevenção e alívio da dor, sofrimento, angústia e doença, alojamento e criação adequados, bem como disposição final⁽²²⁾.

Os princípios da pesquisa animal continuam a ser um desafio; entretanto, diretrizes bem estabelecidas e legislações claras permitem a aplicação do “R” de responsabilidade⁽²²⁾. O conhecimento da biologia, fisiologia e comportamento do *zebrafish* é crucial para aplicar as melhores práticas para seu cuidado e utilização para fins científicos, uma vez que assegura o bem-estar do *zebrafish* ao longo de seu ciclo de vida^(125, 31). Portanto, a responsabilidade na pesquisa com animais está associada ao dever de respeitar os animais.

10R – Respeito

De acordo com o imperativo bioético definido por Fritz Jahr, deve-se “*respect every living being on principle as an end in itself and treat it, if possible, as such*”⁽¹²⁶⁾. O respeito pode ser demonstrado quando todos os que utilizam animais consideram tanto a qualidade quanto a dignidade das suas vidas⁽¹²¹⁾. O impacto científico e social por meio da pesquisa com animais deve ser avaliado com cautela baseado na necessidade e justificativa da utilização de animais para propostas científicas e de bem-estar animal⁽¹¹⁸⁾. Nesse sentido, o “R” (Respeito) na pesquisa com animais consiste também em minimizar os danos aos animais; aplicar os 10Rs em todas as etapas do cuidado e manejo animal; aplicar as melhores práticas de cuidado e manejo dos animais; e compreender e aceitar suas responsabilidades, bem como seguir as recomendações das leis nacionais e diretrizes regulatórias⁽¹²¹⁾.

Para pesquisas com *zebrafish*, o Respeito pode ser aplicado ao conhecimento das características da história de vida do *zebrafish*; a escolha da fase apropriada do ciclo de vida para a proposta científica e a adoção de recomendações para a aquisição do animal; manutenção, tais como parâmetros de qualidade da água; alimentação; enriquecimento ambiental; bem como todos os aspectos envolvidos no bem-estar animal⁽³¹⁾, para utilização desses espaços em experimentos científicos, além da aplicação dos 10 Rs apresentados no presente estudo.

A crescente utilização desses animais para fins científicos e educacionais reforça a necessidade de regulamentar a pesquisa científica baseada na utilização de peixes modelos, incluindo o *zebrafish*⁽¹²⁷⁾. Além disso, alguns estudos anteriores descreveram o *zebrafish* como “ferramenta” em diversas áreas de pesquisa^(128, 129, 130), bem como “ferramenta” educacional. No entanto, uma vez que as preocupações éticas devem nortear a utilização de animais em propostas científicas e educacionais, as iniciativas aqui apresentadas centradas nos 10 Rs devem ser consideradas e implementadas de modo a garantir a

utilização do *zebrafish* em pesquisas, como modelo animal bem estabelecido, e não apenas como uma “ferramenta”. Assim, é essencial reforçar a necessidade urgente de adotar como termo padrão “sistema modelo” ou “modelo animal”. É importante enfatizar que o respeito pelos animais deve sustentar a pesquisa realizada com animais. Portanto, garantir a conduta ética da pesquisa com *zebrafish*, bem como o bem-estar animal e o cumprimento dos princípios científicos devem ser a própria base dos princípios de conduta.

Conclusão

A utilização emergente do *zebrafish* como sistema modelo em várias áreas de pesquisa abre espaço para novos desafios éticos. O presente estudo descreve princípios éticos de 10 Rs para a utilização do *zebrafish* como sistema modelo para a pesquisa científica. Foram classificados em três categorias: bem-estar (substituição, redução e refinamento), científico (registro, relatório, robustez, reprodutibilidade e relevância) e princípios de conduta (responsabilidade e respeito). A implementação dos 10 Rs pode ajudar os pesquisadores, instituições e Comitê de Ética Animal na regulação, tomada de decisões e promoção da saúde e bem-estar do *zebrafish* durante os protocolos de pesquisa. As normas e leis devem ser seguidas pelos pesquisadores a fim de assegurar a integridade da pesquisa, bem como sua relevância para o desenvolvimento da saúde humana e animal.

Agradecimentos

O presente estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (MCTIC/CNPq n. 28/2018; n. 433553/2018-9) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (código de financiamento 001). Rocha T.L. recebe bolsa de produtividade do CNPq (proc. n. 306329/2020-4).

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuições do autor

Conceituação: T. L. Rocha; *Curadoria de dados*: A. Canedo, P. Saiki, A. L. Santos, K. da S. Carneiro, A. M. de S., G. Qualhato, R. da S. Brito, F. Mello-Andrade, T. L. Rocha; *Análise formal*: A. Canedo, P. Saiki, A. L. Santos, K. da S. Carneiro, A. M. de S., G. Qualhato, R. da S. Brito, F. Mello-Andrade; *Metodologia*: A. Canedo, P. Saiki, A. L. Santos, K. da S. Carneiro, A. M. de S., G. Qualhato, R. da S. Brito, F. Mello-Andrade; *Surpevisão*: T. L. Rocha; *Redação (revisão e edição)*: A. Canedo, P. Saiki, A. L. Santos, K. da S. Carneiro, A. M. de S., G. Qualhato, R. da S. Brito, F. Mello-Andrade, T. L. Rocha.

Referências

1. Selderslaghs IW, Blust R, Witters HE. Feasibility study of the

zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds. *Reproductive toxicology*. 2012;33(2):142-154. doi:[10.1016/j.reprotox.2011.08.003](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.08.003)

2. Roper C, Tanguay RL. Zebrafish as a Model for Developmental Biology and Toxicology. *Handbook of Developmental Neurotoxicology* (Second Edition). 2018; 143-151. doi:[10.1016/B978-0-12-809405-1.00012-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809405-1.00012-2)

3. Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology*: CBP;2009;149(2):196-209. doi:[10.1016/j.cbpc.2008.11.006](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006)

4. Canedo A, Rocha TL. Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: historical review, current status and trends. *The Science of the total environment*. 2021;762:144084. doi:[10.1016/j.scitotenv.2020.144084](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144084)

5. Canedo A, de Jesus LWO, Bailão EFLC, Rocha TL. Micronucleus test and Nuclear Abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): past, present and future trends. *Environment Pollution*. 2021;290:118019. doi:[10.1016/j.envpol.2021.118019](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118019)

6. Cristiano W, Lacchetti I, Mancini L, Corti M, Di Domenico K, Di Paolo C, Hollert H, Carere M. Promoting zebrafish embryo tool to identify the effects of chemicals in the context of Water Framework Directive monitoring and assessment. *Microchemical Journal*. 2019;149:104035. doi:[10.1016/j.microc.2019.104035](https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104035)

7. Ribeiro RX, da Silva Brito R, Pereira AC, Monteiro KBES, Gonçalves BB, Rocha TL. Ecotoxicological assessment of effluents from Brazilian wastewater treatment plants using zebrafish embryotoxicity test: A multi-biomarker approach. *The Science of the total environment*. 2020;735:139036. doi:[10.1016/j.scitotenv.2020.139036](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139036)

8. Nowik N, Podlasz P, Jakimiuk A, Kasica N, Sienkiewicz W, Kaleczyc J. Zebrafish: an animal model for research in veterinary medicine. *Polish journal of veterinary sciences*. 2015;18(3):663-674. doi:[10.1515/pjvs-2015-0086](https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0086)

9. Parichy DM. The Natural History of Model Organisms: Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. *eLife* 2015;4:e05635. doi: [10.7554/eLife.05635](https://doi.org/10.7554/eLife.05635).

10. Sieber S, Grossen P, Bussmann J, et al. Zebrafish as a preclinical in vivo screening model for nanomedicines. *Advanced drug delivery reviews*. 2019;151-152:152-168. doi:[10.1016/j.addr.2019.01.001](https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.001)

11. Pereira AC, Gomes T, Ferreira Machado MR, Rocha TL. The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach. *Environmental pollution*. 2019;252(Pt B):1841-1853. doi:[10.1016/j.envpol.2019.06.100](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.100)

12. Dooley K, Zon LI. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current opinion in genetics & development*. 2000;10(3):252-256. doi:[10.1016/S0959-437X\(00\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00074-5)

13. Bailone RL, R, Fukushima HCS, Fernandes BHV, De Aguiar LK, Corrêa T, Janke H, Setti PG, Roça RO, Borra RC. Zebrafish as an alternative animal model in human and animal vaccination research. *Laboratory Animal Research*. 2020;36(13):1-10. doi:[10.1186/s42826-020-00042-4](https://doi.org/10.1186/s42826-020-00042-4)

14. Bailone RL, Aguiar LKD, Roca RDO, Borra RC, Corrêa T, Janke H, Fukushima HCS. Zebrafish as an animal model for food safety research: trends in the animal research. *Food*

- Biotechnology. 2019;33(4): 283-302. <http://dx.doi.org/10.1080/08905436.2019.1673173>
15. Baxendale S, van Eeden F, Wilkinson R. "The Power of Zebrafish in Personalised Medicine." *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;1007:179-197. doi:[10.1007/978-3-319-60733-7_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-60733-7_10)
16. Trigueiro, N., Canedo, A., Braga, D., Luchiari, A. C., Rocha, T. L., 2020. Zebrafish as an Emerging Model System in the Global South: Two Decades of Research in Brazil. *Zebrafish*. 10.1089/zeb.2020.1930. Advance online publication. doi:[10.1089/zeb.2020.1930](https://doi.org/10.1089/zeb.2020.1930)
17. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 1995;203(3):253-310. doi:[10.1002/aja.1002030302](https://doi.org/10.1002/aja.1002030302)
18. Aksoy YA, Nguyen DT, Chow S, et al. Chemical reprogramming enhances homology-directed genome editing in zebrafish embryos. *Communications biology*. 2019;2:198. doi:[10.1038/s42003-019-0444-0](https://doi.org/10.1038/s42003-019-0444-0)
19. Fernandes MR, Pedrosa AR. Animal experimentation: A look into ethics, welfare and alternative methods. *Revista da Associação Médica Brasileira* (1992). 2017;63(11):923-928. doi:[10.1590/1806-9282.63.11.923](https://doi.org/10.1590/1806-9282.63.11.923)
20. Cornet C, Calzolari S, Miñana-Prieto R, et al. ZeGlobalTox: An Innovative Approach to Address Organ Drug Toxicity Using Zebrafish. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(4):864. doi:[10.3390/ijms18040864](https://doi.org/10.3390/ijms18040864)
21. OECD, 2013. OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 236: Applicability of the Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
22. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*. 2010;8(6):e1000412. doi:[10.1371/journal.pbio.1000412](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412)
23. Council of Europe, 1986, European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, European Treaty Series 123, Council of Europe, Strasbourg.
24. European Union, 2010, 'Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes', Official Journal of the European Union 276, 33-79.
25. Basel Declaration Society, 2010, Basel Declaration: A call for more trust, transparency and communication on animal research, Basel Declaration Committee, Basel.
26. National Research Council, 2011, Guide for the care and use of laboratory animals: Eighth edition, National Academic Press, Washington, DC.
27. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, n.d., SETAC code of ethics, viewed 30 August 2021, from <https://www.setac.org/?page=SETACEthics>
28. American Fisheries Society, 2014, 'Guidelines for the use of fishes in research', American Fisheries Society, Bethesda, MD.
29. Sloman KA, Bouyoucos IA, Brooks EJ, Sneddon LU. Ethical considerations in fish research. *Journal of Fish Biology*. 2019;94(4):556-577. <https://doi.org/10.1111/jfb.13946>
30. Canadian Council on Animal Care, 2005, Guidelines on: The care and use of fish in research, teaching and testing, Canadian Council on Animal Care, Ottawa.
31. Osborne N, Paull G, Grierson A, et al. Report of a Meeting on Contemporary Topics in Zebrafish Husbandry and Care. *Zebrafish*. 2016;13(6):584-589. doi:[10.1089/zeb.2016.1324](https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1324)
32. Lidster K, Readman GD, Prescott MJ, Owen SF. International survey on the use and welfare of zebrafish *Danio rerio* in research. *Journal of Fish Biology*. 2017;90(5):1891-1905. <https://doi.org/10.1111/jfb.13278>
33. Dias L, Zambrano E, Flores ME, Contreras M, Crispin JC, Alemán G, Bravo C, Armenta A, Valdés VJ, Tovar A, gamba G, Barrios-Payán J, Bobadilla NA. Ethical considerations in animal research: The principle of 3R's. *Revista de investigación clínica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutrición*. 2021;73(4):199-209. doi:[10.24875/ric.20000380](https://doi.org/10.24875/ric.20000380)
34. Ford KA. Refinement, Reduction, and Replacement of Animal Toxicity Tests by Computational Methods. *ILAR J*. 2016;57(2):226-233. doi:[10.1093/ilar/ilw031](https://doi.org/10.1093/ilar/ilw031)
35. Schaeck M, Van den Broeck W, Hermans K, Decostere A. Fish as research tools: alternatives to in vivo experiments. *Alternatives to laboratory animals: ATLA*. 2013;41(3):219-229. doi:[10.1177/026119291304100305](https://doi.org/10.1177/026119291304100305)
36. USEPA, 2020. New approach methods work plan: Reducing use of animals in chemical testing. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. EPA 615B2001. https://www.epa.gov/sites/default/files/2020-06/documents/epa_nam_work_plan.pdf
37. OECD, 2010. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 233: Sediment-water Chironomid life-cycle toxicity test using spiked water or spiked sediment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
38. OECD, 2012. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
39. OECD, 2016a. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*). Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
40. OECD, 2016b. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 243: *Lymnaea stagnalis* Reproduction Test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
41. OECD, 2019. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 203: Fish, acute toxicity testing. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
42. Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*. 1981;291(5813):293-296. doi:[10.1038/291293a0](https://doi.org/10.1038/291293a0)
43. Eisen JS. History of zebrafish research. *The Zebrafish in Biomedical Research Biology Husbandry, Diseases and Research Applications*. 2020: 3-14. doi: [10.1016/B978-0-12-812431-4.00001-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00001-4)
44. Khan FR, Alhewairini SS. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism. In: Streba L, Gheonea DI, Schenker M. *Current Trends in cancer management*. IntechOpen. 2018. doi: [10.5772/intechopen.81517](https://doi.org/10.5772/intechopen.81517)
45. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Mathews L, et

- al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013; 496:498-503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- 46.ZFIN, 2021. Zebrafish strains. University of Oregon. EPA 615B2001. https://zfin.org/zf_info/zfbook/zfstrm.html. Access in 14 sep 2021.
- 47.Lee KY, Jang GH, Byun CH, Jeun M, Searson PC, Lee KH. Zebrafish models for functional and toxicological screening of nanoscale drug delivery systems: promoting preclinical applications. *Bioscience reports*. 2017;37(3):BSR20170199. doi:[10.1042/BSR20170199](https://doi.org/10.1042/BSR20170199)
- 48.Belanger SE, Rawlings JM, Carr GJ. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. *Environmental toxicology and chemistry*. 2013;201332, 1768-1783. doi:[10.1002/etc.2244](https://doi.org/10.1002/etc.2244)
- 49.Braunbeck T, Kais B, Lammer E, Otte J, Schneider K, Stengel D, Strecker R. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environmental science and pollution research international*. 2014; 22, 16247-16261. doi:[10.1007/s11356-014-3814-7](https://doi.org/10.1007/s11356-014-3814-7)
- 50.Sneddon LU, Halsey LG, Bury NR. Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. *The Journal of experimental biology*. 2017;220(Pt 17):3007-3016. doi:[10.1242/jeb.147058](https://doi.org/10.1242/jeb.147058)
- 51.Bayne K, Ramachandra GS, Rivera EA, Wang J. The Evolution of Animal Welfare and the 3Rs in Brazil, China, and India. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2015;54(2):181-191.
- 52.Rác Z, Allan B, Dwyer T, Thambithurai D, Crespel A, Killen SS. Identification of Individual Zebrafish (*Danio rerio*): A Refined Protocol for VIE Tagging Whilst Considering Animal Welfare and the Principles of the 3Rs. *Animals*. 2021;11(3):616. <https://doi.org/10.3390/ani11030616>
- 53.Workman P, Aboagye E, Balkwill F. et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer*, 2010;102(11):1555–1577. doi:[10.1038/sj.bjc.6605642](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605642)
- 54.Rinkwitz S, Mourrain P, Becker TS. Zebrafish: An integrative system for neurogenomics and neurosciences. *Progress in Neurobiology*, 2011;93(2):231-243. doi:[10.1016/j.pneurobio.2010.11.003](https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.11.003)
- 55.Garcia GR, Noyes PD, Tanguay RL. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. *Pharmacology and Therapeutics*, 2016;161:11-21. doi: [10.1016/j.pharmthera.2016.03.009](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.009).
- 56.Seixas MM. et al. Consciência Na Substituição Do Uso De Animais No Ensino: Aspectos Históricos, Éticos E De Legislação. *Revista Brasileira de Direito Animal*, 2014; 5(6):71-96. doi:[10.9771/rbda.v5i6.11073](https://doi.org/10.9771/rbda.v5i6.11073)
- 57.Augustsson, H, van de Weerd, HA, Kruitwagen, CL, Baumans, V. Effect of enrichment on variation and results in the light/dark test. *Laboratory Animals*, 2003;7(4), 328-340. doi:[10.1258/002367703322389898](https://doi.org/10.1258/002367703322389898)
- 58.Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. special ed ed. [s.l.: s.n.].
- 59.Huntingford FA, Adams C, Braithwaite VA, Kadri S, Pottinger TG, Sandoe P, Turnbull JF. Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology*, 2006;68(2), 332-372. doi:[10.1111/j.0022-1112.2006.001046.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2006.001046.x)
- 60.Stevens CH, Reed BT, Hawkins P. Enrichment for Laboratory Zebrafish-A Review of the Evidence and the Challenges. *Animals (Basel)*. 2021;11(3):698. doi:[10.3390/ani11030698](https://doi.org/10.3390/ani11030698)
- 61.Hawkins P, Dennison N, Goodman G, et al. Guidance on the severity classification of scientific procedures involving fish: Report of a Working Group appointed by the Norwegian Consensus-Platform for the Replacement, Reduction and Refinement of animal experiments (Norecopa). *Laboratory Animals*, 2011;45(4):219-224. doi:[10.1258/la.2011.010181](https://doi.org/10.1258/la.2011.010181)
- 62.Collymore C, Tolwani RJ, Rasmussen S. The behavioral effects of single housing and environmental enrichment on adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2015;54(3):280-285.
- 63.Kistler C, Hegglin D, Wurbel H, König B, Preference for structured environment in zebrafish (*Danio rerio*) and checker barbs (*Puntius oligolepis*). *Applied Animal Behaviour Science*, 2011, 135(4):318–327. doi: [10.1016/j.applanim.2011.10.014](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.10.014)
- 64.White LJ, Thomson JS, Pounder KC, Coleman RC, Sneddon LU. The impact of social context on behaviour and the recovery from welfare challenges in zebrafish, *Danio rerio*. *Animal Behaviour*, 2017;132:189-199. doi:[10.1016/j.anbehav.2017.08.017](https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2017.08.017)
- 65.Engeszer RE, Patterson LB, Rao AA, Parichy DM. Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*, 2007;4(1):21-40. doi: [10.1089/zeb.2006.9997](https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9997).
- 66.Best J, Adatto I, Cockington J, James A, Lawrence C. A novel method for rearing first-feeding larval zebrafish: Polyculture with type L saltwater rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Zebrafish*, 2010;7(3):289-295. doi:[10.1089/zeb.2010.0667](https://doi.org/10.1089/zeb.2010.0667)
- 67.CONSTITUIÇÃO FEDERAL. LEI Nº 11.794 DE 8 DE OUTUBRO DE 2008.Brasil, 2008. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2008/lei/11794.htm
- 68.Neiffer DL, Stamper MA. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: Considerations, methods, and types of drugs. *ILAR Journal*, 2009;50(4):343-360. doi:[10.1093/ilar.50.4.343](https://doi.org/10.1093/ilar.50.4.343)
- 69.Dammski AP, Muller BR, Gaya C, Regonato D. Zebrafish: Manual de Criação em Biotério. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2011;1-107.
- 70.Trevarrow B, Robison B. Genetic backgrounds, standard lines, and husbandry of zebrafish. *Methods in cell biology*. 2004;77:599-616. doi:[10.1016/s0091-679x\(04\)77032-6](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(04)77032-6)
- 71.Martins S, Monteiro JF, Vito M, Weintraub D, Almeida J, Certal AC. Toward an Integrated Zebrafish Health Management Program Supporting Cancer and Neuroscience Research. *Zebrafish*, 2016a; 13(00):S47–S55. doi: [10.1089/zeb.2015.1198](https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1198)
- 72.Martins T, Valentim AM, Pereira N, Antunes LM. Anaesthesia and analgesia in laboratory adult zebrafish: A question of refinement. *Laboratory Animals*, 2016b; 50(6), 476-488. doi:[10.1177/0023677216670686](https://doi.org/10.1177/0023677216670686)
- 73.Readman GD, Owen SF, Murrell JC, Knowles TG. Do fish perceive anaesthetics as aversive?. *PLoS One*. 2013;8(9):e73773. doi:[10.1371/journal.pone.0073773](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073773)
- 74.Valentim AM, Félix LM, Carvalho L, Diniz E, Antunes LM. A new anaesthetic protocol for adult zebrafish (*Danio rerio*): Propofol combined with lidocaine. *PLoS ONE*, 2016;11(1):e0147747. doi:[10.1371/journal.pone.0147747](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147747)
- 75.Martins T, Valentim A, Pereira N, Antunes LM. Anaesthetics and analgesics used in adult fish for research: A review. *Laboratory Animals*, 2019; 53(4): 325-341. doi: [10.1177/0023677218815199](https://doi.org/10.1177/0023677218815199)
- 76.Xing L, Quist TS, Stevenson TJ, Dahlem TJ, Bonkowsky JL. Rapid and efficient zebrafish genotyping using PCR with

- high-resolution melt analysis. *Journal of Visualized Experiments*, 2014;(84):e51138. doi:[10.3791/51138](https://doi.org/10.3791/51138)
77. Neiffer DL, Stamper MA. Fish sedation, analgesia, anesthesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. *ILAR journal*. 2009;50(4):343-360. doi:[10.1093/ilar.50.4.343](https://doi.org/10.1093/ilar.50.4.343)
78. Schroeder PG, Sneddon LU. Exploring the efficacy of immersion analgesics in zebrafish using an integrative approach. *Applied Animal Behaviour Science*, 2017;187:93-102. doi:[10.1016/j.applanim.2016.12.003](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.12.003)
79. De Lombaert MC, Rick EL, Krugner-Higby LA, Wolman MA. Behavioral characteristics of adult zebrafish (*Danio rerio*) after MS222 anesthesia for fin excision. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2017;56(4):377-381.
80. Le Vin AL, Adam A, Tedder A, Arnold KE, Mable BK. Validation of swabs as a non-destructive and relatively non-invasive DNA sampling method in fish. *Molecular Ecology Resources*, 2011;11(1):107-9. doi: [10.1111/j.1755-0998.2010.02909.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02909.x).
81. Breacker C, Barber I, Norton WH, McDearmid JR, Tilley CA. A Low-Cost Method of Skin Swabbing for the Collection of DNA Samples from Small Laboratory Fish. *Zebrafish*. 2017;14(1):35-41. doi: [10.1089/zeb.2016.1348](https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1348).
82. Campanella JJ, Smalley JV. A minimally invasive method of piscine tissue collection and an analysis of long-term field-storage conditions for samples. *BMC Genetics*, 2006;7, 5-8. doi:[10.1186/1471-2156-7-32](https://doi.org/10.1186/1471-2156-7-32)
83. Tilley, C.A., Carreño Gutierrez, H., Sebire, M. et al. Skin swabbing is a refined technique to collect DNA from model fish species. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1-17. doi:[10.1038/s41598-020-75304-1](https://doi.org/10.1038/s41598-020-75304-1)
84. Mason, G. Stereotypic behaviour in captive animals: Fundamentals and implications for welfare and beyond. *Stereotypic Animal Behaviour: Fundamentals and Applications to Welfare: Second Edition*, 2006:326-356.
85. Gouveia K, Hurt JL. Optimising reliability of mouse performance in behavioural testing: The major role of non-aversive handling. *Scientific Reports*, 2017;7:1-12. doi:[10.1038/srep44999](https://doi.org/10.1038/srep44999)
86. Mulder A. Journal of Applied Animal Welfare Effects of Environmental Enrichment for Mice: Variation in Experimental Results. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 2010;8705(776099595):7-41.
87. Strech D, Dirnagl U. 3Rs missing: animal research without scientific value is unethical. *BMJ Open Science*. 2019; 3(1):e000048. doi:[10.1136/BMJOS-2018-000048](https://doi.org/10.1136/BMJOS-2018-000048)
88. Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lázic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., Pearl, E. J., ... Würbel, H. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS biology*. 2020;18(7), e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
89. Wieschowski S, Silva DS, Strech D. Animal Study Registries: Results from a Stakeholder Analysis on Potential Strengths, Weaknesses, Facilitators, and Barriers. *PLoS biology*. 2016;14(11):1-12. doi:[10.1371/journal.pbio.2000391](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000391)
90. Séguret A, Collignon B, Halloy J. Strain differences in the collective behaviour of zebrafish (*Danio rerio*) in heterogeneous environment. *Royal Society open science*. 2016;3(10):160451. doi:[10.1098/rsos.160451](https://doi.org/10.1098/rsos.160451)
91. Lobban, C. S and Scheffer, M., 2021. Write Scientific Reports – The Library: University of Waikato [WWW Document]. Cambridge Univ. Press Cambridge. URL <https://www.waikato.ac.nz/library/guidance/guides/write-scientific-reports/#ElementsofaScientificReport> (accessed 9.17.21).
92. Mogil J, Macleod M. No publication without confirmation. *Nature*. 2017; 542:409-411. doi:[10.1038/542409a](https://doi.org/10.1038/542409a).
93. Needleman I, Moher D, Altman DG, Schulz KF, Moles DR, Worthington H. Improving the clarity and transparency of reporting health research: a shared obligation and responsibility. *Journal of dental research*. 2008;87(10):894-895. doi:[10.1177/154405910808701013](https://doi.org/10.1177/154405910808701013)
94. De Abreu MS, Giacomini ACVV, Echevarria DJ, Kalueff AV. Legal aspects of zebrafish neuropharmacology and neurotoxicology research. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018;101: 65-70. doi:[10.1016/j.yrtph.2018.11.007](https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.11.007)
95. Steward O. A Rhumba of "R's": Replication, Reproducibility, Rigor, Robustness: What Does a Failure to Replicate Mean?. *eNeuro*. 2016;3(4):ENEURO.0072-16.2016. doi:[10.1523/ENEURO.0072-16.2016](https://doi.org/10.1523/ENEURO.0072-16.2016)
96. Resnik DB, Shamoo AE. Reproducibility and Research Integrity. *Account Res*. 2017;24(2):116-123. doi:[10.1080/08989621.2016.1257387](https://doi.org/10.1080/08989621.2016.1257387)
97. Ioannidis JP. How to make more published research true. *PLoS Medicine*. 2014;11(10):e1001747. doi:[10.1371/journal.pmed.1001747](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001747)
98. Freedman LP, Cockburn IM, Simcoe TS. The Economics of Reproducibility in Preclinical Research. *PLoS Biol*. 2015;13(6):e1002165. doi:[10.1371/journal.pbio.1002165](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002165)
99. Gerlai R. Reproducibility and replicability in zebrafish behavioral neuroscience research. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2019;178:30-38. doi:[10.1016/j.pbb.2018.02.005](https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.02.005)
100. OECD, 1992. OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
101. OECD, 2000. OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 215: Fish, Juvenile Growth test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
102. OECD, 2009. OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 230: 21-day Fish Assay. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
103. OECD, 2018. OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 234: Fish Sexual Development Test (FSDT). Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
104. Andersen ML, Winter LMF. Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2019;91(suppl 1):e20170238. doi:[10.1590/0001-3765201720170238](https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170238)
105. Klein J. Improving the reproducibility of findings by updating research methodology Quality & quantity. 2021;1-13. doi:[10.1007/s11135-021-01196-6](https://doi.org/10.1007/s11135-021-01196-6)
106. Mehić B Professor. Bioethical Principles of Biomedical Research Involving Animals. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 2011;11(3):145-146.

107. Veldman M, Lin S. Zebrafish as a Developmental Model Organism for Pediatric Research. *Pediatric research*. 2008; 64:470-476 doi:[10.1203/PDR.0b013e318186e609](https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318186e609)
108. Holtzman NG, Iovine MK, Liang JO, Morris J. Learning to Fish with Genetics: A Primer on the Vertebrate Model *Danio rerio*. *Genetics*. 2016;203(3):1069-1089. doi:[10.1534/genetics.116.190843](https://doi.org/10.1534/genetics.116.190843)
109. Basnet RM, Zizioli D, Taweedet S, Finazzi D, Memo M. Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology. *Biomedicines*. 2019;7(1):23. doi:[10.3390/biomedicines7010023](https://doi.org/10.3390/biomedicines7010023)
110. Kari G, Rodeck U, Dicker AP. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2007;82(1):70-80. doi:[10.1038/sj.cpt.6100223](https://doi.org/10.1038/sj.cpt.6100223)
111. Gut P, Reischauer S, Stainier DYR, Arnaout R. Little fish, big data: zebrafish as a model for cardiovascular and metabolic disease. *Physiological reviews*. 2017;97(3):889-938. doi:[10.1152/physrev.00038.2016](https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2016)
112. Giannaccini M, Cuschieri A, Dente L, Raffa V. Non-mammalian vertebrate embryos as models in nanomedicine. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*. 2014;10(4):703-719. doi:[10.1016/j.nano.2013.09.010](https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.09.010)
113. Dai YJ, Jia YF, Chen N, et al. Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environmental toxicology and chemistry*. 2014;33(1):11-17. doi:[10.1002/etc.2406](https://doi.org/10.1002/etc.2406)
114. Cui C, Benard EL, Kanwal Z, et al. Infectious disease modeling and innate immune function in zebrafish embryos. *Methods in cell biology*. 2011;105:273-308. doi:[10.1016/B978-0-12-381320-6.00012-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381320-6.00012-6)
115. Lam SH, Chua HL, Gong Z, Lam TJ, Sin YM. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Developmental and comparative immunology*. 2004;28(1):9-28. doi:[10.1016/S0145-305X\(03\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(03)00103-4)
116. National Centre for the Replacement Refinement and Reduction of Animals in Research, NC3Rs. Responsibility in the use of animals in bioscience research: expectations of the major research councils and charitable funding bodies [Internet]. 2019. Available from: [https://nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Guidelines/Responsibility in the use of animals in bioscience research 2019.pdf](https://nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Guidelines/Responsibility%20in%20the%20use%20of%20animals%20in%20bioscience%20research%202019.pdf)
117. National Health and Medical Research Council, NHMRC; Australian Research Council. Australian code for the care and use of animals for scientific purposes. Vol. 2013. 2021. 86 p.
118. BRASIL. Resolução Normativa CONCEA n. 51, de 19 de maio de 2021. Dispõe sobre a instalação e o funcionamento das Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs e dos biotérios ou instalações animais. <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-normativa-concea-n-51-de-19-de-maio-de-2021-321534226>
119. BRASIL. (a) Resolução Normativa CONCEA n. 30, de 02.02.2016. Baixa a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA.
120. BRASIL. (b) Resolução Normativa CONCEA n. 32, de 06.09.2016. Baixa as Diretrizes de Integridade e de Boas Práticas para Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica.
121. Ogden BD. Principles of animal research: replacement, reduction, refinement, and responsibility. *Anim Law [Internet]*. 1996;2:167-70. Available from: https://heinonline.org/HOL/Page?public=%0Atrue&handle=hein.journals/anim2&div=12&start_page=167&collection=%0AJournals&set_as_cursor=0&men_tab=srchresults
122. Franco AL, Nogueira MNM, Sousa NGK, da Frota MF, Fernandes CMS, Serra M da C. Pesquisas em animais: uma reflexão bioética. *Acta Bioethica*. 2014;20(2):247-53. doi:[10.4067/S1726-569X2014000200012](https://doi.org/10.4067/S1726-569X2014000200012)
123. McLeod C, Hartley S. Responsibility and Laboratory Animal Research Governance. *Science Technology Human Values*. 2018;43(4):723-41. doi:[10.1177/0162243917727866](https://doi.org/10.1177/0162243917727866)
124. Reed B; Jennings M. Guidance on the housing and care of Zebrafish (*Danio rerio*). Available from: <https://www.aaalac.org/pub/?id=E9019693-90EC-FC4A-526E-E8236CC13B28>
125. Zagorac I. Fritz Jahr's Bioethical Imperative. *Synth Philos*. 2011;51:141-50.
126. MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*. 2015;14(10):721-731. doi:[10.1038/nrd4627](https://doi.org/10.1038/nrd4627)
127. Message R, Greenhough B. "But It's Just a Fish": Understanding the Challenges of Applying the 3Rs in Laboratory Aquariums in the UK. *Animals (Basel)*. 2019;9(12):1075. Published 2019 Dec 3. doi:[10.3390/ani9121075](https://doi.org/10.3390/ani9121075)
128. Bambino K, Chu J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. *Current topics in developmental biology*. 2017;124:331-367. doi:[10.1016/bs.ctdb.2016.10.007](https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.10.007)
129. Bertonecello KT, Bonan CD. Zebrafish as a tool for the discovery of anticonvulsant compounds from botanical constituents. *European journal of pharmacology*. 2021;908:174342. doi:[10.1016/j.ejphar.2021.174342](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174342)
- Vierstraete J, Fieuws C, Willaert A, Vral A, Claes KBM. Zebrafish as an in vivo screening tool to establish PARP inhibitor efficacy. *DNA Repair*. 2021;97:103023. doi:[10.1016/j.dnarep.2020.103023](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.103023)