



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AKILA LARA DE OLIVEIRA

**TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE PLANTAS MEDICINAIS:
AVALIANDO A DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS COM BASE NAS
DIRETRIZES ARRIVE (*Animals in Research: Reporting In Vivo
Experiments*)**

Campinas

2019

AKILA LARA DE OLIVEIRA

**TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE PLANTAS MEDICINAIS:
AVALIANDO A DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS COM BASE NAS
DIRETRIZES ARRIVE (*Animals in Research: Reporting In Vivo
Experiments*)**

Dissertação apresentada ao Programa à
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual de Campinas como para
dos requisitos exigidos para obtenção do título de
Mestra em Ciências na Área de Concentração
Ciências Farmacêuticas - Insumos
Farmacêuticos Naturais, Biotecnológicos e
Sintéticos

ORIENTADORA PROFA. DRA. ANA LUCIA TASCA GOIS RUIZ

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA AKILA LARA
DE OLIVEIRA E ORIENTADA PELO PROFA.
DRA. ANA LUCIA TASCA GOIS RUIZ

Campinas

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Rosana Evangelista Poderoso - CRB 6652

OL4t Oliveira, Akila Lara, 1992-
Toxicidade pré-clínica de plantas medicinais : avaliando a descrição dos métodos com base nas diretrizes ARRIVE (*animals in research: reporting in vivo experiments*) / Akila Lara de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Ana Lucia Tasca Gois Ruiz.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. Plantas medicinais. 2. Teste de toxicidade. 3. Avaliação pré-clínica de medicamentos. 4. Animais de laboratório. 5. Reprodutibilidade dos testes. 6. Revisão. I. Ruiz, Ana Lucia Tasca Gois, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Preclinical toxicity of medicinal plants : evaluation description of the methods based on ARRIVE guidelines (Animals in research: reporting in vivo experiments)

Palavras-chave em inglês:

Medicinal plants
Toxicity tests
Drug evaluation preclinical
Animals laboratory
Reproducibility of results
Review

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas: insumos farmacêuticos naturais, biotecnológicos e sintéticos

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Ana Lucia Tasca Gois Ruiz [Orientador]
Taís Freire Galvão
Vanessa Helena da Silva Souza

Data de defesa: 12-07-2019

Programa de Pós-Graduação: Ciências Farmacêuticas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5846-3089>
- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5464754100623582>

BANCA EXAMINADORA

Prof.a Dra Ana Lucia Tasca Gois Ruiz

Prof.a Dra Taís Freire Galvão Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade de Campinas

Prof.a Dra Vanessa Helena da Silva Souza –Centro Universitário de Jaguariúna

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **Akila Lara de Oliveira**, aprovada pela Comissão Julgadora em 12 de Julho de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, João Batista de Oliveira e Rosária de Fátima Lara, pelo dom da vida. O pouco tempo que convive com meu pai me ensinou o amor pelo aprendizado e a necessidade de estudar sempre mais. Amor esse que muitos levam uma vida para aprender e uma vida para ensinar. Com minha mãe aprendi a força e a fé, e por ela, sigo no caminho do aprendizado, todos os dias, com a mesma dedicação que ela demonstrou nos 21 anos que passei ao seu lado.

A minha querida sogra, presente dado pela vida a mim, por todo seu esforço, carinho e palavras durante minha caminhada.

A meu marido, meu braço direito, que aceitou caminhar junto comigo no caminho da pesquisa, e por todos os momentos felizes e difíceis que enfrentamos juntos.

A todos que estão passando por dificuldades em seus sonhos. Muitas vezes a vida te faz passar pelo caminho das pedras para te mostrar o quanto é capaz, para que nunca se esqueça quão grande é a sua força, e que nunca estás sozinho.

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus, força maior que me move e me ampara com amor ontem, hoje e sempre, sem o Qual nada posso.

À Profa. Dra. Ana Lucia Tasca Gois Ruiz, pela sua orientação, meu enorme agradecimento pela oportunidade de realizar este trabalho, por todo carinho nos momentos difíceis, e pelos ensinamentos e amizade que sempre carregarei comigo.

À Profa. Dra. Mary Ann Foglio por me aceitar como aluna no ingresso ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Insumos Farmacêuticos Naturais, Biotecnológicos e Sintéticos.

Ao prof. Dr. Jörg Kobarg e à profa. Dra. Fabiana Regina Nonato por contribuírem com o meu trabalho fazendo parte da minha banca de qualificação.

À bibliotecária Patrícia de Paula Ravaschio, da biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas-Unicamp, que prestou preciosas informações para a realização deste trabalho. E a técnica em biblioteconomia Claudinéia Melo, pelas excelentes dicas quanto ao início deste trabalho.

À minha sogra e ao meu sogro, Maria Aurora Leite e Antônio Carlos de Medeiros, pela dedicação e por realizar o impossível, para que este sonho fosse realizado. Especialmente pelas palavras de conforto, e paciência nos momentos difíceis, sem vocês nada disso seria possível.

A meu marido Matheus Leite de Medeiros, pelo seu amor, e por aceitar dividir o mesmo sonho. Passamos por momentos muito difíceis, mas tivemos momentos muito felizes e de aprendizado durante essa caminhada. Muito obrigada por sempre acreditar em mim, e fazer o impossível pelo meu sonho.

A meu tio Lino, pelo empenho e carinho, e por sempre estar disponível a ajudar.

As minhas irmãs, Sthefany Lara de Oliveira, por suas dicas editoriais, e Smilhyn Lara de Oliveira, pelo amor, carinho e compreensão.

A minha grande amiga Isadora Caruso Fontana, unidas pelo amor a pesquisa, por estar comigo nos momentos difíceis, por suas palavras de incentivo, e por me ajudar quando sempre necessito.

Aos animais que são o motivo pelo qual cada dia mais eu busco o conhecimento, todos aqueles que já passaram em minha vida, e todos aqueles que passarão, em especial a minha pequena Laila, seu amor me faz feliz. Muito obrigada!

Aos todos os amigos e familiares que sempre torcem por mim, e aos colegas de trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

*“Só há duas maneiras de viver a vida:
A primeira é vivê-la como se os milagres não
existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.”*

Albert Einstein

*“Portanto, diga a ela que o caminho
que vem à frente terá muitas pedras, porque ela
decidiu deixar o caminho do conforto, mas, depois,
ela verá que o caminho das pedras a levou ao melhor
caminho que ela poderia encontrar.”*

Rosária F. Lara

RESUMO

Os estudos pré-clínicos são fundamentais na pesquisa científica em ciências biomédicas. Por razões éticas, científicas e econômicas, experimentos com animais devem ser devidamente planejados e analisados, e seus resultados bem relatados. Apesar da utilização de plantas medicinais remontar tempos antigos, a utilização segura na terapêutica medicamentosa de humanos e animais requer tanto a avaliação do potencial tóxico quanto estudos de eficiência farmacológica pré-clínicos. Este estudo teve como objetivo avaliar como foram reportados os métodos *in vivo* para avaliação de toxicidade de plantas medicinais. Foi realizado o levantamento sistemático, entre outubro e novembro de 2018, em bases de dados científicos (SCOPUS, *Embase*, *Web of Science*, CAB DIRECT, Biblioteca Virtual em Saúde), de artigos que fizeram a avaliação da toxicidade pré-clínica de plantas medicinais, no ano de 2017. A seleção dos descritores foi feita com base nos vocabulários Descritores em Ciência da Saúde e *Medical Subject Headings* e a construção da estratégia de busca foi adequada para cada base de dados citada. Para extração das características dos estudos foram utilizadas as diretrizes *Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments* (The ARRIVE guideline), com adaptações. O relato dos modelos experimentais foi analisado quanto a descrição de animais, condições de manutenção e declaração ética (tema 1), desenho experimental da avaliação toxicológica (tema 2) e procedimentos experimentais e análise da avaliação toxicológica (tema 3). Foram encontrados 426 artigos que, após remoção de duplicatas e realização das fases de seleção segundo os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos, resultaram na amostra final de 153 artigos. Referente aos modelos de teste de toxicidade foram encontrados relatos de toxicidade aguda (126), toxicidade subaguda (35), toxicidade subcrônica (34) e toxicidade crônica (3), tanto aplicados individualmente quanto em combinações. A maioria dos artigos (81 - 89,9%) descreveu sexo, linhagem e peso dos animais e apenas um terço dos estudos descreveu a idade dos animais. As condições de manutenção dos animais foram descritas pela maioria dos artigos não tendo sido encontrado nenhum relato de enriquecimento ambiental. A submissão do estudo ao comitê de ética de pesquisa com animais foi relatada por 81,7% dos estudos e apenas 47,7% descreveram o número do método aprovado. A utilização de processo de randomização foi descrita por 31,3% dos estudos, e 1,5% relataram como fizeram este processo. O cegamento nas análises realizadas foi descrito por apenas um estudo. As doses utilizadas foram descritas por 96,5% dos estudos avaliados, com intervalo de doses muito variado. As medidas de análise da toxicidade como avaliação e frequência ponderal foram descritas por 47,5 e 40,9% dos

estudos, respectivamente. O controle do consumo de ração e de água não foi descrito pela maioria (78,8 e 87,9%, respectivamente) dos estudos. Na amostra analisada encontramos deficiências do relato quanto a descrição das características dos animais, medidas para diminuir o viés, e itens quanto ao procedimento experimental da avaliação toxicidade de plantas medicinais. Essas deficiências podem tanto comprometer a reprodutibilidade dos resultados quanto a transposição dos dados em animais para o uso em humanos, reforçando a necessidade de medidas para melhorar a redação científica.

Palavras-chaves: Plantas Medicinais. Testes de toxicidade. Avaliação pré-clínica de medicamentos. Animais de laboratório. Reprodutibilidade dos testes. Revisão.

ABSTRACT

Many biomedical researches come from pre-clinical studies. For ethical, scientific and economic reasons, experiments with laboratory animals should be properly planned and analyzed and the afforded results should be transparently reported. Although the use of medicinal plants back to ancient times, their safe use for human and animal pharmacotherapy requires both the evaluation of toxic potential and pre-clinical pharmacological efficiency studies. This study aimed to evaluate how *in vivo* methods for toxicity evaluation of medicinal plants have been reported. Therefore, a systematic survey was conducted between October and November 2018 in scientific databases (SCOPUS, Embase, Web of Science, CAB DIRECT, Biblioteca Virtual em Saúde) looking for articles that described pre-clinical toxicity evaluation of medicinal plants in 2017. The descriptors were selected based on the Health Sciences Descriptors (DeCS) and Medical Subject Headings (MeSH) dictionaries and the construction of the search strategy was adequate for each database cited. To extract the characteristics of the collected sample, the ARRIVE guideline (Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments) was used, with some adaptations. The experimental models were analyzed regarding the description of animals, maintenance conditions and ethical declaration (theme 1), experimental design of toxicological evaluation (theme 2) and experimental procedures and analysis of toxicological evaluation (theme 3). Thereby, 426 articles were found resulting in the final sample of 153 articles after duplicates removal and realization of the selection phases. Among them, there were 126 models of acute toxicity, 35 of subacute toxicity, 34 of subchronic toxicity and 3 of chronic toxicity, either individually or in combinations. Considering Theme 1, most of the articles (81 - 89.9%) described sex, lineage and weight of the animals used, but only one third of the studies described the age. Majority of the articles described the maintenance conditions of the animals and none report described the environmental enrichment. Regarding the description of the ethics statement, although the majority of studies (81.7%) reported the submission of the study to an animal research ethics committee, only 47.7% described the protocol number. In theme 2, the use of randomization process was described by 31.3% of the studies, and only 1.5% described how they did this process. In theme 3, almost all experimental models described the doses used, with huge variation on dose range. In addition, during the toxicity analysis, most of the experimental models did not describe the evaluation of weight assessment and frequency, feed and water intake. Our results indicated that in the reporting of toxicity test protocols, while some data had been completely described, others still incompletely reported. This

deficiency may both compromise the results reproducibility and the data transposition for human use, reinforcing the need of measures to improve scientific writing.

Keywords: Plants medicinal. Toxicity testes. Drug evaluation preclinical. Animals laboratory, Reproducibility of results. Review.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Resultados do levantamento bibliográfico por base de dados (%).	41
Figura 2 - Diagrama das fases de busca e seleção do levantamento bibliográfico.....	42
Figura 3- Quantidade de artigos (%) encontrados em função do tipo de métodos de avaliação de toxicidade, individual ou combinado.....	43
Figura 4- Relação dos países de origem dos artigos incluídos no estudo (n = 153).....	44
Figura 5 – Relação dos Países de origem dos artigos que realizaram apenas o métodos de Toxicidade Aguda (n = 84).....	45
Figura 6 – Relação de Países de origem dos artigos que realizaram apenas o métodos de Toxicidade Subaguda (n=12).....	45
Figura 7- Relação de Países de origem dos artigos que realizaram apenas o métodos de Toxicidade Subcrônica (n=11)	45
Figura 8 – Número de método de avaliação de toxicidade (aguda, subaguda, subcrônica e crônica) encontrado na amostra deste levantamento (n = 153).	63
Figura 9 – Frequência de relato (em números absolutos) do tempo de tratamento e acompanhamento nos método de toxicidade encontrados.....	64
Figura 10 – Número de subitens em cada tema analisado, e suas respectivas descrições (Análise geral e por métodos individual de toxicidade).....	78
Figura 11- Representação dos artigos encontrados em revistas que endossam e não endossam as diretrizes ARRIVE (n =153).....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicação da Pergunta estruturada (PICO) ao questionamento da pesquisa* e Descritores em Ciência da Saúde sugeridos.	33
Tabela 2 - Descritores utilizados para o levantamento bibliográfico, segundo o vocabulário estruturado e Descritores em Ciência da Saúde (DeCS) e ao vocabulário médico Medical Subject Headings (MeSH)	33
Tabela 3-Nacionalidade dos artigos que fizeram uso da combinação de métodos de avaliação da toxicidade.....	46
Tabela 4- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto a declaração ética e apresentação do número de métodos de aprovação (n = 153).	48
Tabela 5- Frequência de relato (em números absolutos e %) da descrição quanto a declaração ética e apresentação do número de métodos de aprovação dos países mais encontrados na análise geral	49
Tabela 6 - Frequência de relato (em números absolutos) da descrição dos animais quanto ao sexo, linhagem, idade e peso nos artigos avaliados (n = 153 artigos).	50
Tabela 7- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição das condições de manutenção dos animais nos artigos avaliados artigos (n = 153).	53
Tabela 8 - Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto desenho do estudo da avaliação de toxicidade análise geral, e por métodos de toxicidade	56
Tabela 9- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto à randomização na avaliação da toxicidade análise geral, e por métodos de toxicidade	57
Tabela 10- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto à cegamento análise geral e por métodos de toxicidade.	58
Tabela 11- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto número da amostra na avaliação de toxicidade, análise geral e por métodos de toxicidade.....	59
Tabela 12 – Frequência de relato (em números absolutos) da descrição da utilização de diretrizes OECD nos protocolos analisados.	67
Tabela 13- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição das características da amostra, análise geral e por métodos de toxicidade	69

Tabela 14- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto aos parâmetros ordem para tratamento, sinais clínicos (descrição e ordem de observação), avaliação ponderal, consumo de ração e água no método de toxicidade selecionados.....	72
Tabela 15- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto a manuseio experimental na coleta de sangue e órgãos-Análise geral (n = 198)	73
Tabela 16 - Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto a manuseio experimental na coleta de sangue e órgãos - Toxicidade Aguda (n = 126).....	74
Tabela 17 - Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto a manuseio experimental na coleta de sangue e órgãos - Toxicidade Subaguda (n = 35).....	75
Tabela 18 - Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto a manuseio experimental na coleta de sangue e órgãos- Toxicidade Subcrônica (n = 34).	75
Tabela 19- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto a manuseio experimental na coleta de sangue e órgãos- Toxicidade Crônica (n=3).....	76
Tabela 20- Temas, itens e subitens analisados nos método de toxicidade no estudo de segurança de plantas medicinais.....	77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Experimentação animal, reprodutibilidade dos estudos pré-clínicos e as diretrizes ARRIVE	18
1.2 Avaliação da toxicidade de plantas medicinais	25
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3. MÉTODOS	31
3.1 Identificação do estudo.....	32
3.1.2 Identificação do problema	32
3.1.3 Bases de dados e estratégia de busca:.....	33
3.1.4 Identificação de outras fontes de estudo.....	34
3.1.5 Seleção dos estudos	35
3.1.7-Definição dos critérios de inclusão e exclusão.....	35
3.2 Características do estudo a serem extraídas	36
3.2.1 Identificação dos estudos.....	37
3.2.2 Perguntas de avaliação e método de coleta de dados	37
3.3 Avaliação de risco de viés e qualidade do estudo	39
3.4 Análise de dados	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Análise da busca, seleção dos artigos e características dos estudos	41
4.3 Análise da descrição dos métodos experimentais empregados na avaliação toxicológica.....	48
4.3.1 Tema 1 - Declaração ética, animais e condições de manutenção dos animais	48
4.3.2 Tema 2 - Desenho experimental da avaliação de toxicidade.....	55

4.3.3 Tema 3 - Procedimentos experimentais e análise da avaliação toxicidade	61
4.4 Considerações sobre levantamento bibliográfico da análise toxicológica de plantas medicinais	76
5- CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS ¹	85
APÊNDICES	95
Apêndice 1: Estratégias de busca segundo a base de dados	95
Apêndice 2 - Ckecklist utilizado na avaliação dos artigos	105
Apêndice 3 - Número de artigos encontrados em cada métodos de avaliação de toxicidade individual ou combinado com outro métodos	108
Apêndice 4 - Espécies de animais experimentais utilizadas nos métodos de toxicidade (aguda, subaguda, subcrônica e crônica) em números absolutos	108
Apêndice 5 - Doses máximas administradas por via oral/intraperitoneal nos métodos de toxicidade	109
Anexo 1- As diretrizes ARRIVE- (<i>The ARRIVE Guidelines Checklist Animal Research: Reporting In Vivo Experiments</i>) -(Kilkenny et al., 2010).....	111
Anexo 2- Verificação de Originalidade e Prevenção de Plágio	113

1. INTRODUÇÃO

1.1 Experimentação animal, reprodutibilidade dos estudos pré-clínicos e as diretrizes ARRIVE

A experimentação animal em pesquisas é uma prática global, cujos principais propósitos são a pesquisa médica fundamental, a obtenção de conhecimento sobre biologia básica, o desenvolvimento de medicamentos, vacinas e dispositivos médicos e os testes de toxicidade de drogas, produtos químicos e de consumo (Taylor et al., 2008)

Nos estudos pré-clínicos encontramos a generalidade das informações dos mecanismos fisiológicos/patológicos dos temas relacionados à saúde que acompanham a humanidade há séculos (Hooijmans et al., 2018). A validade e a confiança nos estudos que utilizam a experimentação animal são embasadas pela realização de planejamento adequado, considerando-se a escolha de animais, matérias e métodos que sejam alinhados os objetivos da pesquisa, seguros e reproduzíveis (Deguchi et al., 2006).

A espécie animal empregada na experimentação irá depender do modelo de doença humana que está sendo investigada, destacando-se a utilização de zebrafish, macacos, ratos e camundongos, sendo que estes últimos representam 95% de todos os animais utilizados na pesquisa (Tillmann, 2017).

Estimativas quanto ao número de animais utilizados na pesquisa mundial são de difícil acesso, já que muitos países não têm legislações quanto a coleta e publicação de estatísticas sobre procedimentos com animais. Assim, para conseguir tais dados seriam necessários aumentar a confiança e comparação de dados de estimativas de animais de laboratório internacionalmente por meio de legislação e relato (Silla et al., 2010).

Considerando dados estatísticos sobre o uso de animais publicados por 37 países, combinado a modelos estatísticos para prever o uso de animais em função das taxas de publicação para mais 142 países, um estudo estimou, de maneira conservadora, o uso global de 58,3 milhões de animais, incluindo vertebrados e espécies de invertebrados, em 179 países no ano de 2005. Este mesmo estudo, com base em dados disponíveis quanto a outros usos de animais por alguns países, como animais mortos para fornecimento de tecidos e animais utilizados para manutenção de estirpes geneticamente modificadas, obteve por extrapolação de dados a estimativa de 82-154 milhões de animais como representativa, ainda que subestimada, de uso total de animais pela ciência (Taylor et al., 2008).

Em relação a estimativas quanto ao número de animais utilizados na pesquisa no Brasil há escassez de dados. Um levantamento realizado com objetivo de estimar o número de animais utilizados na experimentação no Brasil analisou artigos publicados no ano de 2006 em periódicos científicos do estado do Paraná, nas áreas de ciências agrárias, ciências biológicas, ciências da saúde, ciência ambiental e tecnologia de alimentos, chegando a um total de 3.497.653 animais utilizados em experimentos. Este número foi considerado subestimado, pois reflete apenas o número de animais usados em experimentos publicados, e apenas publicações de revistas de um estado brasileiro, apontando a urgência da implantação de um sistema formal de registro e controle para uso de animais de experimentação no Brasil (Silla et al., 2010).

Anualmente, os estados membros da União Europeia (EU) devem comunicar dados estatísticas quanto a utilização dos animais na pesquisa, os quais são compilados em um relatório com número total de animais utilizados para fins de pesquisa pela Comissão Europeia de Meio Ambiente. A periodicidade de publicação deste relatório consolidado foi alterada recentemente e, por isso, o último relatório disponível refere-se ao ano de 2013 e o próximo deve ser publicado no final do ano de 2019. Considerando-se os dados do último relatório (2013), foram utilizados 11,5 milhões de animais em experimentação científica no ano de 2011, sendo roedores e coelhos as espécies mais utilizadas (80% do total). Em relação ao propósito dos experimentos, as análises toxicológicas e outros testes de segurança representaram 8,75% (1.004.873 animais) do número total de animais utilizados para fins experimentais. Considerando-se apenas os animais utilizados em teste de toxicidade, 47,5% dos animais foram utilizados em testes de toxicidade aguda e subaguda, 7,97% dos animais foram utilizados em testes de toxicidade subcrônica e crônica e o restante em outros testes de segurança (European Commission, 2013).

Essas estimativas e dados censitários nos levam a entender como o bom relato dos estudos com animais é fundamental tanto para comunidade científica quanto para a sociedade que financia os estudos com animais. O manuscrito científico publicado em periódico científico é um meio pelo qual os resultados da pesquisa são relatados com a comunidade científica e a sociedade. A qualidade do relato dos objetivos, métodos e resultados obtidos devem ser transparentes de modo a permitir a reprodutibilidade dos dados, ou seja, devem ser repetidos em qualquer lugar por qualquer pesquisador, como também seguir rigor empregado quando ao delineamento do projeto para a adequada apreciação da pesquisa (Pereira, 2011).

É de responsabilidade dos autores a descrição clara dos métodos de experimentação animal, incluindo o objetivo da pesquisa e/ou as hipóteses a serem testadas, o motivo pelo qual o modelo animal está sendo utilizado em particular, juntamente com informações quanto a espécie, linhagem, origem do animal utilizado. Além disso, os detalhes de cada experimento devem ser destacados no relato, incluindo o desenho do estudo e o número de animais utilizados, e os métodos estatísticos utilizados para a análise (Festing e Altaman, 2002).

A baixa reprodutibilidade nos estudos pré-clínicos pode ser associada as falhas, inadequações ou omissões que impedem a replicação dos resultados devido ao mal relato científico dos métodos empregados (Freedman et al., 2015). Estas falhas, inadequações ou omissões podem aparecer apenas no relato final, como análise estatística incorreta ou inadequada dos resultados, ou já estarem presentes desde o início do planejamento experimental, como delineamento de tamanho insuficiente da amostra. Outros problemas apontados são competição entre laboratórios, pressão para publicar, ou ainda a tendência para publicação apenas de dados positivos (Prinz et al., 2011).

Dentre as medidas para avaliar a reprodutibilidade de uma determinada pesquisa, quatro perguntas podem ajudar o pesquisador a avaliar tanto sua própria pesquisa quanto estudos já publicados (Samsa e Samsa, 2019). São elas:

a) Se os dados brutos fossem organizados e analisados de forma diferente, a resposta seria a mesma? Ou seja, a adequada preparação dos dados brutos obtidos pode ajudar na identificação e resolução de potenciais erros. Além disso, esta preocupação aponta para a necessidade de que dados brutos originais, arquivos contendo as análises finais e todos os dados gerados nas análises precisam ser devidamente armazenados para checagens futuras;

b) Se outro pesquisador analisasse os mesmos dados brutos, ele chegaria a uma conclusão similar? Neste quesito busca-se evidenciar a robustez e seletividade dos relatos. Via de regra, um resultado estatístico pode ser considerado robusto se diferentes métodos de análise chegam a resultados similares. Entretanto, se os dados foram analisados de forma seletiva, uma segunda avaliação do mesmo conjunto de dados brutos pode levar a um resultado estatístico diferente;

c) Se um pesquisador tentar repetir o estudo em questão, de maneira mais exata possível, ele chegaria a uma conclusão semelhante? Esta questão remete a quão detalhada é a descrição dos procedimentos experimentais e se essa descrição permite a repetição adequada de um determinado métodos;

d) Se um pesquisador tentar desenvolver um estudo semelhante ao estudo em questão, as conclusões também serão semelhantes? Este item busca refletir sobre a reprodutibilidade entre estudos e possíveis diferenças podem ser atribuídas a vieses de interpretação, artefatos ou simplesmente diferenças reais (Samsa e Samsa, 2019).

Em 2016, a prestigiada revista *Nature* publicou, sob o título “*1,500 scientists lift the lid on reproducibility*”, os resultados de uma pesquisa sobre reprodutibilidade realizada através da aplicação de um breve questionário *on-line* a 1576 pesquisadores. Segundo esse levantamento, mais de 70% dos pesquisadores tentaram sem sucesso reproduzir experimentos realizados por outros cientistas enquanto mais da metade dos entrevistados não conseguiu reproduzir seus próprios experimentos. Além disso, 52% dos entrevistados concordam que existe uma crise de reprodutibilidade, porém menos de 31% atribuem a falha na reprodução à publicação de resultados errôneos. A confiança na literatura publicada ainda é grande, com 70% dos pesquisadores reportando confiabilidade em mais da metade dos trabalhos publicados em suas respectivas áreas (Baker, 2016).

Além desses dados, a pesquisa levantou as possíveis causas dos problemas de reprodutibilidade. As causas apontadas mais frequentemente foram relatos seletivos, pressão para publicar, baixo poder estatístico ou análise deficiente, baixa replicação no laboratório original e supervisão/orientação insuficiente. Além dessas também foram apontadas, com menor frequência, desde o não relato adequado dos métodos, má concepção do projeto experimental, dados brutos não disponíveis, fraude, revisão por pares insuficiente, falta de conhecimentos técnicos necessários para a reprodução, variabilidade dos reagentes padrão e até mesmo má sorte. Também foi perguntado aos pesquisadores sugestões para a resolução desse problema de reprodutibilidade e as respostas indicaram, como principais ferramentas, melhor compreensão dos métodos estatísticos, melhores relações de supervisão/orientação, além de desenho experimental mais robusto (Baker, 2016).

A reprodutibilidade total dos estudos pré-clínicos não é alcançável, nem mesmo desejável, uma vez que isso implicaria em elevação drástica nos custos desses estudos com consequente redução acentuada do número de estudos. Porém, a baixa reprodutibilidade dos estudos pré-clínicos causa maior impacto no desenvolvimento de novas terapias, e nos pacientes que esperam por novos tratamentos para salvar suas vidas. Isto porque o desenvolvimento de novos

medicamentos depende da produção cumulativa de conhecimento e da replicação de dados, peças-chaves no desenvolvimento do processo científico (Freedman et al., 2015).

Estudos pré-clínicos mal projetados, mal conduzidos e/ou mal relatados geram grandes custos desnecessários (Freedman et al., 2015), em contradição com aos princípios deixados por Russell e Burch (1959) sobre a contínua necessidade de substituir, reduzir e refinar (os 3Rs: *Replacement, Reduction, Refinement*) os métodos que utilizam animais de laboratório

Pensando nessa temática vários organismos internacionais têm se dedicado à melhoria contínua da experimentação animal, dentre eles pode-se destacar o *National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research* (NC3Rs, <https://www.nc3rs.org.uk/>). Além da divulgação de materiais de estudo, os trabalhos desenvolvidos por este centro visam apoiar pesquisas que buscam o desenvolvimento científico e tecnológico de métodos que substituam, reduzam ou refinem o uso de animais em pesquisa (os 3Rs), garantindo experimentos cada vez mais robustos e reproduzíveis, além de proporcionar o melhor bem-estar para animais de laboratório. Dentre os esforços do centro NC3Rs, um deles tem por objetivo a temática do relato das pesquisas utilizando animais, disponibilizando para consulta pública as diretrizes *Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments* (The ARRIVE guidelines) (Kilkenny et al., 2010).

Essas diretrizes surgiram após levantamento sistemático preliminar realizado por Kilkenny et al. (2009), que analisou a descrição de artigos científicos oriundos de pesquisas financiadas pelo setor público dos Estados Unidos da América (EUA) e do Reino Unido. Em relação ao item qualidade dos relatórios foram analisados a clareza na descrição de objetivo, número de experimentos descritos, unidade experimental (um animal ou grupos de animais), identificação da espécie (linhagem, idade e sexo), número de animais e descrição do método para delineamento do tamanho da amostra. Na qualidade do desenho experimental foi investigado como os estudos incorporaram medidas para reduzir o viés, tais como citação e descrição de métodos de randomização, cegamento e planejamento fatorial para número total de animais utilizados. E a qualidade da análise estatística buscou evidenciar como eram relatados o uso de métodos estatísticos, seja para a determinação do número de unidade experimental, e a análise dos resultados (Kilkenny et al., 2009).

Várias deficiências nos dados relatados foram encontradas, e a partir desse levantamento foram elaboradas as diretrizes ARRIVE, publicadas em 2010, com propósito de

melhorar a redação dos artigos científicos de pesquisas que utilizaram animais experimentais. Constitui-se em uma lista de verificação com 20 itens, dividido em subitens, referentes ao título, resumo, introdução, métodos, resultados e discussão. O propósito das diretrizes é “melhorar o relato da investigação realizada com animais de laboratório, maximizando as informações publicadas, promovendo a publicação de manuscritos que sejam replicáveis, transparentes, precisos, detalhados, concisos, com ordem lógica e bem escritos, para consequentemente minimizar os estudos desnecessários” (Kilkenny et al., 2010).

Embora essas diretrizes não tenham como objetivo principal o planejamento da pesquisa com animais, para que as diretrizes ARRIVE possam ser aplicadas de modo eficiente na redação do manuscrito, é necessário que elas sejam utilizadas desde o início do planejamento do estudo. Isto porque vários subitens necessários para a descrição do item materiais e métodos fazem parte do planejamento experimental. Desta forma, será muito difícil descrever, por exemplo, a idade e o peso dos animais utilizados se nenhum registro foi realizado, ou o processo de randomização se o mesmo não foi empregado, ou ainda detalhes referentes a doses, formulações e período do dia que ocorreu o experimento, entre outros, se não existiu um planejamento prévio seguido de registro adequado das anotações experimentais.

Cada vez mais as diretrizes ARRIVE têm sido divulgadas e endossadas por periódicos científicos; um levantamento recente indicou cerca de 600 periódicos endossam as diretrizes ARRIVE, porém isso não tem significado uma aplicação das mesmas na mesma proporção (Cressey, 2016).

Alguns estudos investigaram como as diretrizes ARRIVE foram recebidas e aplicadas pela comunidade científica. Em 2016, um grupo de pesquisadores investigou o impacto das diretrizes no relato de estudos pré-clínicos do uso de células tronco mesenquimais no tratamento de lesão pulmonar aguda incluídos em uma revisão sistemática sobre esse assunto. Os autores observaram, entre outros pontos, que não houve relação entre o fator de impacto da revista, que é uma medida para avaliar a qualidade e o prestígio de periódicos, e o quão incompleto estava o relato. Ou seja, a frequência de descrição deficiente de detalhes foi muito parecida tanto entre periódicos de baixo fator de impacto quanto entre aqueles de alto fator de impacto. Esses dados sugeriram que escrever adequadamente é problema de toda a comunidade científica, independente de periódicos, revisores ou laboratórios, e que não necessariamente o fator de impacto da revista reflete um melhor relato de pesquisa (Avey et al., 2016).

Outro estudo buscou avaliar a visão dos pesquisadores sobre a qualidade da conduta experimental e do relato dos mesmos na literatura. Para tanto, 302 participantes, recrutados em instituições acadêmicas, indústria, instituições governamentais e privadas da Suíça, foram convidados a responder um questionário on-line. Segundo os dados obtidos, a espécie animal mais utilizada foi o camundongo (60,6%) seguida pelo rato (15,6%); quanto a publicações, a maioria dos entrevistados já tinham publicado artigos científicos sendo que 57% publicaram de 1 a 20 trabalhos, e 36,4% publicaram mais de 20 trabalhos (Reichlin et al., 2016).

No tocante ao conhecimento das diretrizes ARRIVE, 132 participantes (43,7%) relataram conhecer as diretrizes, dos quais 24 disseram estar familiarizados com essas diretrizes, 35 disseram terem lido e 73 apenas haviam ouvido falar sobre a mesma. Ainda, 40 participantes responderam que aderiram às diretrizes, 46 participantes ocasionalmente as utilizam enquanto 20 participantes não aderiram. Por outro lado, 170 participantes (56,3%) reportaram não conhecer as diretrizes. Referente a publicação de artigos, considerando-se o último artigo publicado em periódico que endossou as diretrizes, 27,4% dos pesquisadores relataram conhecer as diretrizes enquanto a maioria dos participantes (51%) afirmou que nunca havia ouvido falar das mesmas (Reichlin et al., 2016).

Mais recentemente, um estudo avaliou a hipótese de que os artigos publicados em periódicos que apoiavam as diretrizes ARRIVE teriam melhores padrões de relatório que aqueles publicados em periódicos que não apoiavam essas diretrizes (Leung et al., 2018). Para tanto, os autores fizeram uma revisão sistemática sobre artigos relacionados à anestesia, analgesia e estudos de bem-estar animal publicados em 2009 (pré-lançamento das diretrizes) e em 2015 (cinco anos após o lançamento), nos periódicos *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *Comparative Medicine*, *Animal Welfare* e *Laboratory Animals and Alternatives to Animal Experimentation* (apoiam ARRIVE) e *Applied Animal Behaviour Science* e *Experimental Animals* (não apoiam ARRIVE). A condição de apoiar ARRIVE foi identificada pela recomendação de seguimento das diretrizes descrita nas instruções para os autores e confirmada por comunicação via e-mail (Leung et al., 2018).

Esta estratégia de busca resultou em 236 artigos analisados. Os resultados encontrados indicaram que houve um aumento significativo na frequência (%) de manuscritos com descrição completa dos itens listados nas diretrizes ARRIVE quando comparados os anos de 2009 e 2015. Entretanto, essa melhora não foi dependente do tipo de periódicos, se apoiador ou não das

diretrizes, uma vez que a frequência foi similar em ambos os casos. Quando foram analisados a descrição de itens individualmente, os periódicos que apoiam as diretrizes tiveram melhora significativa, na comparação entre os anos de 2009 e 2015, na descrição do resumo, das condições de habitação e criação e de tamanho da amostra. Já para os periódicos que não apoiam as diretrizes, as melhoras foram significativas na descrição da declaração ética, dos animais experimentais e das interpretações/implicações científicas. Mesmo com melhoras, os itens relacionados a descrição da qualidade do desenho do estudo, como os fatores que refletem o viés (cegamento, cálculo do tamanho da amostra e tratamento de dados) ainda continuavam entre os itens não descritos ou descritos de forma incompleta, considerando-se todos os periódicos analisados. Estes resultados mostraram que a hipótese postulada era falsa e corrobora a ideia de que apenas o apoio às diretrizes não significa adesão efetiva às mesmas (Leung et al., 2018).

Embora tenham-se passados nove anos da publicação das diretrizes ARRIVE, pode-se considerar que a sociedade científica ainda está se adaptando a sua utilização, tanto periódicos como pesquisadores. O que é evidente é que as diretrizes ARRIVE não inserem itens novos, ou revolucionários, com relação ao planejamento e execução da experimentação animal. Tudo o que está refletido em seus tópicos são elementos essenciais para o desenvolvimento e relato das pesquisas com animais, cabendo ao pesquisador que trabalha com experimentação animal conhecê-las, executá-las e reporta-las de forma completa.

1.2 Avaliação da toxicidade de plantas medicinais

Este estudo teve como escopo de pesquisa realizar um levantamento sistemático utilizando as diretrizes ARRIVE como ferramenta de avaliação do relato de métodos empregados na avaliação de toxicidade de plantas medicinais em modelos pré-clínicos.

A utilização de plantas medicinais como remédio advém desde antiguidade. É da rica biodiversidade que compõem este planeta que deriva as moléculas que foram, são e serão úteis tanto para terapêutica quanto para os estudos de biologia celular, fisiologia e processos patológicos. A base da farmacoterapia até meados do século XIX derivava de preparações caseiras obtidas a partir de produtos naturais, principalmente de plantas. Com os avanços tecnológicos nas áreas de química e farmácia, esse arsenal tornou-se fonte de milhares de fármacos utilizados até os dias atuais tais como relaxantes musculares, anti-hipertensivos, anti-inflamatórios e fármacos empregados no tratamento do câncer, entre outros. Em muitas culturas, as plantas medicinais

desempenham um papel essencial na promoção da saúde (Cragg e Newman, 2013; Braga et al., 2017).

O que sabemos é que as plantas medicinais sempre serão utilizadas como fonte para antigos e novos tratamentos, seja pela a pesquisa científica como também pela população. Tanto na forma de preparações extemporâneas, quanto na forma de medicamentos fitoterápicos, as plantas medicinais representam uma valiosa fonte terapêutica tanto para populações em países em desenvolvimento, com dificuldades para acesso a outras medidas terapêuticas (Heinrich, 2010) quanto em países desenvolvidos, onde as populações buscam terapias complementares e alternativas (Jütte et al., 2017).

As plantas medicinais e os fitoterápicos podem ser escolhidos conscientemente como uma alternativa para medicina tradicional. Segundo dados do Ministério da Saúde, publicados no Portal Brasil, houve um crescimento na busca de tratamentos à base de plantas medicinais ou fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS). Em 2013, aproximadamente 6 mil pessoas procuravam farmácias ou atenção básica buscando este tipo de tratamento, já em 2015 esse número passou para cerca de 16 mil pessoas (Brasil, 2016).

A toxicologia nos ensina que toda substância pode ser considerada um veneno e que nem tudo o que é natural é seguro. Isto porque, vários fatores relacionados às condições de exposição, tais como via de administração (oral, respiratória, dérmica, parenteral), moduladores de absorção (presença de alimentos, por exemplo) e frequência de exposição (dose única ou doses repetidas), podem influenciar na toxicidade de uma substância em um determinado organismo. Assim, conhecer a segurança do uso de substâncias químicas, puras ou em misturas, através de avaliação da toxicidade é fundamental para saúde humana e ambiental (Barros e Davino, 2008).

Conhecimento terapêutico e análise farmacológica advindos de plantas medicinais, na forma de extratos ou frações, muitas vezes tem como base a etnobotânica e a etnofarmacologia. Estas duas áreas das ciências buscam entender as relações do homem com as plantas e, a última em particular, como as mesmas são usadas como recurso terapêutico (Rocha et al., 2015). Assim, da mesma forma que a partir do uso tradicional são pensados estudos para comprovação da eficiência terapêutica, faz-se imprescindível a realização de estudos de avaliação de segurança de uso dos extratos, frações e fitoterápicos preparados a partir dessas plantas. Isso porque, embora o consenso popular acredite que por provir da natureza estes produtos possam ser seguros, há possibilidade de reações adversas que tanto podem ser provocadas por substâncias químicas

sintetizadas pela planta medicinal quanto pela presença de contaminantes e/ou adulterantes nas preparações fitoterápicas (Turolla e Nascimento, 2006).

Os efeitos adversos decorrentes das plantas medicinais podem ser intrínsecos ou extrínsecos. Quando o efeito adverso ocorre em decorrência da espécie, de superdosagem ou devido a interações com outras substâncias, este é chamado efeito adverso intrínseco. Já, erros de identificação botânica da espécie em uso, contaminação (agrotóxicos, metais pesados), falta de padronização no preparo da amostra, e substituição e/ou adulteração de plantas são fatores que podem provocar os denominados efeitos adversos extrínsecos (Turolla e Nascimento, 2006; Souza, 2017). Quando se realiza a avaliação toxicológica de uma planta, seja na forma de extrato ou de frações, o objetivo é determinar a capacidade dos mesmos em produzir injúrias a um organismo, por meio da administração de forma aguda ou repetida da amostra. Essas injúrias podem ser evidenciadas através de avaliação comportamental, análise de consumo de água e ração e variações encontradas, evolução do peso corporal durante o experimento, avaliações macro e microscópicas de órgãos internos, assim como determinações bioquímicas e hematológicas. Através desses parâmetros é possível diagnosticar a influência da amostra em teste sobre órgãos específicos, como rins e fígado, além de permitir o prognóstico de possíveis efeitos tóxicos em outros organismos (Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico- OECD, 2018a).

Constata-se assim que tanto as plantas medicinais como também produtos naturais, de maneira geral, são uma rica fonte de insumos renováveis para desenvolvimento de fármacos. Toda essa gama de possibilidades de eficácia farmacológica precisa passar por uma avaliação do seu potencial tóxico, antes de adentrar na terapêutica medicamentosa de humanos e animais (Rang et al., 2016).

Sendo o levantamento sistemático a metodologia empregada neste estudo, vale ressaltar que o objetivo de uma revisão sistemática (RS) é identificar dados relevantes para uma questão de pesquisa específica, utilizando para isso um processo estruturado de várias fases, as quais buscam minimizar o viés no levantamento bibliográfico (Hooijmans et al., 2018). A RS pode ser seguida ou não de uma meta-análise. Neste último caso, utiliza-se um processo estatístico para fornecer uma estimativa resumida dos resultados de um grupo de estudo e compará-lo a outros grupos. Em medicina clínica, o uso da RS já se tornou habitual e passou a ser fundamental para a tomada de decisão clínica, como também, políticas de saúde, alicerçada na saúde baseada em evidências (Sena et al., 2014).

Os dados encontrados em experimentos com animais, desde que bem planejados, com rigor metodológico, reprodutibilidade e humanizados, podem ser usados para a transposição em ensaios clínicos, facilitando a tomada de decisão em saúde. Por exemplo, intervenções que demonstraram potencial terapêutico e segurança em ensaios pré-clínicos, evidenciadas em RS sobre o assunto em questão, podem ser utilizadas para o delineamento de ensaios clínicos. Da mesma forma, informações quanto a toxicidades ilustradas em RS podem tanto auxiliar na tomada de decisão quanto à exposição humana, como também indicar a necessidade de estudos adicionais com animais. Porém, é necessário que se tenha um nível de certeza na evidência para tomada dessas decisões de transpor para ensaios clínicos. O cenário atual revela ainda uma carência em como avaliar essas evidências (Hooijmans et al., 2018).

Tendo em vista as considerações apresentadas sobre a importância dos estudos pré-clínicos no conhecimento adquirido na pesquisa da ciência biomédica, a questão da crise de reprodutibilidade nos estudos pré-clínicos, a valia das plantas no desenvolvimento farmacêutico e os testes que evidenciam a segurança das mesmas, o propósito deste estudo foi realizar um levantamento sistemático a fim de analisar a qualidade da descrição dos métodos empregados nos estudos de toxicidade de plantas medicinais. E assim, busca-se contribuir com o conhecimento sobre a qualidade dos relatos destes testes de segurança e identificar o rigor metodológico e reprodutibilidade dos mesmos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a qualidade da descrição dos métodos experimentais de testes de toxicidade *in vivo* utilizados para avaliação de segurança de plantas medicinais analisando-os e interpretando-os qualitativamente tendo como base as diretrizes *Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments* (The ARRIVE guidelines).

2.2 Objetivos específicos

- . Realizar o levantamento sistemático nas bases científicas (SCOPUS, *Embase*, *Web of Science*, CAB DIRECT, Biblioteca Virtual em Saúde BVS) de artigos que fizeram a avaliação da toxicidade pré-clínica (aguda, subaguda, subcrônica, crônica) de plantas medicinais no ano de 2017;
- . Analisar, com base nas diretrizes ARRIVE, a qualidade da descrição da declaração ética, das características dos animais e condições de manutenção;
- . Analisar, com base nas diretrizes ARRIVE, a qualidade da descrição do desenho experimental da avaliação toxicológica;
- . Analisar a qualidade da descrição dos procedimentos experimentais e análise da avaliação toxicológica, com adaptação das diretrizes ARRIVE.

3. MÉTODOS

3.1 Identificação do estudo

Trata-se de um estudo de um levantamento sistemático, conduzido conforme a metodologia proposta por (Vries et al., 2015) com adaptações. Foi realizado um levantamento bibliográfico de artigos científicos, avaliados mediante a observação, registro, análise, classificação, e interpretação dos dados.

3.1.2 Identificação do problema

Em 2009, um levantamento sistemático foi realizado pelo Centro Nacional de Substituição, Refinamento e Redução de Animais em Pesquisa (NC3Rs), estabelecido no Reino Unido (Kilkenny et al., 2009). Este levantamento teve como objetivo analisar estudos que trabalharam com animais de laboratório (ratos, camundongos e primatas não humanos) e foram financiados pelo setor público do Reino Unido e dos Estados Unidos. O propósito foi averiguar como estes estudos estavam sendo apresentados em relação à qualidade dos relatórios, qualidade do delineamento experimental e da análise estatística. Deste levantamento, resultaram as diretrizes ARRIVE (*Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments*) (Kilkenny et al., 2010) com propósito de melhorar os relatos das pesquisas científicas que utilizam animais em seus experimentos, a fim de maximizar as informações que devem ser publicadas referentes aos animais e, assim, minimizar estudos desnecessários.

Em vista disso, este estudo surgiu a partir de questionamentos referentes ao relato de pesquisas científicas que utilizaram plantas medicinais com potencial terapêutico, e sua avaliação de segurança, abordando como tema principal “Avaliação da toxicidade *in vivo* nos estudos de plantas medicinais”. Em seguida, foi definido o questionamento de pesquisa, sendo “Como estão sendo reportados os métodos *in vivo* de avaliação de toxicidade de plantas medicinais à luz das diretrizes ARRIVE?”.

Isto posto, aplicou-se então a pergunta de pesquisa estruturada, através do acrônimo PO (P: corresponde a população ou participante; O: “*outcome*” ou desfecho/resultado desejado), para o estabelecimento dos descritores (Tabela 1).

Tabela 1 - Aplicação da Pergunta estruturada (PICO) ao questionamento da pesquisa* e Descritores em Ciência da Saúde sugeridos.

Item**	Componente
P	Artigos que trabalharam com Avaliação toxicidade <i>in vivo</i> Plantas medicinais
O	Qualidade da descrição: Tema 1- Declaração ética, características dos animais e condições de manutenção; Tema 2- Desenho experimental da avaliação toxicológica; Tema 3- Procedimentos experimentais da avaliação toxicológica.

* Questionamento do trabalho: “Como estão sendo reportados os métodos *in vivo* de avaliação de toxicidade de plantas medicinais à luz das diretrizes ARRIVE? ”. **Itens = P: corresponde a população ou participante; O: “*outcome*” ou desfecho/resultado desejado. #ARRIVE: *Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments*.

3.1.3 Bases de dados e estratégia de busca:

Para identificação dos artigos referente ao assunto proposto, realizou-se a busca nas bases de dados Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), *Web of Science*, SCOPUS, *CAB DIRECT*, *Embase*, no período de outubro a novembro de 2018. Esta etapa foi realizada com a supervisão da bibliotecária Patrícia de Paula Ravaschio, da biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

Inicialmente, para a definição da terminologia e estratégia de busca foi realizada a consulta ao vocabulário estruturado e Descritores em Ciência da Saúde (DeCS) e ao vocabulário médico Medical Subject Headings (MeSH) para a correta grafia dos descritores (Tabela 2), escolhidos em função da pergunta estruturada (Tabela 1).

Tabela 2 - Descritores utilizados para o levantamento bibliográfico, segundo o vocabulário estruturado e Descritores em Ciência da Saúde (DeCS) e ao vocabulário médico Medical Subject Headings (MeSH)

MeSH	DeCS
Plants, Medicinal	Plantas Medicinais
Plant Extracts	Extratos Vegetais
Toxicity Tests, Subacute	Testes de Toxicidade Subaguda
Toxicity Tests, Subchronic	Testes de Toxicidade Subcrônica
Toxicity Tests, Chronic	Testes de Toxicidade Crônica
Toxicity Tests, Acute	Testes de Toxicidade Aguda

De maneira geral, a estratégia de busca seguiu a seguinte sequência:

- 1) Busca bibliográfica individual de cada termo descrito na Tabela 2, na seguinte ordem:
 1. Plantas medicinais e sinônimos;
 2. Extratos vegetais e sinônimos;
 3. Testes de toxicidade subaguda e sinônimos;
 4. Testes de toxicidade subcrônica e sinônimos,
 5. Testes de toxicidade crônica e sinônimos;
 6. Testes de toxicidade aguda e sinônimos.
- 2) Combinações das buscas individuais na seguinte ordem:
 - 1) Plantas medicinais e sinônimos OU Extratos vegetais e sinônimos;
 - 2) Testes de Toxicidade Subaguda e sinônimos OU Testes de Toxicidade Subcrônica e sinônimos OU Testes de Toxicidade Crônica e sinônimos OU Testes de Toxicidade Aguda e sinônimos.
- 3) Combinação final para definição da estratégia de busca:
 - Plantas medicinais e sinônimos OU Extratos vegetais e sinônimos; Testes de Toxicidade Subaguda e sinônimos OU Testes de Toxicidade Subcrônica e sinônimos OU Testes de Toxicidade Crônica e sinônimos OU Testes de Toxicidade Aguda e sinônimos.

Esta estratégia geral foi aplicada e adaptada para cada uma das bases de dados pesquisada (BVS, *Web of Science*, SCOPUS, *CAB DIRECT*, *Embase*), levando-se em conta as particularidades de cada uma delas. No Apêndice 1, encontram-se todas as estratégias de busca utilizadas em função da base de dado utilizada.

3.1.4 Identificação de outras fontes de estudo

Além dos artigos pesquisados na base de dados, conforme a estratégia descrita no item 3.1.3, foram consultados livros, diretrizes, manuais e artigos de revisão envolvendo os assuntos avaliação toxicológica de plantas medicinais, testes de avaliação de toxicidade, bem-estar animal, enriquecimento ambiental, reprodutibilidade na pesquisa e as diretrizes da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico- (*Organisation for Economic Co-operation and*

Development OECD). Estas fontes secundárias foram utilizadas para ampliar o conhecimento sobre o objeto do estudo e foram utilizadas, como ferramenta auxiliar, na discussão dos resultados.

3.1.5 Seleção dos estudos

Nesta etapa, foi realizada a seleção dos artigos em três fases:

- Na primeira fase, foi realizada a leitura crítica dos títulos e dos resumos dos artigos, sendo que os descritores selecionados deveriam aparecer em pelo menos um deles (título e/ou resumo); esta etapa foi realizada por dois observadores de maneira independente (ALO e ALTGR);
- Na segunda fase, verificou-se se os artigos selecionados estavam disponíveis na íntegra para leitura; esta etapa foi realizada por um observador (ALO);
- Na última fase, foi realizada a seleção dos artigos disponíveis na íntegra com base nos critérios de inclusão e exclusão; esta fase também foi realizada por dois observadores (ALO e ALTGR).

Para realização destas etapas foram utilizadas algumas ferramentas *open access* para gerenciamento bibliográfico. Assim, todos os artigos selecionados conforme item 3.1.3 foram transferidos para a ferramenta *EndNoteWeb* para a primeira etapa de seleção. Para a segunda etapa, verificou-se a disponibilidade via *EndNoteWeb* e quando esse acesso não estava disponível foi utilizada a plataforma *Google* para confirmar o acesso integral ao texto. Finalmente, a terceira etapa de seleção (aplicação dos critérios de inclusão e de exclusão) foi realizada com auxílio da ferramenta *Mendeley*.

3.1.7-Definição dos critérios de inclusão e exclusão

Tipos de estudo: Artigos publicados ou *in press* descrevendo estudos com extrato ou fração obtidos a partir de plantas medicinais.

Tipos de animais: animais de laboratório mamíferos convencionais, ou seja, rato, camundongo, coelho e cachorro, de ambos os sexos e qualquer idade. A escolha dessas espécies seguiu os resultados descritos por que Fagundes e Taho (2004), após amplo levantamento

bibliográfico, evidenciou que as espécies animais mais citadas em estudos farmacológicos foram ratos (primeiro lugar) seguido de camundongos, coelhos e cães.

Tipos de intervenção: testes de avaliação de toxicidade *in vivo*, classificados como toxicidade aguda, subaguda, subcrônica e crônica, com via de administração oral e/ou intraperitoneal.

Restrições de idioma: Artigos escritos em Inglês ou Português.

Data de publicação: Ano de 2017.

Tipo de acesso: acesso ao texto na íntegra.

Nacionalidade: Qualquer nacionalidade.

Consequentemente, foram considerados como critérios de exclusão:

- Artigos que trabalharam com outros animais que não os citados no critério de inclusão; métodos *ex-vivo*, *in silico* e/ou *in vitro* de avaliação de toxicidade; vias de administração que não via oral ou intraperitoneal; estudos de embrio/fetotoxicidade; estudos de toxicidade com substâncias isoladas de plantas medicinais; demais idiomas que não inglês e português; ano de publicação inferior ou superior a 2017; artigos com acesso restrito ao texto na íntegra.

3.2 Características do estudo a serem extraídas

Para medidas dos resultados foram utilizadas as The ARRIVE guideline (Kilkenny et al., 2010).

Com base nestas diretrizes, foram estipulados 3 temas para análise da descrição dos métodos experimentais empregados na avaliação de toxicidade de plantas medicinais, a saber:

- Animais, condições de manutenção e declaração ética.
- Desenho experimental da avaliação toxicológica;
- Procedimentos experimentais e análise da avaliação toxicológica.

3.2.1 Identificação dos estudos

Os estudos foram identificados por autor, coautoria, título, palavras-chaves/descriptores e resumo.

3.2.2 Perguntas de avaliação e método de coleta de dados

Uma vez escolhidos os três temas a serem estudados, foram elaborados os critérios de avaliação dos métodos empregados na avaliação da toxicidade *in vivo*. Assim, foram geradas as seguintes perguntas qualitativas com base nas diretrizes ARRIVE e adaptadas aos estudos de toxicidade.

Tema 1: Animais, condições de manutenção e declaração ética:

Identificação dos Animais:

- Os animais foram descritos quanto a espécie, linhagem, sexo, idade (média ou mediana e variação) e peso (média ou mediana e variação)?

Condições de manutenção dos animais:

- Os animais foram ambientados em relação ao tipo de gaiola?
- Foram descritos tipo e frequência de alimentação, ciclos de luz e escuro, temperatura, qualidade e acesso de água?
- Foi realizado enriquecimento ambiental?

Declaração ética:

- O estudo foi aprovado por Conselho/Comitê de Ética na instituição de origem?

Tema 2: Desenho experimental da avaliação toxicológica:

Plano de estudo (incluindo o desenho do estudo, randomização e cegamento),

- Descreve o número de grupo experimentais?
- Descreve o uso de grupo de animais controle?
- Descreve processo de randomização na distribuição dos animais nos grupos experimentais?
- Foi realizado cegamento?

Tamanho da amostra:

- Descreve o número total de animais usados em cada experimento?
- Descreve o número de animais em cada grupo experimental?

- A definição do número de animais por grupo experimental foi feita com base em cálculo estatístico?

Tema 3: Procedimentos experimentais e análise da avaliação toxicológica:

Métodos de avaliação da toxicidade

- Qual avaliação foi realizada (aguda, subaguda, subcrônica e crônica)?
- Qual o tempo de tratamento dos animais?

A amostra:

- A preparação da amostra foi descrita quanto a doses e formulações utilizadas?
- Foram descritos a via de administração e a frequência de tratamento?

Sinais clínicos, avaliação de peso e consumo de água e ração:

- Foram descritos quais sinais e sintomas clínicos seriam observados em cada animal para evidenciar a toxicidade?
- Foram descritas a ordem usada para tratar e observar cada animal?
- Foi descrita a avaliação/frequência de peso corporal ao longo do experimento?
- Foi descrita avaliação de consumo de água e de ração ao longo do experimento?

Manuseio experimental dos animais:

- Foi realizada coleta de sangue?
- Os animais foram anestesiados para coleta de sangue?
- A amostra de sangue foi usada para qual avaliação?
- Os animais foram anestesiados para eutanásia?
- Foi realizada coleta de órgãos?
- A amostra de órgão foi usada para qual avaliação?

Estas perguntas serviram como base para elaboração do *Checklist* de avaliação (Apêndice 2) e todos os dados (respostas) obtidos foram organizados e tabulados com auxílio do software Excel. Assim, os dados encontrados foram avaliados em função dos três temas (declaração ética, características dos animais e condições de manutenção; desenho experimental; procedimentos experimentais da avaliação toxicológica) considerando-se a análise geral com todos os métodos, adicionado a análise de cada um dos quatro métodos individualmente (toxicidade aguda, subaguda, subcrônica e crônica) para cada tema.

3.3 Avaliação de risco de viés e qualidade do estudo

As discrepâncias de seleção foram resolvidas através da leitura individual do título/resumo (fase um) e artigo completo (fase três) seguida de discussão entre os dois observadores (ALO e ALTGR). Na etapa de avaliação/extração, um revisor (ALO) avaliou os critérios de avaliação de forma independente e as discrepâncias foram resolvidas por discussão entre os dois observadores (ALO e ALTGR).

3.4 Análise de dados

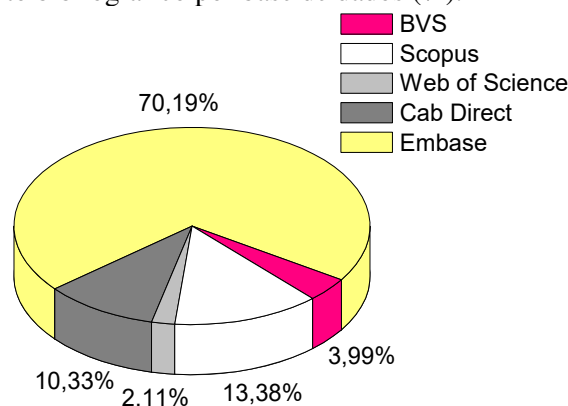
A partir das respostas sintetizadas em planilhas do software Excel, foram geradas Tabelas e Figuras representativas dos resultados obtidos. A ausência de itens apresentados no *Cheklis*t (Apêndice 2) para os 3 temas selecionados foi então discutida com base na importância e impacto de cada item sobre o teste em estudo, empregando-se nesse momento a literatura auxiliar descrita no item 3.1.4.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da busca, seleção dos artigos e características dos estudos

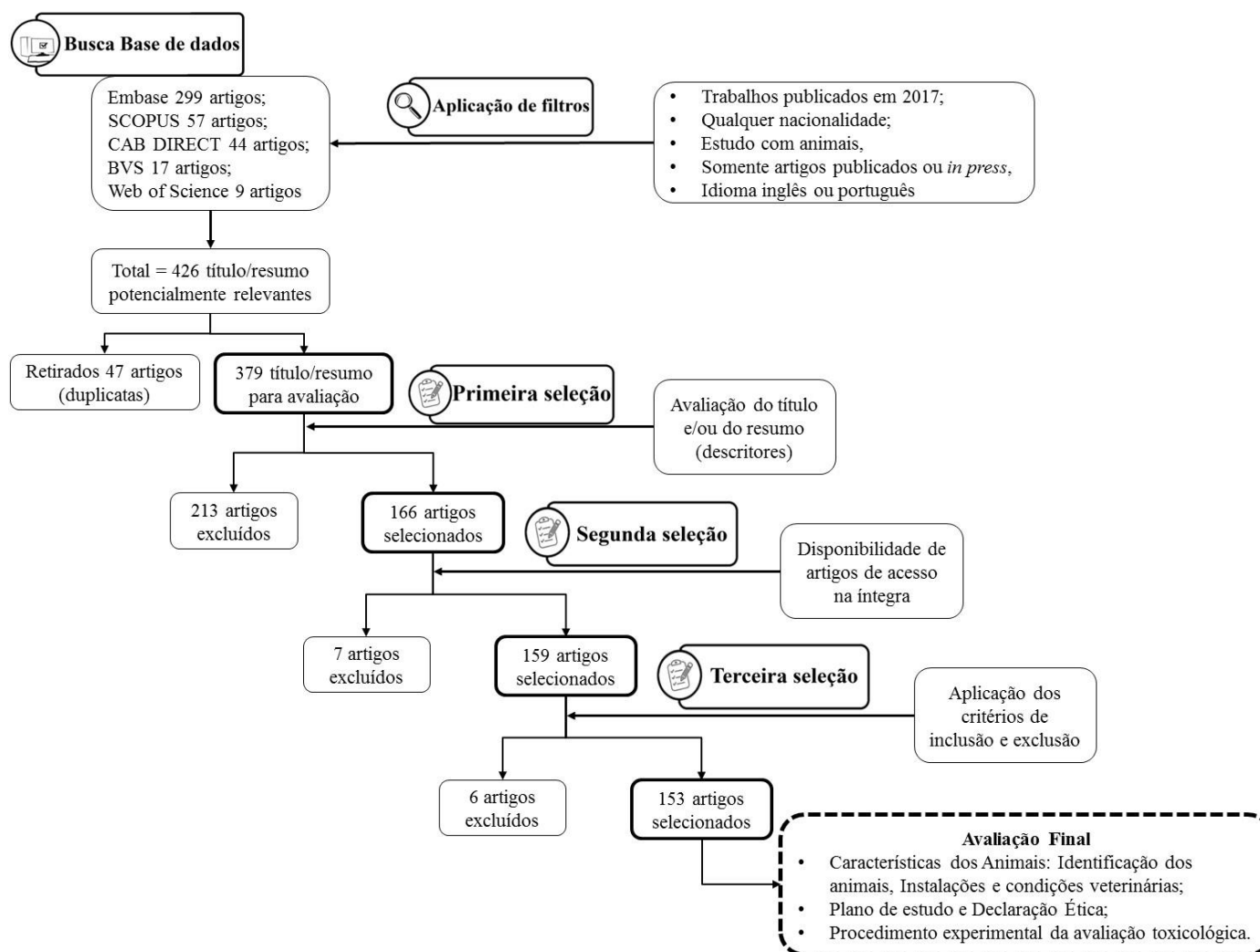
O propósito do presente estudo, que parte de um levantamento sistemático, foi avaliar como estão sendo descritas as informações no item Material e Métodos dos artigos que realizaram testes de segurança de plantas medicinais, na forma de extratos e/ou frações. A partir da elaboração e aplicação das combinações de descritores, estratégia de busca e os filtros, foram encontrados 299 artigos na base EMBASE, 57 artigos na base SCOPUS, 44 artigos na base *CAB DIRECT*, 17 artigos na base de dados Biblioteca Virtual de Saúde (BVS) e apenas 9 artigos na base *Web of Science*, totalizando 426 artigos (Figura 1).

Figura 1- Resultados do levantamento bibliográfico por base de dados (%).



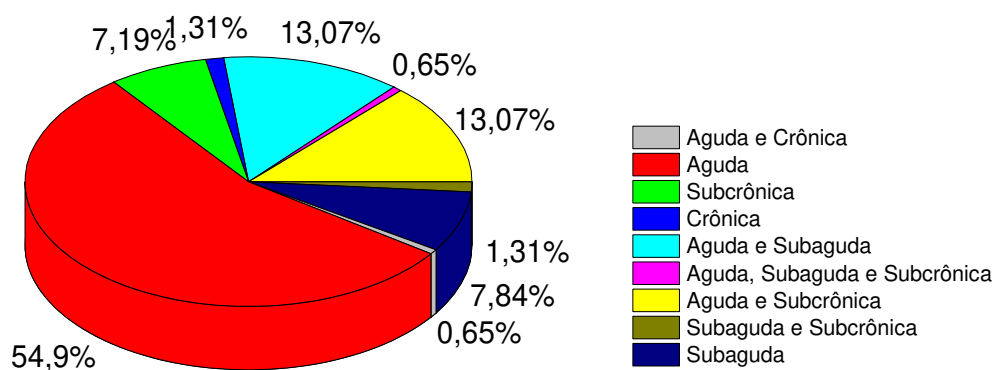
Do total de artigos encontrados, foram retiradas 47 duplicatas resultando em 379 artigos. Após a primeira seleção (avaliação de título e resumo), 213 artigos excluídos e 166 artigos foram submetidos à segunda fase de seleção (verificação da disponibilidade de acesso na íntegra) resultando na exclusão de 7 artigos. Finalmente, na terceira fase de seleção, os critérios de inclusão e de exclusão foram aplicados a 159 artigos levando a seleção para leitura na íntegra de 153 artigos (Figura 2).

Figura 2 - Diagrama das fases de busca e seleção do levantamento bibliográfico



Após a terceira fase de seleção, os 153 artigos foram agrupados de acordo com tipo de métodos de avaliação de toxicidade empregado, a saber, os métodos de toxicidade aguda, subaguda, subcrônica e crônica. À medida que, os métodos de toxicidade foram sendo encontrados, observou-se que a maioria dos estudos aplicaram apenas um tipo de métodos de avaliação de toxicidade enquanto outros realizaram diferentes combinações desses métodos, o que permitiu agrupá-los e evidenciar como esses métodos foram realizados (Figura 3, Apêndice 3).

Figura 3- Quantidade de artigos (%) encontrados em função do tipo de métodos de avaliação de toxicidade, individual ou combinado.

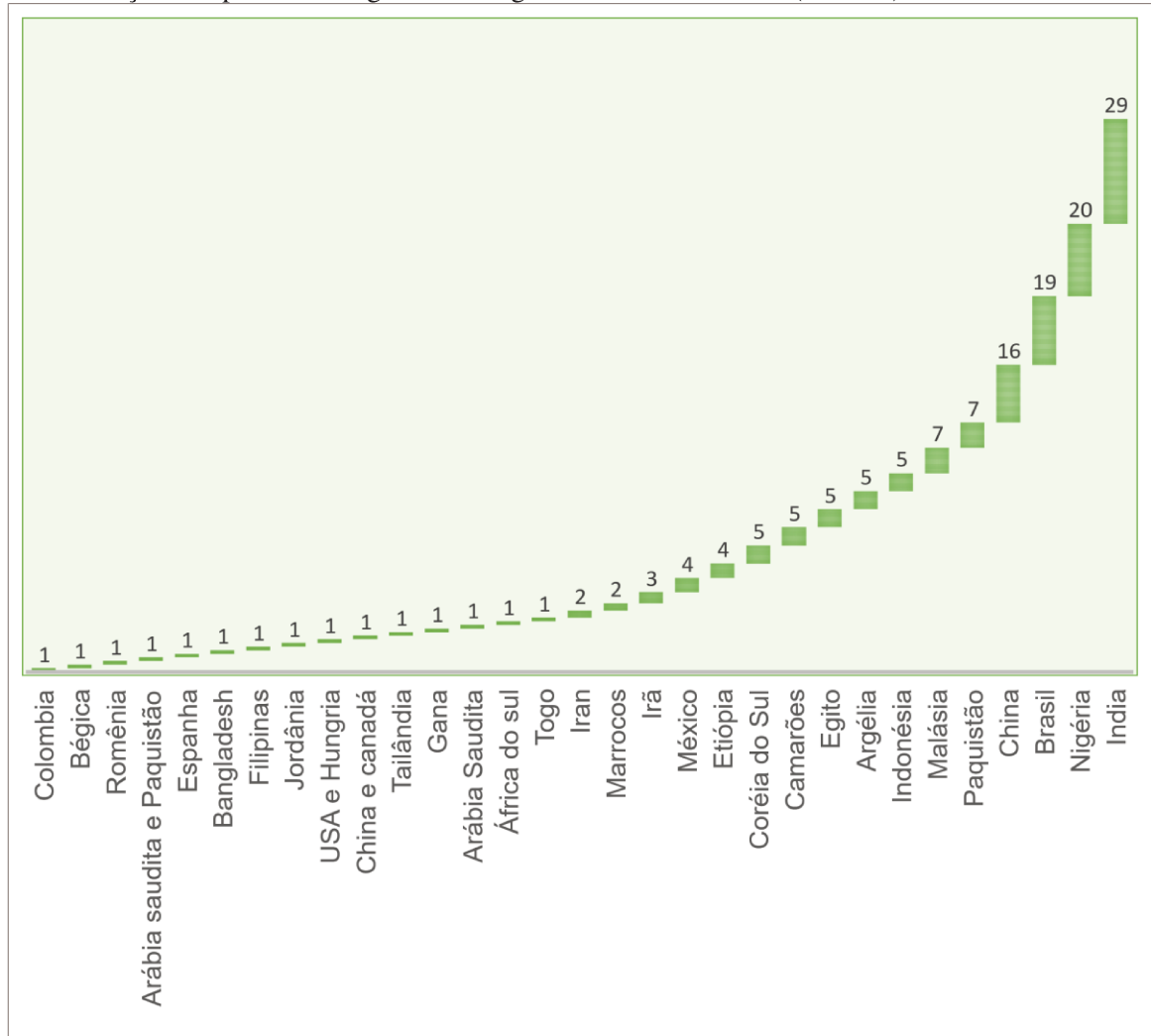


O teste de toxicidade aguda foi o método de segurança mais encontrado, tanto nos artigos que utilizaram apenas um método para avaliar a toxicidade (84 artigos, como nos artigos que utilizaram métodos combinados (44 artigos), totalizando 126 artigos. Já o método de toxicidade subaguda foi utilizado individualmente por 12 artigos e de forma combinada em outros 23 artigos, num total de 35 trabalhos. Por sua vez, o modelo de toxicidade subcrônica foi descrito individualmente em 11 artigos e em combinação em mais 23 artigos, totalizando 34 trabalhos. Finalmente, o método menos reportado foi o de toxicidade crônica, que foi descrito individualmente em 2 artigos e em combinação em mais 1 trabalho resultando um total de 3 artigos (Figura 3, Apêndice 3).

Notamos que a avaliação da toxicidade aguda foi encontrada na amostra desta pesquisa seja como um teste complementar em artigos cujo objetivo principal era a comprovação de eficiência farmacológica e terapêutica da planta medicinal em estudo, seja como o método inicial de estudo de segurança associado a método de avaliação de toxicidade de doses repetidas de um extrato, ou fração, preparado a partir da planta em estudo.

Com relação à nacionalidade dos autores, evidenciamos que dos 153 estudos incluídos os países com maior representação foram a Índia com 29 artigos, seguida de Nigéria (20 artigos), Brasil (19 artigos) e China (16 artigos) (Figura 4).

Figura 4- Relação dos países de origem dos artigos incluídos no estudo (n = 153).



Quando considerados por métodos de toxicidade utilizados individualmente, Índia (18 artigos), seguido de Brasil e Nigéria ambos com 12 artigos, e o Paquistão com 7 artigos foram os países com maior representatividade quanto aos métodos de toxicidade aguda (Figura 5). Enquanto Nigéria e Coreia do Sul, com 2 artigos cada país foram os países com maior representação quanto aos métodos de toxicidade subaguda (Figura 6), e a China (5 artigos) foi o país com maior representatividade na toxicidade subcrônica (Figura 7). Finalmente, apenas 2 artigos reportaram o

uso do método de toxicidade crônica, sendo um de pesquisadores da Malásia e outro de pesquisadores da China.

Figura 5 – Relação dos Países de origem dos artigos que realizaram apenas o métodos de Toxicidade Aguda (n = 84).

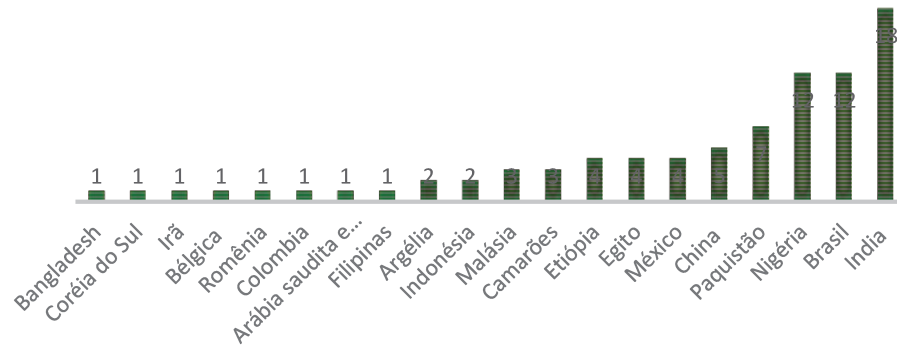


Figura 6 – Relação de Países de origem dos artigos que realizaram apenas o métodos de Toxicidade Subaguda (n=12)

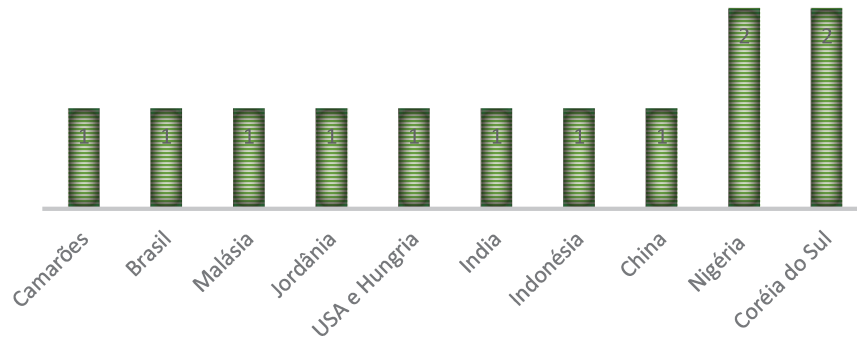
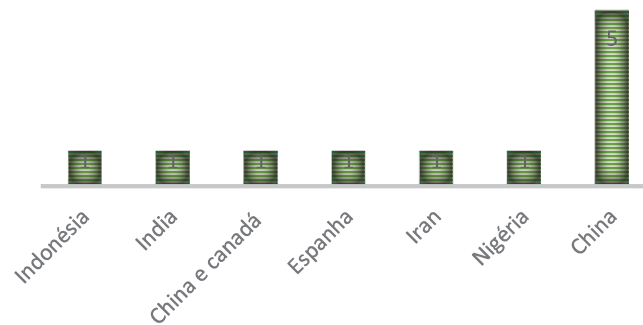


Figura 7- Relação de Países de origem dos artigos que realizaram apenas o métodos de Toxicidade Subcrônica (n=11)



Quando consideramos os estudos que realizaram combinações de método experimentais, Índia (4 artigos), Brasil e Argélia (3 artigos cada) tiveram maior representação dentre os estudos com combinação dos métodos de toxicidade aguda e subaguda (20 artigos). Já a combinação de método de toxicidade aguda e subcrônica (n = 20) foi descrita em 4 artigos de pesquisadores da Índia, seguido por trabalhos desenvolvidos no Brasil e China (3 artigos cada). Além dessas, foi encontrada 1 combinação de método de toxicidade aguda, subaguda e subcrônica realizado por pesquisadores da Malásia, 1 estudo de pesquisadores da Índia combinando os métodos de toxicidade aguda e crônica, e finalmente, 2 artigos (1 da China e 1 da Coreia do Sul) que utilizaram a combinação de método de toxicidade subaguda e subcrônica (Tabela 3).

Tabela 3-Nacionalidade dos artigos que fizeram uso da combinação de métodos de avaliação da toxicidade.

Métodos Experimental	Países	Total de Artigos
Toxicidade Aguda e Subaguda (n=20)	Nigéria	1
	Marrocos	1
	Tailândia	2
	Argélia	3
	Brasil	3
	Índia	4
Toxicidade Aguda e Subcrônica (n=20)	Malásia	1
	Marrocos	1
	Egito	1
	Camarões	1
	Coreia do Sul	1
	Irã	1
	Brasil	3
	China	3
	Índia	4
Toxicidade Aguda, Subaguda e Subcrônica (n=1)	Malásia	1
Toxicidade Aguda e Crônica (n=1)	Índia	1
Toxicidade Subaguda e Subcrônica (n=2)	China	1
	Coreia do Sul	1

A partir desses dados levantados, quanto aos tipos de método de toxicidade encontrados, apenas um ou combinado com outros métodos, a seguir começamos a análise propriamente dita da redação da parte experimental dos artigos selecionados.

Considerando-se que o relato transparente de informações básicas, tanto dos métodos quanto dos resultados, é o que permite analisar e repetir os mesmos (Kilkenny et al., 2010) e as diretrizes ARRIVE, propusemos para este projeto uma adaptação dos itens descritos na sessão

denominada “Métodos” (nas diretrizes compreendem os itens 5 a 13) em três grandes temas (1) declaração ética, animais e condições de manutenção; (2) desenho experimental da avaliação toxicológica, (3) procedimentos experimentais e análise da avaliação toxicológica a fim de facilitar a análise e discussão dos métodos de toxicidade descritos pelos 153 artigos selecionados.

O primeiro tema, animais, condições de manutenção e declaração ética, teve como propósito analisar a descrição das informações básicas de identificação dos animais utilizados nos métodos de toxicidade (sexo, linhagem, idade e peso). Posteriormente analisamos a descrição das condições de manutenção dos animais, com intuito de verificar se itens básicos, padronizados, de instalações de biotérios, que evidenciam informações quanto saúde e bem-estar dos animais empregados nos testes, estavam sendo descritos. Considerando que este tema era independentemente do método experimental empregado, consideramos avaliá-lo como foram descritas na amostra total, de 153 artigos, sem separá-los por métodos experimentais.

Já o segundo tema analisado, aqui chamado de desenho experimental da avaliação toxicológica, teve como propósito verificar se itens relacionados ao planejamento experimental, como plano de estudo e número da amostra, estavam sendo descritos na análise da toxicidade das plantas medicinais. Assim, a partir das diretrizes ARRIVE, incluímos na análise deste tema os itens o plano de estudo, englobando desenho do estudo, atribuição dos animais aos grupos experimentais, descrição do processo de randomização e cegamento das análises realizadas, e a descrição do número de animais.

Por sua vez, no terceiro tema analisado, denominado procedimentos experimentais e análise da avaliação toxicológica, analisamos o método de toxicidade propriamente dito quanto a descrição da amostra e da via de administração e a descrição de parâmetros utilizados para análise de toxicidade.

Assim, para os temas 2 (desenho experimental da avaliação toxicológica) e 3 (procedimentos experimentais e análise da avaliação toxicológica) já que diversos artigos trabalharam com métodos de avaliação de toxicidade individual ou em combinações, um mesmo artigo rendeu para extração de dados mais de um método de toxicidade, totalizando 198 métodos de toxicidade.

Para esses dois temas foi possível agrupar os métodos em toxicidade aguda ($n = 126$ métodos avaliados), toxicidade subaguda ($n = 35$ métodos avaliados), toxicidade subcrônica ($n = 34$ métodos avaliados) e toxicidade crônica ($n = 3$ métodos avaliados).

4.3 Análise da descrição dos métodos experimentais empregados na avaliação toxicológica

4.3.1 Tema 1 - Declaração ética, animais e condições de manutenção dos animais

Considerando-se a amostra de 153 artigos, a maioria (81,7%) descreveu a aprovação prévia por um comitê de ética, sendo que alguns trabalhos ($n = 13$) relataram ao invés da declaração ética uma referência a respeito de cuidado e manejo dos animais. Analisamos também se foi descrito o número da declaração aprovada pelo comitê de ética reportado e encontramos que 52,3% dos artigos não apresentaram esse número (Tabela 4).

Tabela 4- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto a declaração ética e apresentação do número de métodos de aprovação ($n = 153$).

	Descreve aprovação no comitê de ética			Apresenta o número do métodos de aprovação	
	Sim	Não	Publicação	Sim	Não
Total	125	15	13	73	80

Questionamento empregado: O estudo foi aprovado por Conselhos/Comitê de Ética na instituição de origem?

Considerando-se as nacionalidades dos pesquisadores (Figura 4), analisamos os artigos dos quatro países que mais reportaram estudos de toxicidade quanto à apresentação de declaração ética (Tabela 5). Considerando os artigos sobre a toxicidade de plantas medicinais escritos por pesquisadores da Índia (29 artigos), verificamos que 79,3% descreveram a aprovação de comitê de ética, apesar de apenas 58,6% apresentarem o número de aprovação. Em relação ao segundo país mais encontrado, Nigéria (20 artigos), verificamos que 70% relataram aprovação prévia por comitê de ética, porém apenas 15% apresentaram o número de aprovação. Com relação ao Brasil, terceiro país mais encontrado (19 artigos), 94,7% dos estudos descreveram tanto aprovação quanto apresentaram o número do certificado. Finalmente quanto à China, quarto país que mais apresentou trabalhos (16 artigos), verificamos que 87,5% apresentaram aprovação no comitê de ética, porém apenas 25% apresentaram o número de aprovação.

O comitê de ética em pesquisa é um espaço multidisciplinar no qual os membros podem pesquisar, ensinar, prestar consultorias ou propor normas institucionais no que se refere aos aspectos da experimentação (Feijó, 2009). De maneira mais restrita, o Comitê de Ética para Uso de Animais deve aconselhar, prognosticar, examinar e revisar protocolo de investigação científica

e utilização de animais na docência, visando questões específicas sobre a necessidade da utilização e o bem-estar do animal durante todo seu tempo de vida, tendo como base a legislação vigente no país. No Brasil, a experimentação animal é regida pela Lei 11.794/08, a partir da qual o bem-estar animal passou a ser entendido não apenas como questão ética e humanitária, mas também como questão legal (Campos et al., 2015).

Tabela 5- Frequência de relato (em números absolutos e %) da descrição quanto a declaração ética e apresentação do número de métodos de aprovação dos países mais encontrados na análise geral

Países	Descreve aprovação no comitê de ética			Apresenta o número do métodos de aprovação	
	% Sim Não		Publicação	% Sim Não	
Índia (n =29)	79,3	20,7	0	58,6	41,4
Nigéria (n=20)	70,0	5	25	15	85
Brasil (n=19)	94,7	0	5,3	94,7	5,3
China (n=16)	87,5	6,3	6,3	25	75

Assim, a descrição completa da declaração ética (indicação do respectivo Comitê e apresentação do número do protocolo aprovado) demonstra que o estudo realizado envolveu experimentos escolhidos a luz da ética, adequados a necessidade do estudo proposto e desenvolvidos de modo a garantir o bem-estar animal.

Portanto, pode-se o relato da declaração ética em artigos científicos reflete a preocupação com aspectos éticos da pesquisa tanto do pesquisador quanto da instituição da qual o pesquisador faz parte. Além disso, periódicos que valorizem ações quanto a ética na experimentação animal e tenham em suas instruções aos autores a exigência quanto a declaração ética estimulam o desenvolvimento de experimentos cada vez mais refinados e norteados pelos aspectos éticos. Vale ressaltar que não apenas quanto a declaração ética de aprovação deveriam ser exigidos pelos periódicos, mas tudo o que diz respeito a experimentação, tais como informações adequadas sobre os animais de laboratório, suas condições de manutenção e instalação, e o planejamento dos experimentos. Só assim é possível a descrição correta dos relatos, de tal forma, que os experimentos possam ser repetidos por outros pesquisadores (Alfaro, 2005).

Um levantamento bibliográfico sobre a qualidade de escrita de estudos animais publicados nos anos logo após a publicação das diretrizes ARRIVE (entre 2010 e 2012) apontou que poucos periódicos (11%) exigiam a apresentação de comprovante de aprovação por comitê de

ética (Silla et al., 2010) o que poderia explicar o baixo índice de descrição da declaração ética (1,7%) encontrado por Liu et al. (2016) em um levantamento de estudos pré-clínicos de avaliação de atividade anticâncer em animais de laboratório durante igual período. Por outro lado, estudos prospectivos que levaram em conta outros modelos experimentais publicados alguns anos após a publicação das diretrizes ARRIVE encontraram de 80 (Nam et al., 2018) a 90,06% (Gupta, 2019) dos artigos analisados apresentavam descrição de aprovação em comitê de ética. Desta forma, quanto ao quesito “declaração de ética”, o cenário parece indicar que as diretrizes ARRIVE melhoraram o relato deste ponto e os nossos resultados corroboram essa indicação.

Em nosso levantamento bibliográfico complementar, encontramos um estudo interessante sobre a descrição de estudos de intervenção assistida por animais, que são aqueles procedimentos nos quais os animais são incluídos como parte da estratégia terapêutica, como por exemplo a visita de cães a crianças internadas. No estudo feito por Zenithson et al. (2018), sobre a clareza de descrição de artigos sobre esse tema, os autores encontraram que apesar de 7.81 a 13.30% (dependendo da base de dados analisada) do total de artigos analisados terem sido aprovados por comitê de ética para uso de animais, de 46.88 a 76% foram aprovados por um comitê de ética em pesquisa clínica.

Seguindo em nossa análise, segundo item analisado dentro do tema 1 refere-se à descrição das características dos animais. Por descrição das características dos animais, pudemos verificar que a maioria dos artigos descreveram informações quanto a sexo (89,5%), linhagem (89,5%) e peso inicial (81%). Entretanto, a maioria dos relatos (63,4%) omitiu a idade dos animais utilizados nos testes de toxicidade (Tabela 6).

Tabela 6 - Frequência de relato (em números absolutos) da descrição dos animais quanto ao sexo, linhagem, idade e peso nos artigos avaliados (n = 153 artigos).

Descrição Item	Total	
	Sim	Não
Sexo	137	16
Linhagem	137	16
Idade	56	97
Peso	124	29

Questionamento empregado: Os animais foram descritos quanto a espécie, linhagem, sexo, idade (média ou mediana e variação) e peso (média ou mediana e variação)?

Novamente considerando a bibliografia auxiliar, levantamentos sistemáticos sobre diferentes modelos experimentais publicados antes e depois da publicação das diretrizes ARRIVE

não parecem sugerir um impacto das diretrizes na descrição deste quesito ou em pelo menos alguns dos subitens envolvidos. Assim, um estudo publicado em 2009 avaliando 271 estudos encontrou que a maioria descrevia a espécie/linhagem (99%) e sexo (74%) enquanto menos da metade dos manuscritos trazia informações a respeito da idade (43%) e do peso dos animais (46%) e 24% não relataram nenhum deles (Kilkenny et al., 2009). Por outro lado, um estudo publicado em 2016 analisando estudos reportados entre 2010 e 2012 encontrou que 96,72% (383 artigos) descreveram no geral as características de identificação dos animais (Liu et al., 2016). Já levantamentos mais recentes encontraram que enquanto espécie, linhagem, sexo e idade são relatados pela maioria dos artigos, o descritor peso é muitas vezes esquecido (Nam et al., 2018; Gupta, 2019).

Em nosso levantamento verificamos que camundongos e ratos foram as espécies mais empregadas nos métodos de toxicidade, variando conforme o método. Desta forma, no método de toxicidade aguda os camundongos foram a espécie mais encontrada, no qual 78 métodos utilizaram essa espécie, enquanto os ratos foram os animais utilizados em 51 métodos. Já nos métodos de toxicidade subaguda e subcrônica os ratos foram a espécie mais encontrada. Assim, nos métodos de toxicidade subaguda 22 utilizaram ratos e 10 métodos utilizaram camundongos, como também 1 métodos utilizou cachorros, e 1 métodos utilizou coelhos. Já para os métodos de toxicidade subcrônica verificamos que 27 métodos utilizaram ratos e 7 métodos utilizaram camundongos, além de 1 métodos utilizar cachorro na avaliação de toxicidade. Por fim, os camundongos foram utilizados em dois métodos de toxicidade crônica e 1 métodos utilizou ratos como animal experimental. Tanto para os métodos de toxicidade aguda como toxicidade subcrônica, verificamos que em algumas avaliações foram utilizadas duas espécies (Apêndice 4)

O relato de dados referentes a idade e sexo, além da descrição correta da linhagem, dos animais permitem a extrapolação dos resultados obtidos no modelo usado para a porção mais bem representada da população humana pelo modelo animal. Isto porque para produzir uma boa correlação entre os resultados pré-clínicos e o delineamento da pesquisa clínica, é preciso considerar as longevidades do animal e do ser humano, comparando a fase de vida do animal (expressa em dias ou meses) com a correspondente idade em anos do ser humano (Andreollo et al., 2012).

Além disso, a repetição de um experimento feito com animais adultos jovens pode levar a resultados diferentes daqueles obtidos com o mesmo método experimental aplicado a animais idosos ou pré-púberes, influenciando na reprodutibilidade da análise. Isto porque há diferenças

fisiológicas relevantes entre animais jovens e idosos em comparação aos animais de meia-idade que resultarão em interferências em estudos que investigam a mecanismos das doenças e mecanismos de ação, eficácia e toxicidade de substâncias. Mais ainda, escolher inconscientemente a idade os animais nos experimentos podem impactar a qualidade dos dados, podendo aumentar a variabilidade dos resultados e consequentemente reduzir a relevância nos estudos clínicos (Jackson et al., 2017).

Considerando-se apenas os roedores, que são as espécies mais empregadas nos estudos pré-clínicos, a faixa etária mais comumente utilizada é de 8 a 12 semanas (Jackson et al., 2017). Os camundongos são considerados adultos jovens com 6 semanas de idade enquanto os ratos são considerados adultos jovens com 8 semanas de idade (Brasil, 2008; Neve et al., 2013). Neste período, estes animais ainda estão passando por inúmeros processos fisiológicos do desenvolvimento como alterações no sistema imunológico (Velardi e Cooper, 1984) e alterações no sistema nervoso central (Bandeira et al., 2009; Fu et al., 2013). Assim, é necessário que o pesquisador se atente a essas mudanças para o planejamento, e posterior relate a idade para que os mesmos dados sejam considerados por pesquisas semelhantes.

Alguns dados interessantes foram descritos por um estudo recente feito por Jackson et al. (2017), envolvendo pesquisadores (297 entrevistados) dos setores acadêmico (80%) e industrial farmacêutico (18%), do Reino Unido e de outras localidades, a respeito da idade dos roedores usados em modelos de doenças e fisiologia humana. Este estudo evidenciou que o termo “adulto” para desenhos a idade do roedor poderia corresponder a faixa etária de 6 a 20 semanas para camundongo e de 8 a 16 semanas para ratos, evidenciando a imprecisão e ambiguidade do termo “adulto”. Foi possível verificar também que diferentes pesquisadores em diferentes laboratórios utilizaram diferentes idades de animais no mesmo paradigma experimental. Dentre as razões apontadas para justificar a escolha da idade dos animais, entre os entrevistados acadêmicos o fator o custo dos animais foi o que mais afetou a escolha da idade enquanto entre os entrevistados do setor farmacêutico o fator mais influente na escolha da idade foi a comparabilidade dos dados históricos.

Depois da descrição dos animais, analisamos alguns itens referentes às instalações veterinárias. Assim, verificamos que a aclimação ao biotério foi descrita por metade dos artigos analisados (50,3%, 77 artigos). Um dado complementar sobre aclimação encontrado em 2% dos artigos e que não havíamos previsto em nosso *checklist* de avaliação, foi a aclimação dos animais

as condições laboratoriais antes da avaliação da toxicidade; ou seja, após serem retirados da sala de manutenção, os animais foram mantidos por um período de tempo (algumas horas) no laboratório antes do início do experimento propriamente dito (Tabela 7).

A maioria dos estudos descreveu frequência de alimentação (81,7%), acesso a água (83,7%), ciclo claro e escuro (65,4%) e temperatura do alojamento (62,1%). Porém, a maioria dos trabalhos não descreveram o tipo de alimentação (73,9%) ou a qualidade da água (98%) oferecidos aos animais. Ainda, nenhum dos estudos analisados descreveu a realização de enriquecimento ambiental (Tabela 7).

Tabela 7- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição das condições de manutenção dos animais nos artigos avaliados artigos (n = 153).

Descrição	Total	
	Sim	Não
Aclimação ao biotério	77	76
Aclimação antes do experimento	3	150
Frequência de alimentação	125	28
Tipo de alimentação	40	113
Acesso a água	128	25
Qualidade da água	3	150
Ciclo de claro/escuro (12/12 h)	100	53
Temperatura do alojamento	95	58
Enriquecimento ambiental	0	153

Questionamento empregado: Os animais foram ambientados em relação ao tipo de gaiola? As condições de manutenção dos animais foram descritas quanto ao tipo e frequência de alimentação, ciclos de luz e escuro, temperatura, qualidade e acesso de água? Foi realizado enriquecimento ambiental?

O enriquecimento ambiental está inserido no terceiro R, refinamento, dos preceitos deixados por Russell e Burch, (1959). Sua finalidade é garantir o mínimo de sofrimento e estresse dos animais utilizados. Em suas acomodações básicas no biotério, os animais de laboratório estão inseridos em ambientes que podem levar a manifestação de estereotípias ou comportamentos indesejados, como automutilação, repetição de movimentos, e agressividade exagerada devido principalmente ao ambiente empobrecido e reduzido. Assim, as técnicas de enriquecimento ambiental consistem na inserção de diversos objetos e práticas, específicas para cada espécie, no ambiente em que os animais estão acomodados, a fim de tornar a rotina mais criativa e diminuir os comportamentos indesejados, proporcionando melhor qualidade de vida para os animais (Oliveira et al., 2018).

Retomando os levantamentos que analisaram o impacto das diretrizes ARRIVE no relato dos estudos pré-clínicos, o estudo analisando artigos publicados entre 2010 e 2012 encontrou que em relação às condições de manutenção dos animais, dos 396 artigos analisados, 24,24% descreveram esses itens enquanto apenas 2,02% descreveram intervenções para melhorar o bem-estar animal Liu et al. (2016). Já os levantamentos realizados em artigos publicados mais recentemente (Nam et al., 2018; Gupta, 2019) chegaram a informações conflitantes, muito provavelmente por utilizarem estratégias diferentes de avaliação. Assim, Nam et al. (2018) avaliaram item 9b (condições de manutenção) das diretrizes ARRIVE na forma de subitens em 50 artigos analisados. Estes autores encontraram que menos de 30% das publicações revisadas relataram alojamento, manejo e alocação de animais enquanto menos 10% não relataram os subitens do microambiente, como material de cama, tipo de gaiola e número de animais por gaiola, e nenhum artigo descreveu enriquecimento ambiental. Já o levantamento feito por Gupta (2019), que considerou item 9b (condições de manutenção) e 9c (intervenções em relação ao bem-estar animal) das diretrizes ARRIVE sem avaliar os respectivos subitens, encontrou que 95,03% das publicações analisadas descreveram as condições de manutenção dos animais e nenhum dos artigos analisados descreveu intervenções relacionadas com o bem-estar animal.

Na experimentação animal, os modelos devem ser sensíveis aos tratamentos experimentais empregados e devem apresentar uma variação mínima entre os sujeitos experimentais para que possam ser reproduzíveis. Quando não há controle adequado sobre variáveis que potencialmente alterem o resultado do modelo, o poder do experimento em detectar as possíveis alterações induzidas pela intervenção em estudo é consideravelmente diminuído ou mesmo anulado. Essas variáveis incluem informações a respeito de idade e genética dos animais assim como condições ambientais do biotério tais como controle de infecções, verminoses e alterações ambientais. Boas condições de sanidade e ao bem-estar devem ser mantidas pois animais em estresse são mais variáveis do que aqueles mantidos em condições ideais de instalações (Russell e Burch, 1959; Festing e Altaman, 2002).

As boas condições ambientais permitem que os animais de laboratório possam se desenvolver de forma plena, ou seja completarem adequadamente os ciclos de crescimento e amadurecimento. Além disso, a garantia de boas condições de saúde e bem-estar dos animais irá consequentemente resultar em variações mínimas durante o experimento levando a resultados mais robustos.

Desta forma, a descrição completa de dados sobre a espécie, linhagem, sexo e idade dos animais utilizados assim como das condições de habitação e enriquecimento ambiental deve ser considerado desde o planejamento do estudo. Os animais devem ser alojados de maneira que seus comportamentos específicos da espécie possam ser manifestados, evitando estereotípias induzidas pelo estresse, além de garantir a manutenção das condições de homeostasia do organismo. Temperatura, umidade, ventilação e iluminação de um biotério devem ser projetadas de modo a manter a correta fisiologia, morfologia e comportamento do animal. Além disso, a arquitetura do biotério precisa levar em conta a necessidade social dos animais, garantindo o contato físico e de comunicação dos mesmos. Quanto à alimentação, esta deve fornecer os nutrientes necessários para promover o desenvolvimento do animal; por isso, é importante reportar o tipo de ração utilizada para manutenção dos animais. De maneira similar, a oferta adequada de água assim como a qualidade desta devem ser descritas de maneira completa. Além disso, água e alimentos (ração) devem ser protegidas quanto a possíveis contaminantes biológicos e químicos, uma vez que, além de tóxicos, esses contaminantes podem provocar alterações fisiológicas dos animais interferindo no desfecho experimental, mesmo em concentrações baixas (National Research Council, 2011).

Em conclusão, as condições de habitação e manutenção dos animais são fundamentais para saúde e o bem-estar dos mesmos. Priorizar o saneamento é cuidar dos animais, como também garantir que o trabalho de pesquisa seja relevante e reprodutível. Em estudos toxicológicos, cujo objetivo é avaliar a segurança de uso de uma determinada amostra, garantir as condições de manutenção dos animais deve ser prioridade a fim de que alterações fisiológicas decorrentes de problemas com a alimentação ou a água, por exemplo, levem a uma falsa interpretação dos achados nos desfechos analisados (Newberne, 1975). Relatar que todos esses cuidados foram tomados, torna os resultados publicados mais confiáveis e úteis para a continuação das pesquisas.

4.3.2 Tema 2 - Desenho experimental da avaliação de toxicidade

Para ser considerada ética e aceitável, os experimentos com animais devem ser realizados com base em bom planejamento, seguido de execução e análise eficiente e distinta, de forma que os dados apresentados possam ser interpretados claramente (Festing e Altaman, 2002). Assim, o desenho experimental inclui o desenho do estudo (determinação de número de grupos

experimentais, de grupos controles, escolha de medidas que minimizem viés, como randomização e cegamento) e a determinação do número da amostra de estudo, ou seja, o número total de animais em cada experimento, número de animais em cada grupo experimental, número de vezes que o experimento foi repetido assim como a estratégia utilizada para determinação do número de animais (se foi baseado ou não em cálculo estatístico). Estes são pontos chaves e cruciais para entender como se chegou aos desfechos analisados.

Nossa primeira análise realizada dentro do tema 2 foi referente ao plano de estudo da análise toxicológica. Desta forma, considerando-se todos os métodos de toxicidade (n=198 métodos) encontramos que 71,7% dos artigos descreveram o número de grupos de animais experimentais. Quando analisamos por tipo de métodos, a frequência de relato do número de grupos experimentais foi de 61,1% para toxicidade aguda, 88,6% para toxicidade subaguda, 91,2% para toxicidade subcrônica e 100% para toxicidade crônica (Tabela 8).

Já em relação a descrição de grupos controle como parâmetro para comparação da análise, apenas na toxicidade aguda vemos que a maioria (53,2%) não descreveu a presença de grupos controle. Outro item analisado foi se existiu grupo experimental na avaliação toxicológica, visto que algumas metodologias de estudo de toxicidade não preconizam grupos experimentais e sim número total de animais. Assim, a maioria dos métodos (individuais e análise geral) de toxicidade apresentou a descrição de grupos experimentais, sendo que 42 métodos (dos quais 39 de toxicidade aguda, 2 de toxicidade subaguda, e 1 de toxicidade subcrônica) não apresentam a descrição de grupos experimentais (Tabela 8).

Tabela 8 - Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto desenho do estudo da avaliação de toxicidade análise geral, e por métodos de toxicidade

Análise por método	Descrição Item					
	Existência de grupo experimental		Número de grupos de animais experimentais		Grupo Controle	
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
Total (n = 198)	156	42	142	56	118	80
Toxicidade Aguda (n = 126)	87	39	77	49	59	67
Toxicidade Subaguda (n = 35)	33	2	31	4	30	5
Toxicidade Subcrônica (n = 34)	33	1	31	3	26	8
Toxicidade Crônica (n = 3)	3	0	3	0	3	0

Questionamento empregado: Descreve o número de grupos experimentais? Descreve o uso de grupos de animais controle? Existiu grupo experimental?

Considerando os levantamentos já publicados, observamos que a descrição de número de grupos experimentais e de grupos controle foi feita pela maioria, se não a totalidades dos estudos analisados (Nam et al., 2018; Gupta, 2019). Os nossos dados corroboram o relato da literatura.

Quanto às medidas para diminuir viés (Tabela 9), foram analisados dois subitens em relação à randomização. No primeiro subitem, perguntamos se o método descrevia a realização de randomização na distribuição dos animais, e em seguida, buscávamos a descrição dos meios utilizados para a realização dessa distribuição aleatória. Desta forma, observamos que de maneira geral a maioria (68,7%) dos métodos não citou aleatorização na distribuição dos animais, sendo os métodos de toxicidade aguda (79,4%) e de toxicidade subaguda (60%) aqueles que menos citaram randomização enquanto os métodos de toxicidade subcrônica (58,8%) e crônica (66,7%) citaram a realização de randomização. Porém, a maioria não descreveu como o processo de randomização foi feito; tendo apenas 3 métodos (2 de toxicidade subaguda e 1 de toxicidade subcrônica) descreveram como a randomização foi feita (Tabela 9).

Tabela 9- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto à randomização na avaliação da toxicidade análise geral, e por métodos de toxicidade

Análise por método	Descrição Item			
	Cita randomização		Descreve o processo de randomização	
	Sim	Não	Sim	Não
Total (n = 198)	62	136	3	195
Toxicidade Aguda (n = 126)	26	100	0	126
Toxicidade Subaguda (n = 35)	14	21	2	33
Toxicidade Subcrônica (n = 34)	20	14	1	33
Toxicidade Crônica (n = 3)	2	1	0	3

Questionamento empregado: Descreve processo de randomização na distribuição dos animais nos grupos experimentais?

Quanto ao cegamento, seja na distribuição dos animais seja na análise dos resultados obtidos, encontramos apenas um método de toxicidade aguda que relatou sua realização (Tabela 10).

Tabela 10- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto à cegamento análise geral e por métodos de toxicidade.

Análise por métodos	Descreve cegamento	
	Sim	Não
Análise Geral (n = 198)	1	197
Toxicidade Aguda (n = 126)	1	125
Toxicidade Subaguda (n = 35)	0	35
Toxicidade Subcrônica (n = 34)	0	34
Toxicidade Crônica (n = 3)	0	3

Questionamento empregado: Foi realizado cegamento para obtenção e análise dos resultados?

No que se refere a descrição de número da amostra, considerando-se descrição de número total de animais por experimento e o número de animais em cada grupo experimental, observamos que a maioria, tanto nos métodos individuais como na análise geral, descreveu adequadamente este item (Tabela 11). Entretanto, apenas dois trabalhos de toxicidade aguda descreveram que a definição do número de animais foi feita com base em cálculo estatístico.

No levantamento sistemático que deu origem as diretrizes ARRIVE, a avaliação de descrição de medidas para reduzir viés como randomização e cegamento verificou que 12% dos 271 estudos analisados descreveram a alocação aleatória dos animais em seus grupos experimentais, e apenas 9% dos estudos que relataram o uso de randomização forneceram detalhes sobre como foi realizado este método (Kilkenny et al., 2009). Por outro lado, estudos mais recentes encontraram frequência de relato de randomização variando de 17,14% (Nam et al., 2018) a 45,34% (Gupta, 2019) e de cegamento entre 6,38% (Nam et al., 2018) e 11,18% (Gupta, 2019). Já com relação a número de animais usado em cada grupo experimental, a variação foi de 46% (Nam et al., 2018) a 100% (Gupta, 2019) da frequência de relato. Finalmente, o uso de cálculo estatístico para definição do número de animais por grupo foi muito pouco descrito, sendo apontado como não descrito (Gupta, 2019) a descrito por apenas 8% dos artigos analisados (Nam et al., 2018). Desta forma, nossos achados estão em concordância com os levantamentos já realizados apontando que os pontos críticos na descrição do desenho experimental são método de randomização, realização de cegamento e utilização de métodos estatísticos para definição de tamanho da amostra.

Tabela 11- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto número da amostra na avaliação de toxicidade, análise geral e por métodos de toxicidade

Análise por método	Descrição Item					
	Número total de animais/experimento		Número de animais/grupo experimental		Definição do número de animais por cálculo estatístico	
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
Total (n = 198)	160	38	148	50	2	197
Toxicidade Aguda (n = 126)	99	27	82	44	2	124
Toxicidade Subaguda (n = 35)	31	4	32	3	0	35
Toxicidade Subcrônica (n = 34)	27	7	31	3	0	34
Toxicidade Crônica (n = 3)	3	0	3	0	0	3

Questionamento empregado: Descreve o número de grupo de animais experimentais? Descreve o uso de grupo de animais controle? O número total de animais usados em cada experimento e o número de animais em cada grupo experimental foram descritos? A definição do número de animais por grupo experimental foi feita com base em cálculo estatístico?

Retomando o estudo feito por Reichlin et al. (2016), sobre a visão dos pesquisadores suíços a respeito da qualidade, da conduta experimental e do relato dos mesmos na literatura, estes autores perguntaram sobre quais medidas contra os riscos de parcialidade os pesquisadores usavam normalmente na condução das suas experiências. Dentre 7 opções apresentadas pelos autores, 90% assinalou “resultado primário” como método de parcialidade, 84% assinalaram “critérios de inclusão e exclusão”, 86% “randomização”, 82% “plano de análise estatística”, 69% registrou o “cálculo do tamanho da amostra” e 52% “ocultação da alocação” (cegamento da distribuição). Além disso, os entrevistados também foram perguntados sobre quais medidas contra o risco de viés haviam sido relatadas em seu último artigo publicado. As respostas mais frequentes foram ter descritos detalhes do plano de análise estatística (71%) e ter descrito variável de desfecho primário (78%); a minoria dos pesquisadores relatou descrição de critérios de inclusão e exclusão (45%), randomização (44%), cegamento (27%) e cálculo amostral (18%) como medidas usadas em sua última publicação para diminuir o risco de viés. Mais ainda, os autores também perguntaram sobre as razões, de uma lista pré-definida, para não relatar as medidas contra risco de viés nas publicações. Assim, os autores encontraram que para não descrição do item “cálculo do tamanho da amostra” os motivos mais comuns foram, nesta ordem, “não era necessário”, “não era comum” e “limitações de espaço pelos periódicos”. Já para a não descrição do item “análise estatística” a razão mais apontada foi que “não era necessário”, enquanto o motivo “não pensavam” foi o mais apresentado para a variável de resultado primário. Estes resultados sugerem que, mesmo em países

desenvolvidos, a educação continuada dos pesquisadores sobre como garantir a reprodutibilidade dos experimentos e aumentar a confiabilidade dos mesmos é uma necessidade urgente.

E qual a importância da descrição correta dos itens analisados neste tema? A distribuição aleatória (randomização) dos animais na unidade experimental do estudo, seja ela os animais individuais ou a gaiola, faz com que todas as unidades experimentais tenham a mesma probabilidade de receber o mesmo tratamento. Esse processo ajuda na diminuição das fontes de variação, as quais o pesquisador pode ou não ter conhecimento ou controle, e que podem influenciar os resultados. Por sua vez, o cegamento é uma medida que evita viés; deve ser realizado sempre que possível e principalmente quando houver alguma análise subjetiva dos resultados. O cegamento é possível de ser realizado através da codificação de tratamentos, animais e amostras conhecido apenas pelo pesquisador principal e desconhecido pelo pesquisador diretamente envolvido com tratamentos, animais e amostras (Festing e Altaman, 2002).

Já a determinação do número de animais deve ser adequada para demonstrar ou excluir a hipótese do estudo, refletido no efeito biológico esperado ou explorado nos testes. Assim, para responder adequadamente à questão proposta pela pesquisa é necessário planejar um bom desenho experimental, incluindo planejamento do número de animais, medidas para redução de viés, ferramentas estatísticas necessárias e determinação do tamanho apropriado da amostra (Butterweck e Nahrstedt, 2012). Estes cuidados de planejamento precisam ser depois descritos no manuscrito que será publicado ao final da pesquisa.

Na literatura há uma diversidade de diretrizes, livros, manuais que podem auxiliar o pesquisador nas tomadas de decisões quanto ao desenho experimental. Há diretrizes que auxiliam no planejamento de testes com animais como as diretrizes PREPARE (*Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence*) (Smith et al., 2018), que foram projetadas para todos tipos de pesquisas e teste com animais, contendo tópicos sobre o manejo e instalações dos animais. Estas diretrizes atendem tanto as necessidades dos animais, como as de seus cuidadores (equipe técnica, cientistas, veterinários e funcionários) e de órgãos de financiamento de pesquisa.

Desta forma, as diretrizes disponíveis como ARRIVE, e PREPARE, entre outras, complementam-se no planejamento e depois no relato dos experimentos com animais e, conseqüentemente, na implementação dos conceitos deixados por Russell e Burch, (1959) quanto a substituição, refinamento e redução.

4.3.3 Tema 3 - Procedimentos experimentais e análise da avaliação toxicidade

Neste terceiro tema, buscamos investigar como informações importantes quanto ao procedimento e análise toxicológica das plantas medicinais estavam sendo descritas nos artigos encontrados em nossa amostra. Primeiramente, realizamos uma análise quantitativa buscando agrupar os artigos em função do tipo de método; assim, poderíamos verificar quais os métodos estavam sendo mais utilizados na segurança de plantas medicinais. Posterior, verificamos qual seria o tempo de tratamento e de acompanhamento dos animais.

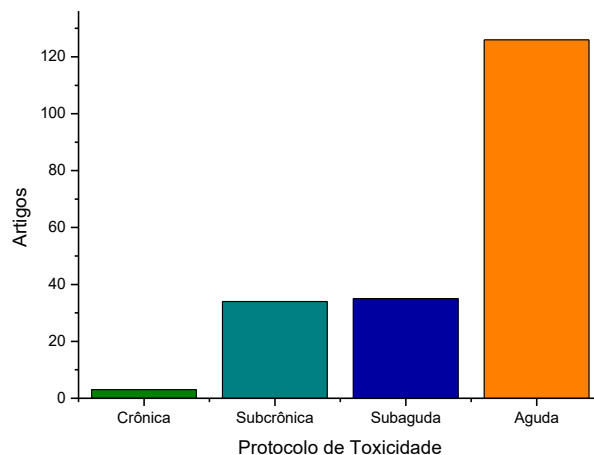
O tratamento com plantas medicinais acompanha a humanidade há milênios. A maioria das pessoas sabe de alguma planta ou algum efeito terapêutico da mesma, e muitas vezes esse conhecimento é passado continuamente através das gerações. Todo esse conhecimento acumulativo se reflete em estudos científicos. Até 2007, já havia sido documentado o uso medicinal de aproximadamente 10.000 plantas, e dados mais recentes sobre novas entidades químicas utilizadas como fármacos confirmam a importância dos produtos naturais, uma vez que mais 60% dos novos fármacos, introduzidos entre 1981 e 2014, são de alguma forma derivados de produtos naturais (Newman et al., 2003; McChesney et al., 2007; Butterweck e Nahrstedt, 2012; Newman e Cragg, 2016).

Utilizando a ferramenta bibliométrica, que é um método de análise quantitativa para a pesquisa científica na qual, através de dados estatísticos, é possível mensurar a contribuição para o conhecimento científico de um determinado tema ou área em questão e evidenciar as tendências de pesquisa, como também identificam novos temas de pesquisa (Soares et al., 2016; Saad et al., 2018), avaliamos a importância do tema fitoterapia na base de dados PubMed. Desta forma, empregando os descritores *Phytotherapy* ou *Medicinal, Plant* na base de dados PubMed - Instituto Nacional de Saúde Norte Americano (NIH), verificamos que as pesquisa envolvendo plantas medicinais e/ou fitoterápicos tiveram um crescimento acentuado no final da década de 1990 e início dos anos 2000, mantendo-se atualmente em um nível estável de publicações nessa área, evidenciando-se assim o constante interesse e necessidade de conhecimentos sobre as plantas medicinais e seus usos. De forma similar, as publicações de relatos de toxicidade de plantas medicinais seguiram a mesma tendência, quando analisamos por bibliométrica a combinação de descritores *Medicinal, Plant* e *Toxicity Tests* na base PubMed.

O conceito de avaliação toxicológica abrange a análise de dados toxicológicos de uma substância química, ou mistura de, com finalidade de classificá-lo toxicologicamente e fornecer informações quanto à forma segura de sua aplicação, além de, fornecer subsídios para medidas preventivas e curativas quando de seu uso inadequado (Larini, 1997). As plantas medicinais são xenobiótico para nosso organismo, ou seja, uma substância estranha; desta forma, os testes de toxicidade permitem evidenciar a relação dose-efeito satisfatória e estabelecer causa-efeito, indicando também o grau de confiança na amostra em estudo. Estes testes devem ser realizados utilizando-se método bem aceitos internacionalmente, como também, seguindo as exigências legais de cada país de origem (Lapa et al., 2010). É importante salientar que os testes toxicológicos buscam evidenciar, como objetivo primário, as reações tóxicas intrínsecas dos extratos/frações, ou seja, aquelas relacionadas à constituição química dos mesmos, em função do tempo de uso, doses empregadas e possíveis interações (Silveira et al., 2008).

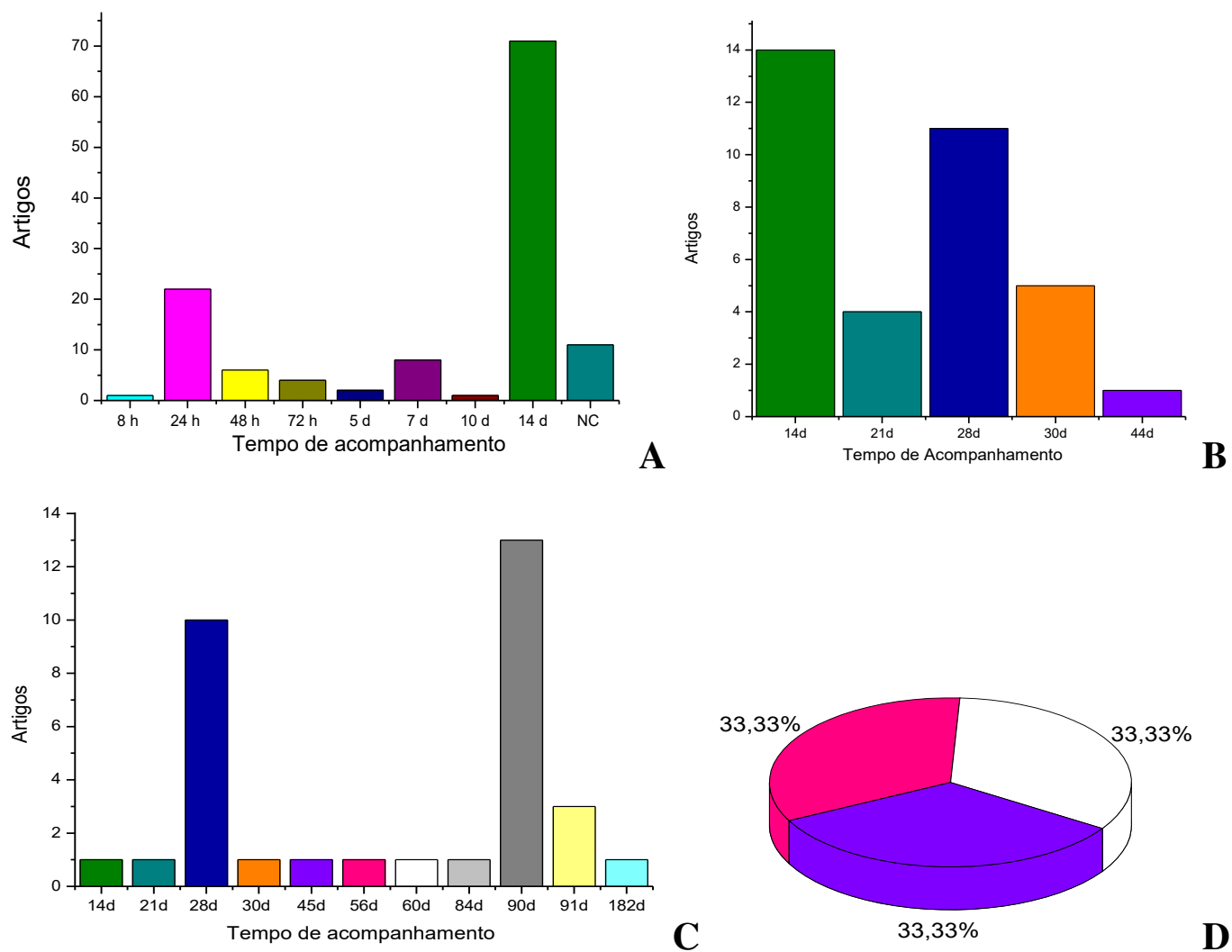
Assim, em nossa primeira análise encontramos os 4 tipos de método de toxicidade (Figura 8) de acordo com o que foi proposto em nosso questionário de avaliação (Apêndice 2). Evidenciamos que os métodos de toxicidade aguda foi o mais descrito ($n = 126$), seguido do método de toxicidade subaguda ($n = 35$), subcrônica ($n = 34$) e crônica ($n = 3$). Esta classificação foi feita com base nos descritores encontrados no título e/ou no resumo dos trabalhos selecionados. Alguns poucos artigos selecionados não apresentavam esses descritores e a classificação foi feita com base na descrição do tempo de experimento em função da definição apresentada no dicionário médico MESH, ou seja, teste de toxicidade subaguda compreende experimentos destinados a determinar os potenciais efeitos tóxicos de uma exposição a curto prazo (algumas semanas) enquanto o testes de toxicidade subcrônica diz respeito a experimentos destinados a determinar os potenciais efeitos tóxicos da exposição de médio prazo (alguns meses) e teste de toxicidade crônica consiste em experimentos destinados a determinar os potenciais efeitos tóxicos de uma exposição a longo prazo.

Figura 8 – Número de método de avaliação de toxicidade (aguda, subaguda, subcrônica e crônica) encontrado na amostra deste levantamento (n = 153).



Uma vez evidenciados os métodos experimentais, buscamos responder à questão sobre como foi relatado o tempo de duração de tratamento e de acompanhamento dos animais (Figura 9). Nos métodos de toxicidade aguda, os métodos descreveram que os animais foram tratados uma única vez; entretanto, verificamos grande variação no tempo de acompanhamento, para observação de sinais clínicos de toxicidade, indo de 8 horas até 14 dias. Dentre os tempos de acompanhamento, evidenciamos que os mais utilizados foram os de 14 dias seguido por 24 e 48 h. Ainda, foram encontrados 11 artigos que não descreveram o tempo de acompanhamento dos animais (Figura 9A).

Figura 9 – Frequência de relato (em números absolutos) do tempo de tratamento e acompanhamento nos métodos de toxicidade encontrados.



A: métodos de toxicidade aguda (n = 126); B: métodos de toxicidade subaguda (n = 35); C: métodos de avaliação subcrônica (n = 34); D: métodos de toxicidade crônica (n = 3)

Teste de toxicidade aguda podem ser classificados como aqueles que evidenciam os efeitos tóxicos quando amostra é administrada em uma única dose (Denny e Stewart, 2013). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em seu guia para a condução de estudos pré-clínicos para evidenciar a segurança de medicamentos, os estudos de toxicidade de dose única (aguda) tem como objetivo avaliar a toxicidade da substância administrada, em uma ou mais doses (curva dose-efeito), durante um período não superior a 24 horas seguido de acompanhamento dos animais por 14 dias (BRASIL, 2013).

Este teste busca evidenciar os efeitos adversos, incluindo alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas ou mesmo morte do animal, de caráter imediato ou tardias, decorrentes de uma única administração da amostra em estudo. As alterações tardias, evidenciadas durante o período de acompanhamento, podem ser resultantes de lesões secundárias aos órgãos ou tecidos. Geralmente, a faixa de doses empregada neste teste é maior do que aquelas utilizadas em testes que evidenciam a toxicidade crônica. Roedores são a espécie rotineiramente empregada neste teste, mas espécies não roedoras também podem ser empregadas; ainda, a via de administração utilizada deve refletir a via de administração que será empregada nos testes clínicos (Chan et al., 2014).

Com relação ao método de toxicidade subaguda (Figura 9B), nos quais os animais são tratados e observados por algumas semanas, encontramos novamente uma grande variação no tempo de acompanhamento indo de 14 até 44 dias, sendo que o tempo de observação mais frequentemente relatado foi o de 14 dias, seguido pelos tempos de 28 e 30 dias. Já para o método de toxicidade subcrônica (Figura 9C), que se refere aos animais tratados e observados por alguns meses, encontramos relatos variando entre 14 e 182 dias, com relato mais frequente de tempo de observação de 90 dias, seguido pelo de 28 dias. Finalmente, os três estudos que descreveram métodos de toxicidade crônica (exposição a longo prazo) foram encontrados os tempos de 90, 180 e 198 dias (Figura 9D).

Notamos que nos três métodos que evidenciam exposição crônica (subaguda, subcrônica e crônica) há sobreposição no tempo de tratamento e acompanhamento, refletindo a ambiguidade das definições de tempo como “algumas semanas”, “alguns meses” ou “longo prazo”. Segundo ANVISA, os estudos que evidenciam cronicidade de exposição a uma amostra são chamados de estudos de doses repetidas, cujo o propósito é caracterizar o perfil toxicológico da substância pela administração repetida. Segundo esse mesmo guia, o período de duração do acompanhamento clínico dos animais pode ser variável, sendo recomendado de 2 semanas ou 6

meses para roedores e 2 semanas a 9 meses para não roedores; o estabelecimento do tempo de duração do tratamento dependerá do objetivo da pesquisa clínica que será realizada posteriormente (BRASIL, 2013).

Outra definição encontrada, e que também reflete a variação de tempo de tratamento, diz que os testes de toxicidade subaguda são aqueles nos quais o tratamento e acompanhamento são realizados por 14 a 28 dias, os de toxicidade subcrônica teriam tempo de tratamento e de acompanhamento de 90 dias, enquanto nos de toxicidade crônica o tratamento e acompanhamento são realizados por 180 dias em roedores e 270 dias em não roedores (Denny e Stewart, 2013).

Ainda, para Hulla et al. (2014), a diferença entre o método de toxicidade subcrônica e crônica é baseada no tempo de vida do animal. Assim, para ser considerada toxicidade subcrônica o tempo de tratamento e acompanhamento deve ser consideravelmente menor do que a duração da vida do animal em estudo enquanto a exposição crônica pode durar a vida toda do animal. Além disso, estes autores reforçam que estes testes devem mimetizar as condições prevista para o uso da amostra/medicamento em questão e se justificam, pois, evidenciam efeitos adversos à saúde que surgem a partir da exposição a doses repetidas e não evidenciado pelo teste de toxicidade aguda.

Finalmente, as diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, *Organisation for Economic Co-operation and Development*) também não nomeiam como subaguda, subcrônica e crônica o método que evidenciam cronicidade da toxicidade de uma amostra. Segundo a OECD, os testes de toxicidade em roedores são denominados simplesmente como de doses repetidas de 28 dias (diretrizes no. 407) ou de 90 dias (diretrizes no. 408), sendo que o teste de toxicidade crônica (diretrizes no. 452) terá duração de tratamento de 12 meses (OECD, 2008a; OECD 2018a; OECD, 2018b).

Desta forma, fica claro que o método de administração de uma amostra em doses repetidas tem como objetivo identificar a toxicidade órgão-específica em função da cronicidade da exposição, através de efeitos sobre parâmetros fisiológicos (sinais clínicos), hematológicos, bioquímicos e histopatológicos visando estabelecer o nível de efeito adverso não-específico (NOAEL). Estes achados, devidamente relatados, irão orientar na seleção de doses que serão empregadas em estudos clínicos assim como na previsão de possíveis efeitos tóxicos em humanos (Brasil, 2013; Hulla et al., 2014).

Considerando a amostra de método analisados, foi possível observar que, mesmo com as grandes variações e ambiguidades de definição, a maioria dos artigos relata por quanto tempo os animais foram tratados e observados.

O segundo subtema analisado foi sobre o emprego das diretrizes OECD. Neste item, buscamos verificar se os protocolos analisados descreveram a utilização das diretrizes OECD para delineamento experimental. Verificamos que na análise geral um pouco mais da metade dos protocolos (54%) descreveu o uso dessas diretrizes, enquanto a outra metade (91 protocolos, em números absolutos) descreveu que tomou como base outras referências. Em relação aos protocolos individuais, encontramos que para os testes de toxicidade aguda, subaguda e crônica a maioria (56,3, 57,1 e 66,7%, respectivamente) dos artigos descreveu o uso de alguma diretriz OECD enquanto a maioria (58,8%) dos protocolos de toxicidade subcrônica não descreveu a utilização dessas diretrizes (Tabela 12).

Tabela 12 – Frequência de relato (em números absolutos) da descrição da utilização de diretrizes OECD nos protocolos analisados.

Descrição	Análise por métodos	Total	
		Sim	Não
Protocolo baseado em diretrizes OECD	Total (n = 198)	107	91
	Toxicidade Aguda (n = 126)	71	55
	Toxicidade Subaguda (n = 35)	20	15
	Toxicidade Subcrônica (n = 34)	14	20
	Toxicidade Crônica (n = 3)	2	1

Questionamento empregado: O protocolo experimental baseou-se em alguma diretriz da OECD para delineamento?

Diferentes organizações, mundiais e regionais, buscam estabelecer um conjunto de regras, princípios e práticas, denominadas diretrizes, para realização de testes toxicológicos, a fim de que, os resultados encontrados nestes testes evidenciem dados científicos confiáveis, relevantes e repetíveis. Além disso, essas diretrizes são desenvolvidas para esclarecer como a técnica deve ser empregada, definindo políticas para os métodos e seu monitoramento, além de apresentar alternativas para os métodos empregados. Dentre as organizações globais podemos destacar a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), o Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (*International Council for Harmonisation* ICH) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), além das organizações regionais de cada país (Hulla et al., 2014).

A OECD é uma organização intergovernamental, composta por 29 países industrializados da América do Norte, Europa, incluindo União Europeia, e Pacífico. Seus trabalhos são realizados por 200 comitês especializados e grupos subsidiários compostos por delegados dos países membros. Seu objetivo é coordenar e harmonizar políticas, discutir questões de preocupação mútua e responder a problemas internacionais, entre eles, aqueles que refletem segurança química tanto do ambiente, da saúde e segurança. Esta organização emite decisões, recomendações e relatórios técnicos, sendo a mais conhecida coleção de métodos usados para avaliar os riscos de produtos químicos. Esta coleção de métodos abrange desde testes de propriedades físicas e químicas até avaliação dos efeitos sobre a saúde humana e a vida selvagem, além de acúmulo e degradação no meio ambiente. As diretrizes OECD também são reconhecidas mundialmente como a ferramenta de referência padrão para testes que evidenciam a toxicidade (OECD, 2001).

Portanto, ao utilizar diretrizes de organizações, os protocolos de toxicidade tendem a realizar métodos padronizados, confiáveis e reprodutíveis, visto que os dados de toxicidade de uma amostra podem ser afetados por diversos fatores experimentais, que podem levar à imprecisão, como via de duração e exposição, doses utilizadas, e qualidade dos dados (Corrêa et al., 2008). E considerando-se os resultados obtidos na amostra em estudos, observamos que a preocupação em usar, e descrever, métodos padronizados se reflete em metade dos pesquisadores da área de plantas medicinais.

Continuando a avaliação dos métodos selecionados, a próxima análise foi referente à amostra. Nesta etapa, procuramos evidenciar como os métodos estavam descrevendo a preparação da amostra, sua formulação, as doses empregadas, a via de administração e a frequência de tratamento. Essas são as informações básicas para garantir a reprodução e translação dos resultados assim como para a compreensão e discussão dos efeitos tóxicos observados no estudo.

Em relação à descrição das doses, pudemos verificar que a maioria (análise geral) dos artigos descreveu quais doses foram administradas, sendo que apenas 7 métodos de toxicidade aguda não descreveram as doses utilizadas. Quanto à descrição de como as formulações contendo extratos e/ou frações foram preparadas, encontramos que a maioria (64 a 77%) dos artigos não descreveu como as formulações foram preparadas. A exceção foi o método de toxicidade crônica ($n = 3$), nos quais foi encontrada a descrição da preparação da formulação (Tabela 13).

Tabela 13- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição das características da amostra, análise geral e por métodos de toxicidade

Análise por método	Descrição Item									
	Dose		Cálculo DL50		Formulações		Via de administração		Frequência de tratamento	
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
Total (n = 198)	191	7	49	149	55	143	168	30	185	13
Toxicidade Aguda (n = 126)	119	7	47	79	32	94	104	22	117	9
Toxicidade Subaguda (n = 35)	35	0	2	33	8	27	33	2	34	1
Toxicidade Subcrônica (n = 34)	34	0	0	34	12	22	29	5	32	2
Toxicidade Crônica (n = 3)	3	0	0	34	3	0	2	1	2	1

Questionamento empregado: A preparação da amostra foi descrita quanto as doses e formulações utilizadas? Foram descritos a via de administração, a frequência de tratamento?

Quanto a via de administração, a grande maioria dos métodos (individuais e na análise geral) descreveu qual via de administração foi utilizada. Entretanto, foram encontrados 30 métodos (números absolutos) cuja descrição não permite identificar com clareza qual via foi utilizada para administrar o extrato e/ou fração da planta estudada; destes, 22 métodos de toxicidade aguda não descreveram a via utilizada (Tabela 13). Finalmente, a maioria dos métodos descreveu quantas vezes a amostra foi administrada, tantos nos métodos individuais quanto na análise geral. Ainda assim, verificamos que 13 métodos (números absolutos) não descreveram com qual frequência a amostra foi administrada, novamente a maioria (9 métodos) eram de toxicidade aguda (Tabela 13).

Concluindo, de maneira geral, as características da amostra em teste estão sendo bem relatadas em quase todos os seus requisitos. O aspecto ainda relatado de forma parcial refere-se à preparação da formulação contendo o extrato e/ou fração. Ainda, os relatos que com maior frequência apresentaram falhas nos itens descritos foram aqueles referentes aos métodos de toxicidade aguda.

A partir dos relatos das doses empregadas nos métodos, verificamos que houve uma grande variação, com doses máximas administradas pela via oral/ intraperitoneal variando de poucos miligramas a alguns gramas por quilo de peso vivo. A compilação dos dados encontrados está apresentada no Apêndice 5; as doses máximas reportadas estão organizadas por método individuais (toxicidade aguda, subaguda, subcrônica, crônica) e considerando se os autores reportaram ou não o seguimento das diretrizes OECD.

Destacamos aqui que, mesmo entre os métodos que descreveram utilizar as diretrizes OECD, foram encontrados relatos da utilização de doses acima de 2000 mg/kg. As maiores doses encontradas, ainda que com baixa frequência, foram de 5000 até 20000 mg/kg para testes de toxicidade aguda, de 5000 mg/kg em teste de toxicidade subaguda e entre 6000 e 130000 mg/kg em método de toxicidade subcrônica. Segundo a OECD, a dose máxima a ser empregada nos testes de toxicidade é 2000 mg/kg, existindo a possibilidade para usar uma dose adicional de 5000 mg/kg, apenas quando justificado por uma necessidade (OECD, 2001).

Há considerações sobre a toxicocinética dos extratos e frações das plantas que são reflexo da farmacocinética. Por exemplo, a via de administração nos testes de toxicidade deve ser a mesma que será utilizada na clínica, quando viável. No caso de plantas medicinais e/ou frações, a maioria das preparações envolve a forma de infusões, decocções ou macerados para consumo humano oral; portanto, esta via de administração deveria ser a primeira escolha nos estudos com animais. A utilização de mais de uma via para avaliar os efeitos da amostra deverá ser realizada se substância for usada por mais de uma via de administração na clínica, por exemplo vias oral e parenteral, pois nestes casos serão observadas ou antecipadas as diferenças entre a exposição local e sistêmica quantitativamente (International Conference on Harmonisation-ICH, 2000; Butterweck e Nahrstedt, 2012).

Considerando-se a via intraperitoneal, a absorção de uma substância pode variar em função da habilidade técnica do pesquisador como também de características de solubilidade da amostra em estudo. Assim, é possível que as formulações de extrato/frações possam causar irritação no peritônio parietal e visceral devido à baixa solubilidade no veículo escolhido das substâncias presentes na amostra. Essa irritação local afetará a taxa de absorção e causará dor ao animal. Este reflexo doloroso pode ser observado através de sinais e sintomas como postura curvada e diminuição na locomoção. Erroneamente, o observador poderá concluir que esses sinais são decorrentes de efeito tóxico da amostra quando, na verdade, trata-se de uma resposta inflamatória causada pela baixa absorção da amostra. Lembrando ainda que esse estímulo doloroso causa estresse nos animais em teste o que pode interferir na análise dos resultados, especialmente em estudos de doses repetidas (Ryabinin et al., 1999; Butterweck e Nahrstedt, 2012)

Considerando agora a descrição da forma de análise dos resultados, investigamos se os métodos de toxicidade selecionado relatavam a realização de cálculo da DL_{50} , uma vez não é mais recomendado seu cálculo nos testes de toxicidade aguda desde 2002 (Botham, 2004). Assim,

evidenciamos que a maioria dos trabalhos não descreveram a utilização deste cálculo, tanto na análise geral, como nos métodos individuais. Entretanto, alguns métodos de toxicidade aguda (37,3%) descreveram que iriam calcular DL_{50} (Tabela 13). Esta dose (DL_{50}) era usualmente utilizada em testes de toxicidade aguda e expressava a potência de um agente em causar a morte de 50% da população expostas as condições do método). Porém, apenas esse dado não representa todas as inúmeras informações que podem ser obtidas através da observação clínica do animal durante a realização do teste de toxicidade aguda nem permite o estabelecimento de doses seguras para demais estudos (Valadares, 2006; Lapa et al., 2010).

Em seguida, analisamos se os métodos descreviam a ordem utilizada para tratar e observar os animais. Verificamos que para ambos os parâmetros, tanto na análise geral como nos métodos individuais, a maioria dos métodos não descreveu esses dois subitens (Tabela 14). Quanto a descrição de avaliação dos sinais e sintomas de toxicidade, a maioria dos estudos descreveu sua utilização; porém, em números absolutos, 47 métodos não descreveram esta informação, dos quais 26 eram método de toxicidade aguda. Este é um dado preocupante uma vez que, na maioria desses métodos, não há descrição de outros tipos de avaliação, como bioquímica, hematológica e histopatológica (Tabela 14).

Ainda dentro dos parâmetros de avaliação clínica, a avaliação de variação de peso foi descrita na maioria das vezes nos métodos de toxicidade por doses repetidas (subaguda = 68,6%, subcrônica = 76,5%, crônica = 100%) enquanto nos métodos de toxicidade aguda a maioria não descreveu essa avaliação (67,5%). Já quanto ao relato da frequência com que o peso do animal seria avaliado, a análise dos métodos selecionados indicou a mesma tendência observada para a descrição de avaliação de peso, ou seja, relato encontrado na maioria dos métodos de toxicidade por doses repetidas e ausente na maioria dos métodos de toxicidade aguda (Tabela 14).

Quanto à avaliação do consumo de comida e água, em ambos os parâmetros houve má descrição visto que a maioria dos métodos não descreveram. Em números absolutos, verificamos que a 155 método não relataram a realização de avaliação do consumo de comida enquanto 174 não descreveram a realização de avaliação do consumo de água (Tabela 14).

Tabela 14- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto aos parâmetros ordem para tratamento, sinais clínicos (descrição e ordem de observação), avaliação ponderal, consumo de ração e água no método de toxicidade selecionados.

Descrição Item	Análise por método de toxicidade									
	Total (n = 198)		Aguda (n = 126)		Subaguda (n = 35)		Subcrônica (n = 34)		Crônica (n = 3)	
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
Ordem utilizada para tratar	31	167	26	100	0	35	5	29	0	3
Ordem utilizada para observar	18	180	18	108	0	35	0	34	0	3
Avaliação dos sinais clínicos de toxicidade	151	47	100	26	21	14	27	7	3	0
Avaliação do peso corporal	94	104	41	85	24	11	26	8	3	0
Frequência de tratamento	81	117	31	95	23	12	24	10	3	0
Consumo de comida	43	155	14	112	13	22	15	19	1	2
Consumo de água	24	174	10	116	7	28	7	27	0	3

Questionamento empregado: Foram descritos quais sinais e sintomas clínicos seriam observados em cada? Foi descrito a ordem de tratamento e observação dos animais? Foi descrita avaliação de consumo de água e de ração ao longo do experimento?

A observação do comportamento, através da avaliação de sinais e sintomas que indiquem toxicidade, é utilizada como a primeira ferramenta para avaliar os efeitos adversos da amostra testada na função de órgãos dos sistemas que são considerados fundamentais para sobrevivência, como sistema nervoso central (SNC), cardiovascular, respiratório e renal. Por exemplo, podem ser indicações de alterações no SNC as mudanças no padrão de alimentação (preferência ou evitação), nas interações sociais (predação, competição, nível de atividade), em comportamentos (respostas reflexas sensoriais/motoras, deambulação, higiene e curiosidade do animal ao que se passa ao seu redor), além de efeitos neurotóxicos manifestados em convulsões, tremor, ataxia (Baran, 2014). Portanto, a descrição dos sinais e sintomas, assim como do consumo de alimento e água, juntamente com a avaliação do peso, são indicativos importantes quanto a possível toxicidade da amostra (Almeida et al., 1999). Os resultados que encontramos indicam o pouco cuidado na descrição da forma de avaliação os sinais de toxicidade e sugerem a ausência de preocupação com a descrição da ordem de avaliação dos animais. Como vários desses parâmetros são analisados de forma subjetivas e dependem da experiência do observador, portanto, é

fundamental que seja empregado o cegamento (analisado no Tema 2) dessas análises a fim de que avaliador não trabalhe sugestionado por um resultado específico (Festing e Altaman, 2002).

É fundamental também que o bem-estar dos animais esteja garantido e as condições de manutenção estejam de acordo com os cuidados estabelecidos internacionalmente com animais para que o estresse não seja um viés nessa análise (National Research Council, 2011). Além das preocupações com os cuidados com a administração da amostra, tais como dose, formulações e vias de administração utilizadas, que podem causar dor e danos aos animais que não indicam toxicidade (Svendsen, 2005).

A última análise que realizamos quanto à descrição dos procedimentos da avaliação da toxicidade diz respeito a coleta de sangue e a coleta de órgãos, e quais análises foram realizadas com esses materiais. Na análise geral, verificamos que a maioria dos métodos não descreveu a coleta de sangue (58,1%) e anestesia para coleta de sangue (76,3%). Dentre os artigos que relataram coleta de sangue, a amostra de sangue foi descrita como utilizada para avaliação bioquímica (92,8%) e hematológica (75,9%) sendo que apenas 4,8% dos métodos descreveram a utilização da amostra de sangue para análise de frequência de micronúcleo. Em relação, a anestesia para eutanásia, a maioria (69,7%) não descreveu a realização da mesma. Já a coleta de órgãos não foi descrita pela maioria (65,2%); dentre os métodos que descreveram a coleta de órgãos, estes foram descritos como objeto de avaliação histopatológica pela totalidade (100%) enquanto apenas 1,4% dos métodos descreveram a utilização dos órgãos para análise de frequência de micronúcleo (Tabela 15).

Tabela 15- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto a manuseio experimental na coleta de sangue e órgãos-Análise geral (n = 198)

Descrição Item	Total	
	Sim	Não
Coleta de sangue	83	115
Anestesia para coleta de sangue	47	151
Anestesia para eutanásia	60	138
Coleta de órgãos	69	129

Questionamento empregado: Foi realizada coleta de sangue? Os animais foram anestesiados para coleta de sangue? A amostra de sangue foi usada para qual avaliação? Os animais foram anestesiados para eutanásia? Foi realizada coleta de órgãos? A amostra de órgão foi usada para qual avaliação?

Em suma, quanto a análise geral, podemos concluir que na avaliação de parâmetros toxicológicos, a maioria dos métodos descreveu realizar a avaliação de sinais clínicos, porém, a maioria não descreveu a avaliação e a frequência de peso, de consumo de ração e água, bem como a coleta de sangue e órgãos.

Na Tabela 16, demonstramos a descrição do manuseio experimental nos métodos de toxicidade aguda. Pudemos verificar que a maioria não descreveu a coleta de sangue, a anestesia para coleta de sangue, a anestesia para eutanásia ou a coleta de órgãos. Quando foi descrito a coleta de sangue, estas amostras foram descritas majoritariamente como destinadas a testes bioquímicos (88,2%) e hematológicos (58,8%) e apenas 11,8% descreveram a utilização da amostra de sangue para análise de frequência de micronúcleo. Quanto à coleta de órgãos, considerando-se apenas aqueles métodos que a descreveram (13,5%), os órgãos foram descritos como avaliados por histopatologia em todos método e apenas 5,9% descreveram a utilização de órgãos coletados para avaliação de micronúcleo. Assim, os métodos de toxicidade aguda seguiram a mesma descrição de parâmetros da análise geral, ou seja, o único parâmetro descrito na maioria dos métodos foi a avaliação dos sinais clínicos da toxicidade.

Tabela 16 - Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto a manuseio experimental na coleta de sangue e órgãos - Toxicidade Aguda (n = 126).

Descrição Item	Total	
	Sim	Não
Coleta de sangue	17	109
Anestesia para coleta de sangue	11	115
Anestesia para eutanásia	23	103
Coleta de órgãos	17	109

Questionamento empregado: Foi realizada coleta de sangue? Os animais foram anestesiados para coleta de sangue? A amostra de sangue foi usada para qual avaliação? Os animais foram anestesiados para eutanásia? Foi realizada coleta de órgãos? A amostra de órgão foi usada para qual avaliação?

Os parâmetros de manuseio experimental analisados para o método de toxicidade subaguda estão resumidos na Tabela 17. A maioria descreveu a coleta de sangue (87,7%), porém a maioria não descreveu a utilização de anestesia para coleta de sangue (54,3%) o que, em números absolutos, representou uma diferença de dois métodos. Quanto a anestesia para eutanásia, 18 métodos descreveram enquanto 17 não. Já a coleta de órgão foi descrita por 19 método que descreveram a avaliação histopatológica (100%) dos órgãos retirados. Ainda, dentre os métodos que descreveram coleta de sangue (30 métodos), a maioria descreveu a utilização da amostra de

sangue em testes bioquímicos (93%) e hematológicos (80%). Em síntese, para métodos de toxicidade subaguda, os parâmetros toxicológicos descritos pela maioria foram avaliação dos sinais clínicos de toxicidade, avaliação do peso corporal e as coletas de sangue e de órgãos.

Tabela 17 - Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto a manuseio experimental na coleta de sangue e órgãos - Toxicidade Subaguda (n = 35)

Descrição Item	Total	
	Sim	Não
Coleta de sangue	30	5
Anestesia para coleta de sangue	16	19
Anestesia para eutanásia	17	18
Coleta de órgãos	19	16

Questionamento empregado: Foi realizada coleta de sangue? Os animais foram anestesiados para coleta de sangue? A amostra de sangue foi usada para qual avaliação? Os animais foram anestesiados para eutanásia? Foi realizada coleta de órgãos? A amostra de órgão foi usada para qual avaliação?

Já quanto aos métodos de toxicidade subcrônica, a maioria dos métodos descreveu procedimentos para coleta de sangue, anestesia para coleta de sangue, anestesia para eutanásia e coleta de órgãos. Considerando apenas os parâmetros menos reportados (anestesia para coleta de sangue e eutanásia) a diferença, em números absolutos, entre os métodos que descreveram e os que não descreveram foi de apenas 2 método. Quanto a análise sanguínea, 93,9% realizaram a avaliação bioquímica e 84,8% avaliação hematológica, enquanto a análise histopatológica dos órgãos coletados foi descrita em 100% dos métodos (Tabela 18). Assim, os parâmetros de avaliação toxicológica descritos pela maioria dos métodos de toxicidade subcrônica foram avaliação de sinais clínicos, avaliação do peso corporal, coleta de sangue e órgãos para análises.

Tabela 18 - Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto a manuseio experimental na coleta de sangue e órgãos- Toxicidade Subcrônica (n = 34).

Descrição Item	Total	
	Sim	Não
Coleta de sangue	33	1
Anestesia para coleta de sangue	18	16
Anestesia para eutanásia	18	16
Coleta de órgãos	30	4

Questionamento empregado: Foi realizada coleta de sangue? Os animais foram anestesiados para coleta de sangue? A amostra de sangue foi usada para qual avaliação? Os animais foram anestesiados para eutanásia? Foi realizada coleta de órgãos? A amostra de órgão foi usada para qual avaliação?

Finalmente, quanto ao manuseio experimental dos métodos de toxicidade crônica (Tabela 19), todos os 3 métodos analisados descreveram a realização de coleta de sangue e de órgãos, porém apenas 1 métodos não descreveu anestesia para coleta de sangue e para eutanásia. Todos métodos descreveram a realização de testes bioquímicos com a amostra de sangue e 1 descreveu a realização de teste hematológico; ainda, todos relataram a realização de avaliação histopatológica dos órgãos. Como também observado para os demais métodos que avaliaram o efeito de doses repetidas da amostra, nos métodos de avaliação da toxicidade crônica a maioria descreveu a avaliação dos sinais clínicos, de peso corporal, coleta de sangue e coleta de órgãos para as respectivas análises.

Tabela 19- Frequência de relato (em números absolutos) da descrição quanto a manuseio experimental na coleta de sangue e órgãos- Toxicidade Crônica (n=3)

Descrição Item	Total	
	Sim	Não
Coleta de sangue	3	0
Anestesia para coleta de sangue	2	1
Anestesia para eutanásia	2	1
Coleta de órgãos	3	0

Questionamento empregado: Foi realizada coleta de sangue? Os animais foram anestesiados para coleta de sangue? A amostra de sangue foi usada para qual avaliação? Os animais foram anestesiados para eutanásia? Foi realizada coleta de órgãos? A amostra de órgão foi usada para qual avaliação?

4.4 Considerações sobre levantamento bibliográfico da análise toxicológica de plantas medicinais

Para este levantamento sistemático foram definidos 3 temas, os quais foram subdivididos em subitens. Assim, na Tabela 20, o tema 1 foi apresentado na forma de 14 subitens, enquanto o tema 2 foi subdividido em 9 subitens e, por último, para o tema 3 foram identificados 17 subitens.

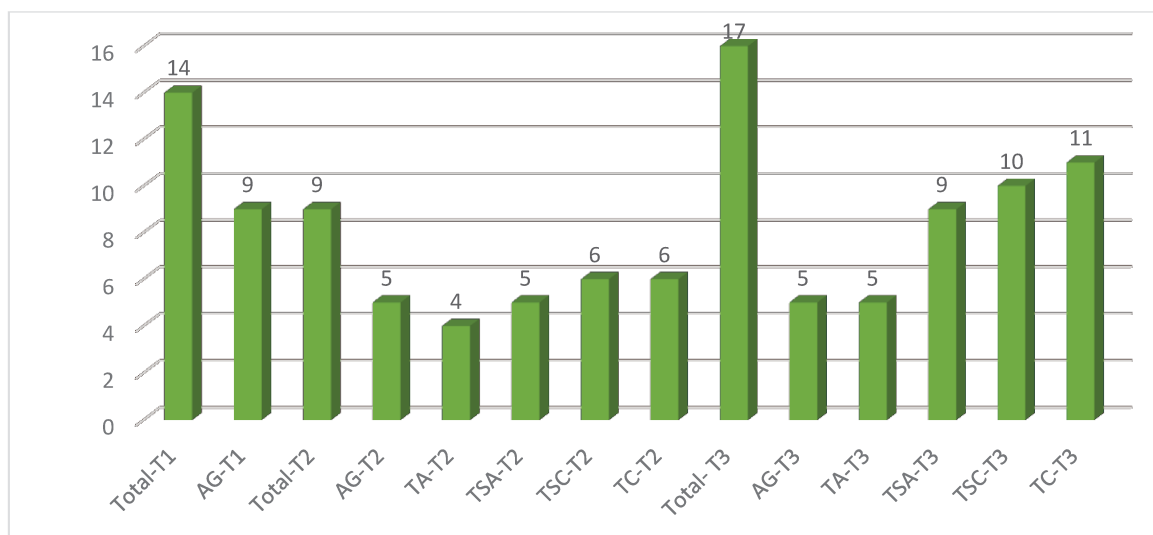
Tabela 20- Temas, itens e subitens analisados nos método de toxicidade no estudo de segurança de plantas medicinais

Tema	Item	Subitem
Tema 1 - Animais, condições de manutenção e declaração ética	1 - Identificação dos animais	a- Sexo
		b- Linhagem
		c- Idade
		d- Peso
	2 - Condições de manutenção dos animais	a- Ambientação
		b- Tipo de alimentação
		c- Frequência de alimentação
		d- Ciclo de luz
		e- Temperatura
	3 - Declaração Ética	f- Qualidade da água
g- Acesso a água		
h- Enriquecimento Ambiental		
a- Apresentação de aprovação		
b- Apresentação do número de aprovação		
Total de subitens		14
Tema 2 - Desenho experimental da avaliação toxicológica	1 - Plano de estudo	a- Existiu grupo experimental
		b- Número de grupos experimentais
		c- Grupo controle
		d- Randomização (cita)
		e- Randomização (descreve)
		f- Cegamento
	2 - Tamanho da amostra	a- Número total de animais usados em cada experimento
		b- Número de animais em cada grupo experimental
		c- Cálculo estatístico para definição do número da amostra
		Total de subitens
Tema 3 - Procedimentos experimentais e análise da avaliação toxicológica	1 - Diretrizes	a- Utilização de diretrizes OECD
	2 - Amostra	a- Doses
		b- Formulações
		c- Via de administração
		d- Frequência de tratamento
		e- Cálculo da DL50
		a- Sinais e sintomas observados
	3 - Sinais clínicos, avaliação do peso, consumo de água e ração	b- Ordem usada para tratar
		c- Ordem usada para observar
		d- Avaliação do peso
		e- Frequência da avaliação do peso
		f- Consumo de ração
	4 - Manuseio experimental dos animais	g- Consumo de água
		a- Coleta de sangue
		b- Anestesia para coleta de sangue
		c- Anestesia para eutanásia
d- Coleta de órgãos		
Total de subitens		17

Com base nessa divisão, representamos graficamente quais os subitens, dentro de cada tema, que foram relatados na maioria dos métodos analisados ($n = 153$). Assim, para o tema 1, pudemos verificar que 9 dos 14 subitens analisados foram descritos pela maioria dos artigos, sendo eles apresentação da declaração ética, características relacionadas aos animais (sexo, linhagem e peso) e condições de manutenção (aclimação ao biotério, frequência de alimentação, acesso a água, ciclo de luz e temperatura) (Figura 10).

Já para os temas 2 e 3, pudemos fazer a análise tanto geral quanto por métodos de toxicidade. Desta forma, na análise geral ($n = 198$ métodos) do tema 2, 5 dos 9 subitens analisados foram descritos na maioria das vezes, sendo eles existência de grupos experimentais, número de grupos de animais experimentais, grupos controle, número total de animais por experimento e número total de animais em cada grupo experimental (Figura 10).

Figura 10 – Número de subitens em cada tema analisado, e suas respectivas descrições (Análise geral e por métodos individual de toxicidade)



Em relação ao tema 1: Total T1: Total do Tema 1; AG-T1: Análise geral-Tema 1;

Em relação ao tema 2: Total T2: Total-Tema 2; AG-T2: Análise Geral-Tema 2; TA-T2: Toxicidade Aguda- Tema 2; TSA-T2: Toxicidade Subaguda-Tema2; TSC-T2: Toxicidade Subcrônica-Tema 2; TC-T2: Toxicidade Crônica-Tema 2;

Em relação ao tema 3: Total-T3: Total do Tema 3; AG-T3: Análise Geral-Tema 3; TA-T3: Toxicidade Aguda-Tema 3; TSA-T3: Toxicidade Subaguda-Tema 3; TSC-T3: Toxicidade Subcrônica-Tema 3; TC-T3: Toxicidade Crônica-Tema 3.

Considerando-se a análise por métodos individual, para os métodos de toxicidade aguda ($n = 126$), 4 subitens foram descritos na maioria das vezes (existência de grupos experimentais, número de grupos de animais experimentais, número total de animais por experimento e número de animais em cada grupo experimental). Já nos métodos de toxicidade subaguda ($n = 35$), 5 subitens foram descritos na maioria das vezes (existência de grupo experimental, número de grupos de animais experimentais, grupos controle, número total de animais por experimento e número total de animais em cada grupo experimental) (Figura 10).

E por fim, para os métodos de toxicidade subcrônica ($n = 34$) e crônica ($n = 3$), 6 dos 9 subitens foram descritos na maioria das vezes (existência de grupos experimentais, número de grupos de animais experimentais, grupos controle, citação de randomização, número total de animais por experimento e número total de animais em cada grupo experimental) (Figura 10).

Por sua vez, em relação ao tema 3, dos 17 subitens analisados, tanto na análise geral ($n = 198$) quanto nos métodos de toxicidade aguda ($n = 126$), 5 subitens (método baseado nas diretrizes OECD, dose, vias de administração, frequência de tratamento e avaliação dos sinais clínicos) foram relatados na maioria das vezes. Já para o método de toxicidade subaguda ($n = 35$), 9 subitens (métodos baseados nas diretrizes OECD, dose, vias de administração, frequência de tratamento, avaliação dos sinais clínicos, avaliação do peso, frequência da avaliação de peso, coleta de sangue e coleta de órgãos) foram descritos na maioria das vezes. Enquanto para o método de toxicidade subcrônica ($n = 34$), 10 subitens (dose, vias de administração, frequência de tratamento, avaliação dos sinais clínicos, avaliação do peso, frequência da avaliação de peso, coleta de sangue, anestesia para coleta de sangue, anestesia para eutanásia, coleta de órgãos) foram descritos na maioria das vezes. Finalmente, considerando-se os métodos de toxicidade crônica ($n = 3$), 11 subitens (métodos baseados nas diretrizes OECD, dose, vias de administração, frequência de tratamento, avaliação dos sinais clínicos, avaliação do peso, frequência da avaliação de peso, coleta de sangue, anestesia para coleta de sangue, anestesia para eutanásia, coleta de órgãos) foram descritos na maioria das vezes (Figura 10).

Desta forma, mesmo com mais da metade dos subitens descritos, há subitens importantes referentes ao tema 1 que ainda não estão sendo descritos, tais como, número de aprovação no comitê de ética, idade, tipo de alimentação, qualidade da água e enriquecimento ambiental. Os métodos de toxicidade aguda foram os que apresentaram os relatos mais deficientes, com maior ausência de subitens importantes tanto para tema 2 quanto para tema 3, em comparação

com os outros métodos de toxicidade que avaliaram exposição crônica. Para estes métodos, a maioria dos subitens foram descritos tanto para tema 2 como para tema 3, o que equivale a mais da metade dos subitens analisados. Porém, para os métodos ainda verificamos falhas na descrição, principalmente, de ferramentas para diminuir o viés dos estudos, descrições importantes quanto a amostra e parâmetros de acompanhamento dos animais.

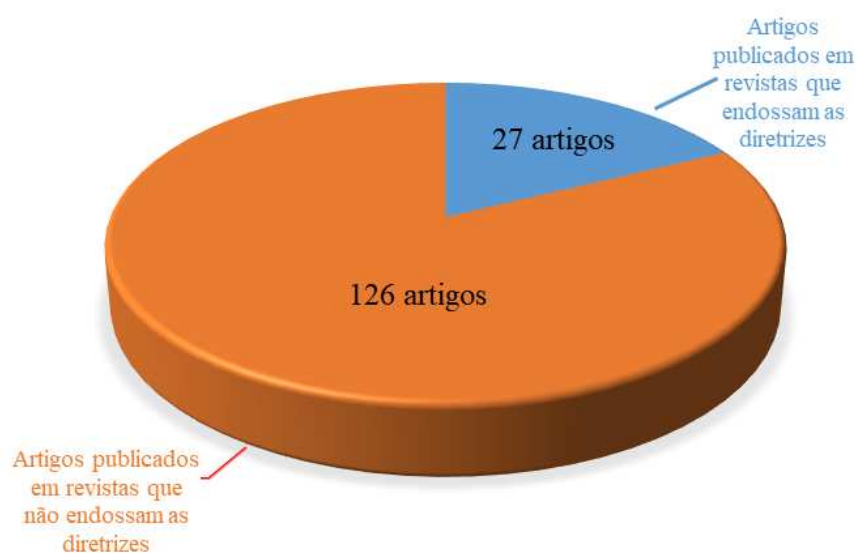
Em suma, nunca é demais lembrar que artigos científicos devem reportar informações relevantes sobre objetivos, métodos, características dos animais e resultados obtidos para que seja possível tanto a realização de uma avaliação crítica dos resultados publicados quanto a reprodução dos métodos descritos (Kilkenny et al., 2009). Esses cuidados refletem a preocupação com os animais e a implementação do conceito dos 3Rs deixados por Russell e Burch na prática experimental.

Como não seria possível, dentro das limitações de tempo disponível, avaliar toda a amostra obtida em nosso levantamento utilizando-se todos os itens das diretrizes ARRIVE, decidimos enfatizar o item “material e métodos” considerando a descrição desse item em artigos sobre a análise de toxicidade de plantas medicinais. Com relação a dados de levantamento semelhantes já publicados, nossos dados conferem com o que se vê na sociedade científica sobre a questão da baixa reprodutibilidade dos dados, em parte, em função de problemas na descrição dos estudos realizados. É interessante pontuar ainda que a preocupação com a baixa reprodutibilidade na pesquisa já aparecia em estudos da década de 1990 (McCance, 1995; Smith et al., 1997) indicando que o problema não é atual. Desde então, diversas estratégias e ferramentas têm sido propostas para melhorar esse quadro.

Atualmente, segundo a NC3Rs, as diretrizes foram endossadas por mais de mil periódicos, financiadores e institutos de pesquisa. É possível verificar quais periódicos que endossam as diretrizes no site da NC3Rs (NC3Rs, 2018)(<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-animal-research-reporting-vivo-experiments>). Porém, de acordo com NC3Rs, ainda há evidências limitadas quanto a melhoria na qualidade do relato em publicações de pesquisas com animais, por isso, as diretrizes estão passando por revisão. O objetivo dessa revisão é acelerar a adesão, além de priorizar os itens das diretrizes organizando os em diferentes níveis de prioridade, como também, será desenvolvido um documento de explicação e elaboração das mesmas, apresentando informações quanto as definições para termos técnicos, e exemplos de como reportar os itens, melhorando assim, a clareza das informações contidas nas diretrizes (Sert et al., 2018).

Em nosso levantamento sistemático, da amostra total de artigo ($n = 153$), verificamos que a minoria deles ($n = 27$ artigos) estavam publicados em revistas que endossam as diretrizes, enquanto a maioria ($n = 126$ artigos) foram publicados em revistas que não endossam as diretrizes ARRIVE, conforme a lista disponível no site da NC3Rs. E apenas um artigo mencionou utilizar as diretrizes ARRIVE no item “materiais e métodos” (Figura 11).

Figura 11- Representação dos artigos encontrados em revistas que endossam e não endossam as diretrizes ARRIVE ($n = 153$)



Por fim, os testes que avaliam a toxicidade de plantas medicinais *in vivo* são fundamentais, pois permitem estabelecer doses efetivas dentro dos limites de segurança para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos. Além disso, permitem verificar se as plantas utilizadas pela população com base em conhecimentos etnobotânicos são realmente seguras e se as exposições repetidas a todas as substâncias presentes nessas espécies vegetais possam causar o aparecimento de danos por efeito acumulativo.

Assim, a descrição completa de todos os detalhes avaliados nos métodos de toxicidade, tais como sinais e sintomas observados, consumo de ração/água, peso, condição inicial dos animais e quais foram as análises realizadas com cada uma das amostras coletadas, são fundamentais tanto para que outros pesquisadores possam comparar a toxicidade da mesma planta em estudo quanto para a transposição dos achados pré-clínicos para futuros estudos clínicos. A repetição de estudos

de toxicidade de uma determinada planta pode se fazer necessária durante a etapa de padronização da matéria prima. Isto por que claramente o ambiente no qual as plantas se desenvolvem molda sua composição química; essas alterações podem levar ao aparecimento de efeitos tóxicos que não haviam sido reportados quando a planta foi cultivada em condições diferentes.

5- CONCLUSÃO

Na amostra selecionada para este estudo, artigos sobre avaliação de toxicidade de plantas medicinais publicados em 2017, evidenciamos que aspectos éticos (aprovação por comitê de ética) ainda são reportados de maneira incompleta, assim como a descrição dos animais; neste último caso, a idade dos animais é o item mais omitido, além da incompleta descrição das medidas para redução de viés, e características da análise toxicológica. Com relação à totalidade dos itens avaliados, as maiores falhas de descrição estiveram associadas aos métodos de curta duração (aguda) com melhora gradual, porém não completa, na descrição à medida em que os estudos tinham uma duração mais longa. Provavelmente, um método com maior tempo duração possibilita e requer do pesquisador maior atenção aos detalhes experimentais o que se reflete em uma escrita um pouco mais cuidadosa.

Nossos resultados indicam que, no relato dos métodos de testes de toxicidade, enquanto alguns dados são bem descritos, outros ainda são reportados de maneira incompleta. Essas deficiências podem tanto comprometer a reprodutibilidade dos resultados quanto a transposição dos dados em animais para o uso em humanos, reforçando a necessidade de medidas para melhorar a redação científica.

Assim, esforços ainda são necessários tanto para divulgar as ferramentas auxiliares da escrita científica, como as diretrizes ARRIVE, quanto para sensibilizar os pesquisadores, em todo mundo, para as vantagens de uma ciência divulgada em todos os seus detalhes.

REFERÊNCIAS¹

Alfaro V. Specification of laboratory animal use in scientific articles: Current low detail in the journals' instructions for authors and some proposals. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2005 Set; 27(7):495.

Almeida RN, Falcão ACGM, Diniz RST, Quintans-Júnior LJ, Polari RM, Barbosa-Filho JM, et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. *Rev Bras Farm*. 1999. 80(3/4):72-76.

Andreollo NA, Santos EF, Araujo MR, Lopes LR. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? *Arq Bras Cir Dig* [internet] 2012; [acesso 2019 Mai 15] 25(1):49–51. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-67202012000100011&script=sci_abstract&tlng=es

Avey MT, Moher D, Sullivan KJ, Fergusson D, Griffin G, Grimshaw JM, et al. The Devil Is in the Details: Incomplete Reporting in Preclinical Animal Research. *PLOS ONE* [internet] 2016; [acesso 2019 Mai 15] 11(11):e0166733. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5113978/>

Baker M. Editorial: 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature* [Internet]. 2016; [acesso 2019 Mar 21] 533(7604):452–4. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/533452a>

Bandeira F, Lent R, Herculano-Houzel S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* [internet] 2009; [acesso 2019 Mai 15] 106(33):14108–139. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2729028/>

Baran KP. Toxicity Testing, Behavioral. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of Toxicology*. 3.ed.[S.l.]:Elsevier 2014. p.643-646.

Barros SBM, Davino SC. Avaliação da Toxicidade. In: Oga S, Camargo MMA, Batostuzzo JA, *Fundamentos de Toxicologia*. 3rd ed. São Paulo: Atheneu Editora; 2008. p. 59–70.

Botham PA. Acute systemic toxicity--prospects for tiered testing strategies. *Toxicol In Vitro*. 2004 Abr; 18(2):227-30.

¹ De acordo com as normas da UNICAMP/FCF, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Braga FC, Rates SMK, Simões CMO. Avaliação da eficácia e segurança de produtos naturais candidatos a fármacos e medicamentos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Mello JCPM, Auler L, Petrovick PR. Farmacognosia do produto natural ao medicamento. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 53–68.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de utilização de animais/FIOCRUZ. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2008 [acesso 2019 Mai 15] 54p. Disponível em: http://www.castelo.fiocruz.br/vpplr/comissoes_camaras-tecnicas/Manual_procedimentos.pdf

Brasil. Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia - GESEF. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2013 [acesso 2019 Mai 12] 2a edição. 48p. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&101_assetEntryId=3274317&101_type=document

Brasil. Ministério da Saúde. Uso de plantas medicinais e fitoterápicos sobe 161% — 2016 [acesso 2019 Mar 26]. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161>

Butterweck, V.; Nahrstedt, A. What Is the Best Strategy for Preclinical Testing of Botanicals? A Critical Perspective. *Planta Med.* [internet] 2012; [acesso 2019 Mai 14] 78(08):747–754. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0031-1298434>

Campos AS, Diaz BL, Rivera EAB, Granjeiro JM, Braga LMGM, Frajblat M, et al. editores. Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: fascículo 12: estudos conduzidos com animais domésticos mantidos fora de instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. 2015 [internet]; [acesso 2019 Mai 16]. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/14259>

Chan PPK, Kruger CL, Hayes AW. Toxicity, Acute. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of Toxicology*. 3.ed.[S.l.]:Elsevier 2014. p.617–625.

Corrêa CL, Alonzo HGA, Trevisan RMS. Avaliação de risco. In: Oga S, Camargo MMA, Batostuzzo JAO. *Fundamentos de toxicologia*. 3 eds. São Paulo: Atheneu Editora, 2008. 71-79p.

Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*. [Internet]. 2013; [acesso 2019 May 3]; 1830(6):3670–95. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3672862/>

Cressey D. Surge in support for animal-research guidelines. *Nature* [internet] 2016; [acesso 2019 Mai 5]. Disponível em: <https://www.nature.com/news/surge-in-support-for-animal-research-guidelines-1.19274>

Deguchi BGF, Tamioso PR; Molenti CFM. Percepção de equipes laboratoriais quanto a questões de bem-estar animal. *Arq Bras Med Vet Zootec* [internet] 2006; [acesso 2019 Mai 1] 68(1):48–56. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010209352016000100048&script=sci_abstract&tlng=pt

Denny KH, Stewart CW. Acute, Sub-Acute, Sub-Chronic and Chronic General Toxicity Testing for Preclinical Drug Development In: Faqi AS, editor. *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*. 2a edição[S.l.] Elsevier 2013. p.87-105

European Commission. Seventh Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union; 2013 [acesso 2019 Mai 5]. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52013DC0859&from=EN>

Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirurgica Brasileira* [internet] 2004; [acesso 2018 Ago 18] 19(1):59-65. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502004000100010&script=sci_abstract

Feijó AGS. A função dos comitês de ética institucionais ao uso de animais na investigação científica e docência. *Revista Bioética*, [internet] 2009; [acesso 2019 Mai 6] 12(2):11–22. Disponível em: http://revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista_bioetica/article/view/131.

Festing MFW, Altaman DG. Guidelines for the Desenho and Statistical Analysis of Experiments Using Laboratory Animals. *ILAR J* [internet] 2002; [acesso 2019 Mai 1] 43(4):244–258. Disponível em: <https://academic.oup.com/ilarjournal/article/43/4/244/981872>

Freedman LP, Cockburn IM, Simcoe TS. The Economics of Reproducibility in Preclinical Research. *PLOS Biol*. [Internet] 2015. [acesso 2019 Mar 28] 13(6):e1002165. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1002165>

Fu Y, Rusznák Z, Herculano-Houzel S, Watson C, Paxinos G. Cellular composition characterizing postnatal development and maturation of the mouse brain and spinal cord. *Brain Struct Funct*. 2013 Set; 218(5):1337–1354

Gupta SA. Study to assess the methodological quality of in vivo animal experiments published in Indian journal of pharmacology: A retrospective, cross-sectional, observational study. *Indian J Pharmacol* [internet] 2019; [acesso 2019 Abr 30] 51(1):11-16. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6444832/>

Heinrich M. Ethnopharmacology in the 21st century - grand challenges. *Front Pharmacol*. [internet]. 2010; [acesso 2019 May 3] 1(8): PII: PMC3112271 PubMed PMID: 21713103. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3112271/>

Hooijmans CR, Vries RBM, Ritskes-Hoitinga M, Rovers MM, Leeflang MM, IntHout J, et al. Facilitating healthcare decisions by assessing the certainty in the evidence from preclinical animal studies. *PLoS ONE* [internet] 2018; [acesso 2018 Jan 11] 13(1): e0187271. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5764235/>

Hulla JE, Navarro L, Kruger CL, Hayes AW. Toxicity, Subchronic and Chronic. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of Toxicology*. 3.ed.[S.l.]:Elsevier 2014. p.626-633.

International Conference on Harmonisation ICH. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human use of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use ich. Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals. [internet] 2000; [acesso 2019 Mai 15] Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7A/Step4/S7A_Guideline.pdf

Jackson SJ, Andrews N, Ball D, Bellantuono I, Gray J, Hachoumi L, et al. Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes. *Lab Anim* [internet] 2017; [acesso 2019 Fev 26] 51(2):160–169. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5367550/>

Jütte R, Heinrich M, Helmstädter A, Langhorst J, Meng G, Niebling W, et al. Herbal medicinal products – Evidence and tradition from a historical perspective. *J Ethnopharmacol* [internet] 2017 [acesso 2019 May 15] 207:220–5. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887411731019X?via%3Dihub>

Kilkenny C, Parson N, Festing MFW, Cuthill IC, Fry D, et al. Survey of the Quality of Experimental Desenho , Statistical Analysis and Reporting of Research Using Animals. PLoS ONE [internet] 2009; [acesso 2019 fev 27] 4(11): e7824. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0007824>

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. PLoS Biol.[Internet] 2010; [acesso 2019 Feb 27] 8(6):e1000412. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1000412>

Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Godinho RO, Nogueira TCML. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. IN: Simões CMO, Shenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/Ed.da UFSC; 2010 p. 246-262

Larini L. Toxicologia. 3.ed. São Paulo: Editora Manole; 1997.

Leung V, Rousseau-Blass F, Beauchamp G, Pang DSJ. ARRIVE has not ARRIVED: Support for the ARRIVE (Animal Research: Reporting of in vivo Experiments) guidelines does not improve the reporting quality of papers in animal welfare, analgesia or anesthesia. PLOS ONE [internet] 2018; [acesso 2019 Mar 28] 13(5):e0197882, Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5967836/>

Liu Y, Zhao X, Mai Y, Li X, Wang J, Chen L, et al. Adherence to ARRIVE Guidelines in Chinese Journal Reports on Neoplasms in Animals. PLOS ONE [internet] 2016; [acesso 2019 Mai 15] 11(5):e0154657. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4868299/>

McCance I. Assessment of statistical procedures used in papers in the Australian Veterinary Journal. Aust Vet J. 1995 Set; 72(9):322–329.

McChesney JD, Venkataraman SK, Henri JT. Plant natural products: Back to the future or into extinction? Phytochemistry. 2007 Jul; 68(14):2015–2022.

Nam MH, Chun MS, Seong JK, Kim HG, et al. Ensuring reproducibility and ethics in animal experiments reporting in Korea using the ARRIVE guideline. Lab Anim Res[internet] 2018; [acesso 2019 Mai 15] 34(1):11-19. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5876159/>

National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research-NC3Rs. Reino Unido [acesso 2019 Fev 27]. <https://www.nc3rs.org.uk/>

National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research-NC3Rs. ARRIVE: Animal Research Reporting In Vivo Experiments. Reino Unido 2018; [acesso 2019 Mai 20]. Disponível em: <https://www.nc3rs.org.uk/revision-arrive-guidelines>.

National Research Council (US)- Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington: National Academies Press (US) 2011; [acesso 2019 Mai 15. 246p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>

Neves MPN, Filho JM, Menezes EW, editores. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013 [acesso 2019 Mai 14] 216p. Disponível em: <http://www.fo.usp.br/wp-content/uploads/Manual-Cuidados-com-Animais.pdf>

Newberne, P. M. Influence of pharmacological experiments of chemicals and other factors in diets of laboratory animals. Fed Proc. 1975 Fev; 34(2):209–18.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. J Nat Prod. 2003 Jul; 66(7):1022-37.

Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. J Nat Prod. [internet] 2016; [acesso 2019 Mai 23] 79(3):629-61. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

OECD. Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico. Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. Paris: OECD; 2001 [acesso 2019 Mai 12]. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/fedddocs/oecd/oecd-gd24.pdf>

OECD. Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico. Guideline 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris: OECD; 2008a [acesso 2019 May 3]; Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en

OECD. Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico. Guideline 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP). Paris: OECD; 2008b [acesso 2019 Mai 3]; Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071049-en.pdf?expires=1556926042&id=id&accname=guest&checksum=6F5BB460C8A65FF09501289B863AA3EA>

OECD. Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico. Guideline 408: Guideline for the testing of chemicals: Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents. Paris: OECD; 2018a [acesso 2019 Mai 3]; Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070707-en

OECD. Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico. Guideline 452: Chronic Toxicity Studies. Paris: OECD; 2018b [acesso 2019 Mai 3]; Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-452-chronic-toxicity-studies_9789264071209-en

Oliveira GM, Bruck MA, Martins TVA. Enriquecimento ambiental: Qual a melhor forma de utilização de enriquecimento ambiental para camundongos em biotério?. 1ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2018. p. 120.

Pereira MG. Pesquisa e comunicação científica. In: Pereira MG. Artigos científicos como redigir publicar e avaliar. 1ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p.1-6.

Prinz F, Schlange T, Asadullah K. Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets? [letter to the editor]. Nature Reviews Drug Discovery. 2011 Aug; [acesso 2019 maio 3] 10(9):712–712. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd3439-c1>

Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang's & Dale's-Farmacologia. 8th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.

Reichlin TS, Vogt L, Würbel H. The Researchers' View of Scientific Rigor—Survey on the Conduct and Reporting of In Vivo Research. PLOS ONE [internet] 2016; [acesso 2019 Mai 5] 11(12):e0165999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5135049/>

Ryabinin AE, Wang YM, Finn DA. Different levels of Fos immunoreactivity after repeated handling and injection stress in two inbred strains of mice. Pharmacol Biochem Behav. 1999 Mai; 63(1):143–51.

Rocha JA, Boscolo OH, Fernandes LRRMV. Etnobotânica: um instrumento para valorização e identificação de potenciais de proteção do conhecimento tradicional. *Interações* [internet]. 2015; [acesso 2019 May 3];16(1):67–74. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1518-70122015000100006&script=sci_abstract&tlng=pt

Russell WMS, Burch RL, The Principles of Humane Experimental Technique by W.M.S. [Internet] London, Methuen; 1959 [acesso 2019 Mar 26]. Disponível em: http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc

Saad GA, Léda PHO, Sá IM, Seixlack ACC. *Fitoterapia contemporânea- Tradição e Ciência na Prática Clínica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2018.

Samsa G, Samsa L. A Guide to Reproducibility in Preclinical Research. *Acad Med* [Internet] 2019; [acesso 2019 Mar 21]; 94(1):47–52. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29995667>

Sena ES, Currie GL, McCann SK, Malcolm MR, Howells DW. Systematic reviews and meta-analysis of preclinical studies: Why perform them and how to appraise them critically. *J Cereb Blood Flow Metab* [internet]. 2014; 34(5):737–42. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2014.28>

Sert NP, 1 Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Altman DG, Avey MT et al. Revision of the ARRIVE guidelines: rationale and scope [position paper]. *BMJ Journals* [internet] 2018; [acesso 2019 Mai 15] 2(1):1-4. Disponível em: <https://openscience.bmj.com/content/2/1/e000002#ref-4>

Silla VCB, SANS ECO, Molento CFM. An estimation of the extent of animal use in research in Brazil, as determined by bibliographic sampling from journals published in the State of Paraná. *Alternatives to laboratory animals. ATLA* [internet] 2010; [acesso 2019 Mai 5] 38(1):29–37. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/026119291003800110>

Silveira PFS, Bandeira MAM, Arrais PSD. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Rev Bras Farmacogn* [internet] 2008; [acesso 2019 Mai 14] 18(4):618–626. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000400021

Smith JA, Birke L, Sadler D. Reporting animal use in scientific papers. *Lab Anim.* [internet] 1997; [acesso 2019 Mai 15] 31(4):312–317. Disponível em:
<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1258/002367797780596176>

Smith AJ, Clutton RE, Lilley E, Hansen KEA, Brattelid T. PREPARE: guidelines for planning animal research and testing. *Lab Anim.*[internet] 2018; [acesso 2019 Fev 15] 52(2):135–141. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5862319/>

Soares PB, Carneiro TCJ, Calmon JL, Castro LOCO. Análise bibliométrica da produção científica brasileira sobre Tecnologia de Construção e Edificações na base de dados Web of Science. *Ambiente Construído* [internet] 2016; [acesso 2019 Mai 12] 16(1):175–185. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S167886212016000100175&script=sci_abstract&tlng=pt

Souza VHS. Avaliação da toxicidade não clínica de extrato e vouacapanos oriundos dos frutos da espécie *Pterodon pubescens* Benth [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2017

Svensden O. Ethics and Animal Welfare Related to in vivo Pharmacology and Toxicology in Laboratory Animals [letter to the editor] *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*[internet] 2005 Sep;[acesso 2019 Mai 14] 97:197-199. Disponível em:
https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_letter_974.x

Taylor K, Gordon N, Langley G, heggins W. Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005. *Alternatives to laboratory animals.* ATLA, [internet] 2008; [acesso 2019 Mai 5] 36(3):327–42. Disponível em:
<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/026119290803600310>

Tillmann S. Editorial: Mind the gap – towards complete and transparent reporting of animal research. *Med Commun (N J).* 2017; 26(4):24–7

Turolla MSR, Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Rev Bras Ciências Farm* [internet] 2006; [acesso 2019 May 3] 42(2):289–306. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151693322006000200015&script=sci_abstract&tlng=pt

Valadares MC. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50. *Revista Eletrônica de Farmácia* [internet] 2006; [acesso 2019 Mai 12] 3(2):93-98. Disponível em:
<http://www.usp.br/bioterio/Artigos/Procedimentos%20experimentais/Alternativa.pdf>

Velardi A, Cooper MD. An immunofluorescence analysis of the ontogeny of myeloid, T, and B lineage cells in mouse hemopoietic tissues. *Journal of immunology*. 1984 Aug; 133(2):672–7

Vries RBM, Hooijmans CR, Langendam MW, Lijck JV, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, et al. A protocol format for the preparation, registration and publication of systematic reviews of animal intervention studies. *Evid Based Preclin Med* [internet] 2015; [acesso 2018 Ago 17] 2(1):e00007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ebm2.7>

Zenithson NG, Morse L, Albright J, Viera A, Souza M. Describing the Use of Animals in Animal-Assisted Intervention Research. *J Appl Anim Welf Sci*. 2018 Out; 8:1–13.

APÊNDICES

Apêndice 1: Estratégias de busca segundo a base de dados

Apêndice 1.A. Estratégia de busca realizada na Biblioteca Virtual em saúde (BVS)*

MeSH	DeCS	Estratégia por descritor
Plants, Medicinal	Plantas Medicinais	"Plants, Medicinal" OR "Plantas Medicinales" OR "Plantas Medicinais"
Plant Extracts	Extratos Vegetais	"Plant Extracts" OR "Extractos Vegetales" OR "Extratos Vegetais"
Toxicity Tests	Testes de Toxicidade	"Toxicity Tests" OR "Pruebas de Toxicidad" OR "Testes de Toxicidade"
Toxicity Tests, Subacute	Testes de Toxicidade Subaguda	"Toxicity Tests, Subacute" OR "Pruebas de Toxicidad Subaguda" OR "Testes de Toxicidade Subaguda"
Toxicity Tests, Subchronic	Testes de Toxicidade Subcrônica	"Toxicity Tests, Subchronic" OR "Pruebas de Toxicidad Subcrónica" OR "Testes de Toxicidade Subcrônica"
Toxicity Tests, Chronic	Testes de Toxicidade Crônica	"Toxicity Tests, Chronic" OR "Pruebas de Toxicidad Crónica" OR "Testes de Toxicidade Crônica"
Toxicity Tests, Acute	Testes de Toxicidade Aguda	"Toxicity Tests, Acute" OR "Pruebas de Toxicidad Aguda" OR "Testes de Toxicidade Aguda"

Estratégia final

(tw:((tw:("Plants, Medicinal" OR "Plantas Medicinales" OR "Plantas Medicinais" OR "Plant Extracts" OR "Extractos Vegetales" OR "Extratos Vegetais"))) AND (tw:("Toxicity Tests, Subacute" OR "Pruebas de Toxicidad Subaguda" OR "Testes de Toxicidade Subaguda" OR "Toxicity Tests, Subchronic" OR "Pruebas de Toxicidad Subcrónica" OR "Testes de Toxicidade Subcrônica" OR "Toxicity Tests, Chronic" OR "Pruebas de Toxicidad Crónica" OR "Testes de Toxicidade Crônica" OR "Toxicity Tests, Acute" OR "Pruebas de Toxicidad Aguda" OR "Testes de Toxicidade Aguda")))) AND (instance:"regional") AND (la:("en" OR "pt"))

*Reúne as bases de dados da área de saúde LILACS, MEDLINE, ADOLEC, BBO, BDENF, HISA, LEYES, MEDCARIB, REPIDISCA, OPAS, WHOLIS e DESASTRES.

Apêndice 1.B. Estratégia de busca na base de dados EMBASE

MeSH	Emtree
Plants, Medicinal	Medicinal plant
Plant Extracts	Plant Extract
Toxicity Tests, Subacute	Toxicity testing
Toxicity Tests, Subchronic	Toxicity testing
Toxicity Tests, Chronic	Toxicity testing
Toxicity Tests, Acute	Toxicity testing
Estratégia final	
('toxicity testing'/exp OR 'toxicity testing'/syn OR 'toxicity testing':ti,ab,kw) AND ('medicinal plant'/exp OR 'medicinal plant'/syn OR 'medicinal plant':ti,ab,kw OR 'plant extract'/exp OR 'plant extract'/syn OR 'plant extract':ti,ab,kw) AND (2017:py) AND ('article'/it OR 'article in press'/it) AND ([english]/lim OR [portuguese]/lim)	

Apêndice 1.C. Estratégia de busca na base de dados CAB DIRECT (continua)

MeSH	Sinônimos MeSH	CAB Thesaurus	Mesh + Sinônimos
Plants, Medicinal	Medicinal Plant Plant, Medicinal Medicinal Plants Pharmaceutical Plants Pharmaceutical Plant Plant, Pharmaceutical Plants, Pharmaceutical Healing Plants Healing Plant Plant, Healing Plants, Healing Medicinal Herbs Herb, Medicinal Medicinal Herb Herbs, Medicinal	Medicinal plants	"Plants, Medicinal" OR "Medicinal Plant" OR "Plant, Medicinal" OR "Medicinal Plants" OR "Pharmaceutical Plants" OR "Pharmaceutical Plant" OR "Plant, Pharmaceutical" OR "Plants, Pharmaceutical" OR "Healing Plants" OR "Healing Plant" OR "Plant, Healing" OR "Plants, Healing" OR "Medicinal Herbs" OR "Herb, Medicinal" OR "Medicinal Herb" OR "Herbs, Medicinal"
Plant Extracts Toxicity Tests, Subacute	Extracts, Plant Subacute Toxicity Test Test, Subacute Toxicity Tests, Subacute Toxicity Toxicity Test, Subacute Subacute Toxicity Tests	Plant Extracts Toxicity	"Plant Extracts" OR "Extracts, Plant" "Toxicity Tests, Subacute" OR "Subacute Toxicity Test" OR "Test, Subacute Toxicity" OR "Tests, Subacute Toxicity" OR "Toxicity Test, Subacute" OR "Subacute Toxicity Tests"
Toxicity Tests, Subchronic	Subchronic Toxicity Test Test, Subchronic Toxicity Tests, Subchronic Toxicity Toxicity Test, Subchronic Subchronic Toxicity Tests	Toxicity	"Toxicity Tests, Subchronic" OR "Subchronic Toxicity Test" OR "Test, Subchronic Toxicity" OR "Tests, Subchronic Toxicity" OR "Toxicity Test, Subchronic" OR "Subchronic Toxicity Tests"
Toxicity Tests, Chronic	Chronic Toxicity Test Test, Chronic Toxicity Tests, Chronic Toxicity Toxicity Test, Chronic Chronic Toxicity Tests	Toxicity	"Toxicity Tests, Chronic" OR "Chronic Toxicity Test" OR "Test, Chronic Toxicity" OR "Tests, Chronic Toxicity" OR "Toxicity Test, Chronic" OR "Chronic Toxicity Tests"

Apêndice 1.C. Estratégia de busca na base de dados CAB DIRECT (conclusão)

Toxicity Tests, Acute	Acute Toxicity Tests Acute Toxicity Test Test, Acute Toxicity Tests, Acute Toxicity Toxicity Test, Acute	"Toxicity Tests, Acute" OR "Acute Toxicity Tests" OR "Acute Toxicity Test" OR "Test, Acute Toxicity" OR "Tests, Acute Toxicity" OR "Toxicity Test, Acute"
--------------------------	--	--

Estratégia final

((("Plants, Medicinal" OR "Medicinal Plant" OR "Plant, Medicinal" OR "Medicinal Plants" OR "Pharmaceutical Plants" OR "Pharmaceutical Plant" OR "Plant, Pharmaceutical" OR "Plants, Pharmaceutical" OR "Healing Plants" OR "Healing Plant" OR "Plant, Healing" OR "Plants, Healing" OR "Medicinal Herbs" OR "Herb, Medicinal" OR "Medicinal Herb" OR "Herbs, Medicinal")) OR ("medicinal plants")) AND (((("Toxicity Tests, Acute" OR "Acute Toxicity Tests" OR "Acute Toxicity Test" OR "Test, Acute Toxicity" OR "Tests, Acute Toxicity" OR "Toxicity Test, Acute")) OR (("Toxicity Tests, Chronic" OR "Chronic Toxicity Test" OR "Test, Chronic Toxicity" OR "Tests, Chronic Toxicity" OR "Toxicity Test, Chronic" OR "Chronic Toxicity Tests")) OR (("Toxicity Tests, Subchronic" OR "Subchronic Toxicity Test" OR "Test, Subchronic Toxicity" OR "Tests, Subchronic Toxicity" OR "Toxicity Test, Subchronic" OR "Subchronic Toxicity Tests")) OR ((("Toxicity Tests, Subacute" OR "Subacute Toxicity Test" OR "Test, Subacute Toxicity" OR "Tests, Subacute Toxicity" OR "Toxicity Test, Subacute" OR "Subacute Toxicity Tests")) OR ("toxicity")) yr:[2017]

Apêndice 1.D. Estratégia de busca na base de dados SCOPUS (continua)

MeSH	Sinônimos MeSH	Mesh + Sinônimos	Estratégia SCOPUS
Plants, Medicinal	Medicinal Plant Plant, Medicinal Medicinal Plants Pharmaceutical Plants Pharmaceutical Plant Plant, Pharmaceutical Plants, Pharmaceutical Healing Plants Healing Plant Plant, Healing Plants, Healing Medicinal Herbs Herb, Medicinal Medicinal Herb Herbs, Medicinal	"Plants, Medicinal" OR "Medicinal Plant" OR "Plant, Medicinal" OR "Medicinal Plants" OR "Pharmaceutical Plants" OR "Pharmaceutical Plant" OR "Plant, Pharmaceutical" OR "Plants, Pharmaceutical" OR "Healing Plants" OR "Healing Plant" OR "Plant, Healing" OR "Plants, Healing" OR "Medicinal Herbs" OR "Herb, Medicinal" OR "Medicinal Herb" OR "Herbs, Medicinal"	TITLE-ABS-KEY ("Plants, Medicinal" OR "Medicinal Plant" OR "Plant, Medicinal" OR "Medicinal Plants" OR "Pharmaceutical Plants" OR "Pharmaceutical Plant" OR "Plant, Pharmaceutical" OR "Plants , Pharmaceutical" OR "Heali ng Plants" OR "Healing Plant" OR "Plant, Healing" OR "Plants, Healing" OR "Medicinal Herbs" OR "Herb, Medicinal" OR "Medicinal Herb" OR "Herbs, Medicinal") TITLE-ABS-KEY ("Plant Extracts" OR "Extracts, Plant") TITLE-ABS- KEY ("Toxicity Tests, Subacute" OR "Subacute Toxicity Test" OR "Test, Subacute Toxicity" OR "Tests, Subacute Toxicity" OR "Toxicity Test, Subacute" OR "Subacute Toxicity Tests")
Plant Extracts	Extracts, Plant	"Plant Extracts" OR "Extracts, Plant"	
Toxicity Tests, Subacute	Subacute Toxicity Test Test, Subacute Toxicity Tests, Subacute Toxicity Toxicity Test, Subacute Subacute Toxicity Tests	"Toxicity Tests, Subacute" OR "Subacute Toxicity Test" OR "Test, Subacute Toxicity" OR "Tests, Subacute Toxicity" OR "Toxicity Test, Subacute" OR "Subacute Toxicity Tests"	

Apêndice 1.D. Estratégia de busca na base de dados SCOPUS (continua)

Toxicity Tests, Subchronic	Subchronic Toxicity Test Test, Subchronic Toxicity Tests, Subchronic Toxicity Test, Subchronic Subchronic Toxicity Tests	"Toxicity Tests, Subchronic" OR "Subchronic Toxicity Test" OR "Test, Subchronic Toxicity" OR "Tests, Subchronic Toxicity" OR "Toxicity Test, Subchronic" OR "Subchronic Toxicity Tests"	TITLE-ABS-KEY ("Toxicity Tests, Subchronic" OR "Subchronic Toxicity Test" OR "Test, Subchronic Toxicity" OR "Tests, Subchronic Toxicity" OR "Toxicity Test, Subchronic" OR "Subchronic Toxicity Tests")
Toxicity Tests, Chronic	Chronic Toxicity Test Test, Chronic Toxicity Tests, Chronic Toxicity Test, Chronic Chronic Toxicity Tests	"Toxicity Tests, Chronic" OR "Chronic Toxicity Test" OR "Test, Chronic Toxicity" OR "Tests, Chronic Toxicity" OR "Toxicity Test, Chronic" OR "Chronic Toxicity Tests"	TITLE-ABS-KEY ("Toxicity Tests, Chronic" OR "Chronic Toxicity Test" OR "Test, Chronic Toxicity" OR "Tests, Chronic Toxicity" OR "Toxicity Test, Chronic" OR "Chronic Toxicity Tests")
Toxicity Tests, Acute	Acute Toxicity Tests Acute Toxicity Test, Acute Toxicity Tests, Acute Toxicity Test, Acute	"Toxicity Tests, Acute" OR "Acute Toxicity Tests" OR "Acute Toxicity Test" OR "Test, Acute Toxicity" OR "Tests, Acute Toxicity" OR "Toxicity Test, Acute"	TITLE-ABS-KEY ("Toxicity Tests, Acute" OR "Acute Toxicity Tests" OR "Acute Toxicity Test" OR "Test, Acute Toxicity" OR "Tests, Acute Toxicity" OR "Toxicity Test, Acute")

Apêndice 1.D. Estratégia de busca na base de dados SCOPUS (conclusão)

Estratégia Final

((TITLE-ABS-KEY ("Plants, Medicinal" OR "Medicinal Plant" OR "Plant, Medicinal" OR "Medicinal Plants" OR "Pharmaceutical Plants" OR "Pharmaceutical Plant" OR "Plant, Pharmaceutical" OR "Plants, Pharmaceutical" OR "Healing Plants" OR "Healing Plant" OR "Plant, Healing" OR "Plants, Healing" OR "Medicinal Herbs" OR "Herb, Medicinal" OR "Medicinal Herb" OR "Herbs, Medicinal")) OR (TITLE-ABS-KEY ("Plant Extracts" OR "Extracts, Plant"))) AND ((TITLE-ABS-KEY ("Toxicity Tests, Subacute" OR "Subacute Toxicity Test" OR "Test, Subacute Toxicity" OR "Tests, Subacute Toxicity" OR "Toxicity Test, Subacute" OR "Subacute Toxicity Tests")) OR (TITLE-ABS-KEY ("Toxicity Tests, Subchronic" OR "Subchronic Toxicity Test" OR "Test, Subchronic Toxicity" OR "Tests, Subchronic Toxicity" OR "Toxicity Test, Subchronic" OR "Subchronic Toxicity Tests")) OR (TITLE-ABS-KEY ("Toxicity Tests, Chronic" OR "Chronic Toxicity Test" OR "Test, Chronic Toxicity" OR "Tests, Chronic Toxicity" OR "Toxicity Test, Chronic" OR "Chronic Toxicity Tests")) OR (TITLE-ABS-KEY ("Toxicity Tests, Acute" OR "Acute Toxicity Tests" OR "Acute Toxicity Test" OR "Test, Acute Toxicity" OR "Tests, Acute Toxicity" OR "Toxicity Test, Acute"))) AND (LIMIT-TO (DOCTYPE , "ar") OR LIMIT-TO (DOCTYPE , "ip")) AND LIMIT-TO (PUBYEAR , 2017)) AND (LIMIT-TO (LANGUAGE , "English") OR LIMIT-TO (LANGUAGE , "Portuguese"))

Apêndice 1.E. Estratégia de busca na base de dados *Web of Science* (continua)

MeSH	Sinônimos MeSH	Mesh + Sinônimos
Plants, Medicinal	Medicinal Plant Plant, Medicinal Medicinal Plants Pharmaceutical Plants Pharmaceutical Plant Plant, Pharmaceutical Plants, Pharmaceutical Healing Plants Healing Plant Plant, Healing Plants, Healing Medicinal Herbs Herb, Medicinal Medicinal Herb Herbs, Medicinal	"Plants, Medicinal" OR "Medicinal Plant" OR "Plant, Medicinal" OR "Medicinal Plants" OR "Pharmaceutical Plants" OR "Pharmaceutical Plant" OR "Plant, Pharmaceutical" OR "Plants, Pharmaceutical" OR "Healing Plants" OR "Healing Plant" OR "Plant, Healing" OR "Plants, Healing" OR "Medicinal Herbs" OR "Herb, Medicinal" OR "Medicinal Herb" OR "Herbs, Medicinal"
Plant Extracts	Extracts, Plant	"Plant Extracts" OR "Extracts, Plant"
Toxicity Tests, Subacute	Subacute Toxicity Test Test, Subacute Toxicity Tests, Subacute Toxicity Toxicity Test, Subacute Subacute Toxicity Tests	"Toxicity Tests, Subacute" OR "Subacute Toxicity Test" OR "Test, Subacute Toxicity" OR "Tests, Subacute Toxicity" OR "Toxicity Test, Subacute" OR "Subacute Toxicity Tests"
Toxicity Tests, Subchronic	Subchronic Toxicity Test Test, Subchronic Toxicity Tests, Subchronic Toxicity Toxicity Test, Subchronic Subchronic Toxicity Tests	"Toxicity Tests, Subchronic" OR "Subchronic Toxicity Test" OR "Test, Subchronic Toxicity" OR "Tests, Subchronic Toxicity" OR "Toxicity Test, Subchronic" OR "Subchronic Toxicity Tests"
Toxicity Tests, Chronic	Chronic Toxicity Test Test, Chronic Toxicity Tests, Chronic Toxicity Toxicity Test, Chronic Chronic Toxicity Tests	"Toxicity Tests, Chronic" OR "Chronic Toxicity Test" OR "Test, Chronic Toxicity" OR "Tests, Chronic Toxicity" OR "Toxicity Test, Chronic" OR "Chronic Toxicity Tests"

Apêndice 1.E. Estratégia de busca na base de dados *Web of Science* (continuação)

Toxicity Tests, Acute	Acute Toxicity Tests Acute Toxicity Test Test, Acute Toxicity Tests, Acute Toxicity Toxicity Test, Acute	"Toxicity Tests, Acute" OR "Acute Toxicity Tests" OR "Acute Toxicity Test" OR "Test, Acute Toxicity" OR "Tests, Acute Toxicity" OR "Toxicity Test, Acute"
-----------------------	--	---

Estratégia final

#19 AND #18

Refinado por: LANGUAGES: (ENGLISH OR PORTUGUESE) AND DOCUMENT TYPES: (ARTICLE OR PROCEEDINGS PAPER) AND PUBLICATION YEARS: (2017)

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#20 #19 AND #18

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#19 #17 OR #16 OR #15 OR #14

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#18 #13 OR #12

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#17 TÓPICO: ("Toxicity Tests, Acute" OR "Acute Toxicity Tests" OR "Acute Toxicity Test" OR "Test, Acute Toxicity" OR "Tests, Acute Toxicity" OR "Toxicity Test, Acute")

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#16 TÓPICO: ("Toxicity Tests, Chronic" OR "Chronic Toxicity Test" OR "Test, Chronic Toxicity" OR "Tests, Chronic Toxicity" OR "Toxicity Test, Chronic" OR "Chronic Toxicity Tests")

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#15 TÓPICO: ("Toxicity Tests, Subchronic" OR "Subchronic Toxicity Test" OR "Test, Subchronic Toxicity" OR "Tests, Subchronic Toxicity" OR "Toxicity Test, Subchronic" OR "Subchronic Toxicity Tests")

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#14 TÓPICO: (Toxicity Tests, Subacute OR Subacute Toxicity Test OR Test, Subacute Toxicity OR Tests, Subacute Toxicity OR Toxicity Test, Subacute OR Subacute Toxicity Tests)

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#13 TÓPICO: ("Plant Extracts" OR "Extracts, Plant")

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#12 TÓPICO: ("Plants, Medicinal" OR "Medicinal Plant" OR "Plant, Medicinal" OR "Medicinal Plants" OR "Pharmaceutical Plants" OR "Pharmaceutical Plant" OR "Plant, Pharmaceutical" OR "Plants, Pharmaceutical" OR "Healing Plants" OR "Healing Plant" OR "Plant, Healing" OR "Plants, Healing" OR "Medicinal Herbs" OR "Herb, Medicinal" OR "Medicinal Herb" OR "Herbs, Medicinal") Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

Apêndice 1.E. Estratégia de busca na base de dados *Web of Science* (conclusão)

#11 TÓPICO: (TÓPICO: ("Plants, Medicinal" OR "Medicinal Plant" OR "Plant, Medicinal" OR "Medicinal Plants" OR "Pharmaceutical Plants" OR "Pharmaceutical Plant" OR "Plant, Pharmaceutical" OR "Plants, Pharmaceutical" OR "Healing Plants" OR "Healing Plant" OR "Plant, Healing" OR "Plants, Healing" OR "Medicinal Herbs" OR "Herb, Medicinal" OR "Medicinal Herb" OR "Herbs, Medicinal"))

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#10 #9 AND #8

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#9 #7 OR #6 OR #5 OR #4 OR #3

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#8 #2 OR #1

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#7 TÓPICO: ("Toxicity Tests, Acute" OR "Acute Toxicity Tests" OR "Acute Toxicity Test" OR "Test, Acute Toxicity" OR "Tests, Acute Toxicity" OR "Toxicity Test, Acute")

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#6 TÓPICO: ("Toxicity Tests, Acute" OR "Acute Toxicity Tests" OR "Acute Toxicity Test" OR "Test, Acute Toxicity" OR "Tests, Acute Toxicity" OR "Toxicity Test, Acute")

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#5 TÓPICO: ("Toxicity Tests, Chronic" OR "Chronic Toxicity Test" OR "Test, Chronic Toxicity" OR "Tests, Chronic Toxicity" OR "Toxicity Test, Chronic" OR "Chronic Toxicity Tests")

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#4 TÓPICO: ("Toxicity Tests, Subchronic" OR "Subchronic Toxicity Test" OR "Test, Subchronic Toxicity" OR "Tests, Subchronic Toxicity" OR "Toxicity Test, Subchronic" OR "Subchronic Toxicity Tests")

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#3 TÓPICO: ("Toxicity Tests, Subacute" OR "Subacute Toxicity Test" OR "Test, Subacute Toxicity" OR "Tests, Subacute Toxicity" OR "Toxicity Test, Subacute" OR "Subacute Toxicity Tests")

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#2 TÓPICO: ("Plant Extracts" OR "Extracts, Plant")

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

#1 TÓPICO: ("Plants, Medicinal" OR "Medicinal Plant" OR "Plant, Medicinal" OR "Medicinal Plants" OR "Pharmaceutical Plants" OR "Pharmaceutical Plant" OR "Plant, Pharmaceutical" OR "Plants, Pharmaceutical" OR "Healing Plants" OR "Healing Plant" OR "Plant, Healing" OR "Plants, Healing" OR "Medicinal Herbs" OR "Herb, Medicinal" OR "Medicinal Herb" OR "Herbs, Medicinal")

Tipo de documento=Todos os tipos de documentos; Idioma=todos os idiomas;

Apêndice 2 - Checklist utilizado na avaliação dos artigos

Checklist de Avaliação dos artigos selecionados com base nos critérios de inclusão. Adaptado ARRIVE (*Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments*) para avaliação toxicológica

Identificação dos estudos: Autor, Co-autoria, Título, Palavras-chaves/descriptores e resumo.

Nacionalidade:

Critérios	Observações encontradas		
Tema 1			
Animais			
Foi reportado o sexo dos animais?	Sim	Não	
Foi reportada a idade dos animais?	Sim	Não	
Foi reportada a linhagem dos animais?	Sim	Não	
Foi reportado o peso dos animais?	Sim	Não	
Condições de manutenção dos animais			
Os animais foram aclimatados na sala/gaiola antes dos experimentos?	Sim	Não	
Os animais foram aclimatados as condições do Biotério?	Sim	Não	
Foi descrito a frequência de alimentação?	Sim	Não	
Foi descrito o tipo de alimentação?	Sim	Não	
Foi descrita a qualidade da água?	Sim	Não	
Foi descrito o acesso a água	Sim	Não	
Foi descrito que os animais foram ambientados em ciclo de luz claro/escuro?	Sim	Não	
Foi descrita a temperatura que os animais foram ambientados?	Sim	Não	
Foi descrito se o estudo realizou enriquecimento ambiental?	Sim	Não	
Declaração Ética			
O artigo apresentou declaração ética em relação aos animais?	Sim	Não	Artigo apresentou como base uma publicação sobre cuidados e uso de animais
Artigo apresentou o número do métodos do Comitê de Ética	Sim	Não	
Tema 2			
Plano de estudo			
Descreve o número de grupo de animais experimentais?	Sim	Não	
Descreve o número total de animais usados em cada experimento?	Sim	Não	
Descreve o número de animais em cada grupo experimental?	Sim	Não	

Apêndice 2 - Checklist utilizado na avaliação dos artigos (continuação)

Descreve/ cita o uso de grupo de animais controle?	Sim	Não	
Número de animais totais	Quantidade		Número de animais totais
Existiu grupo experimental para avaliação toxicológica?	Sim	Não	Estudos que não trabalharam com grupo experimental, mas com número de animais
Cita o processo de randomização?	Sim	Não	
Descreve processo de randomização na distribuição dos animais nos grupos experimentais?	Sim	Não	
A definição do número de animais por grupo experimental foi feita com base em cálculo estatístico	Sim	Não	
Foi realizado cegamento para obtenção e análise dos resultados?	Sim	Não	
Tema 3-			
Fez outros testes farmacológicos <i>in vivo</i> ?	Sim	Não	
O estudo calculou a DL50?			
O método experimental baseou-se em Diretrizes da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económico (OECD)?	Sim	Não	Apresentação de outra diretriz/referência
Qual foi a dose limite testada?	Quantidade		
Dias totais de observação	Quantidade		
Foi descrita a (s) dose (s) utilizadas?	Sim	Não	
Foi descrita a (s) formulação (s) utilizadas?	Sim	Não	
Foram descritas a(s) via (s) de administração?	Sim	Não	
Foi descrita a frequência de tratamento?	Sim	Não	
Foi descrito a ordem usada para tratar os animais?	Sim	Não	
Foi descrita a ordem para observar os animais?	Sim	Não	
Foi descrito que se observou sinais clínicos de toxicidade?	Sim	Não	
Foi descrito se avaliou o peso dos animais durante o experimento?	Sim	Não	
Foi descrito qual a frequência de avaliação de peso?	Sim	Não	
Foi descrito a avaliação de consumo de ração durante experimento?	Sim	Não	
Foi descrito a avaliação de consumo de água durante experimento?	Sim	Não	
Foi descrito se os animais foram anestesiados para coleta de sangue?	Sim	Não	
Foi descrito se foi realizada a coleta de sangue?	Sim	Não	
A amostra de sangue foi usada para qual avaliação?	Análise empregada		
Os animais foram anestesiados para coleta de sangue?	Sim	Não	

Apêndice 2 - Ckecklist utilizado na avaliação dos artigos (conclusão)		
Os animais foram anestesiados para eutanásia?	Sim	Não
Foi realizada a coleta de órgãos?	Sim	Não
Amostra de órgão foi usada para qual avaliação?	Análise empregada	

Apêndice 3 - Número de artigos encontrados em cada métodos de avaliação de toxicidade individual ou combinado com outro métodos

Grupo	Método de Avaliação de Toxicidade	Total Artigos
I	Toxicidade Aguda	n=84
II	Toxicidade Subaguda	n=12
III	Toxicidade Subcrônica	n=11
IV	Toxicidade Crônica	n=2
V	Toxicidade Aguda e Subaguda	n=20
VI	Toxicidade Aguda e Subcrônica	n=20
VII	Toxicidade Aguda e Crônica	n=1
VIII	Toxicidade Aguda, Subaguda e Subcrônica	n=1
IX	Toxicidade Subaguda e Subcrônica	n=2
Total		n=198

N= número de artigos encontrados

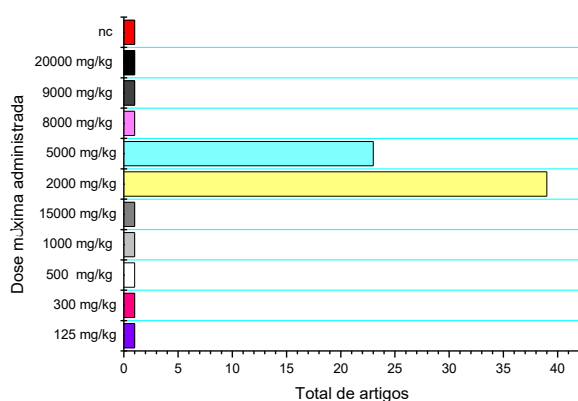
Apêndice 4 - Espécies de animais experimentais utilizadas nos métodos de toxicidade (aguda, subaguda, subcrônica e crônica) em números absolutos

Métodos	Animal experimental/Métodos			
	Ratos	Camundongos	Coelho	Cachorro
Toxicidade Aguda (n =126)	n = 51	n= 78	*	*
Toxicidade Subaguda (n=35)	n= 22	n= 10	n= 1	n= 1
Toxicidade Subcrônica (n = 34)	n= 27	n= 7	*	n= 1
Toxicidade Crônica (n =3)	n= 1	n= 2	*	*

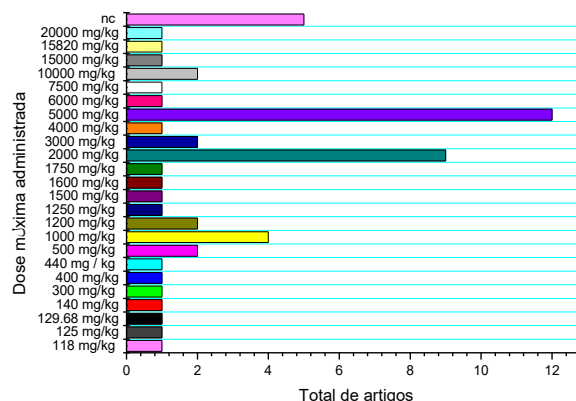
Número de espécies animais por métodos de toxicidade individual. Nos métodos de toxicidade aguda e subcrônica encontramos método que trabalharam com uma ou mais espécies na mesma avaliação. * espécie não encontrada nos métodos

Apêndice 5 - Doses máximas administradas por via oral/intraperitoneal nos métodos de toxicidade

Apêndice 5.1 – Frequência (em números absolutos) de dose máxima descrita (administrada por via oral/via intraperitoneal) nos métodos de avaliação de toxicidade aguda (n = 126) que A) utilizaram como referências diretrizes OECD e B) utilizaram outras referências

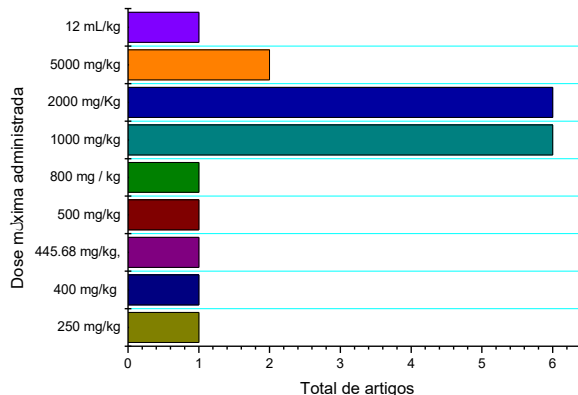


A

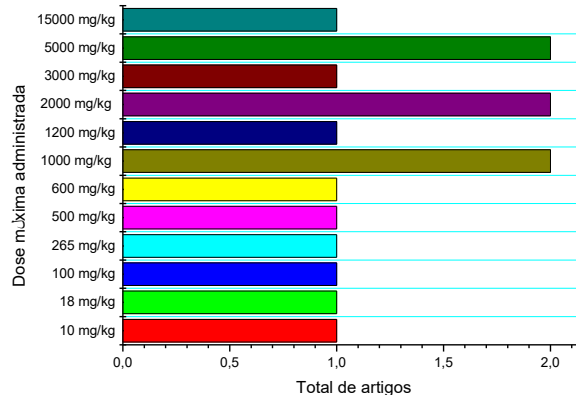


B

Apêndice 5.2 - Frequência (em números absolutos) de dose máxima descrita (administrada por via oral/via intraperitoneal) no métodos de avaliação de toxicidade subaguda (n = 35) que A) utilizaram como referências diretrizes OECD ou B) utilizaram outras referências

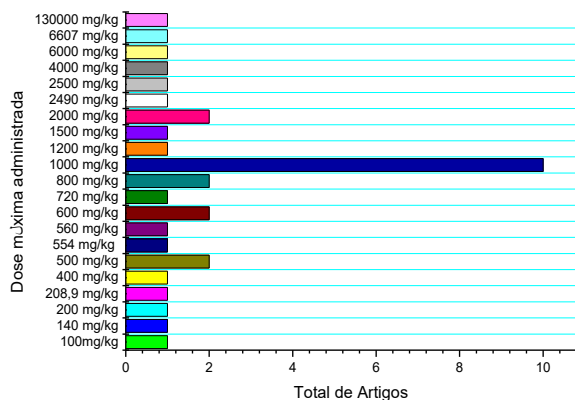


A

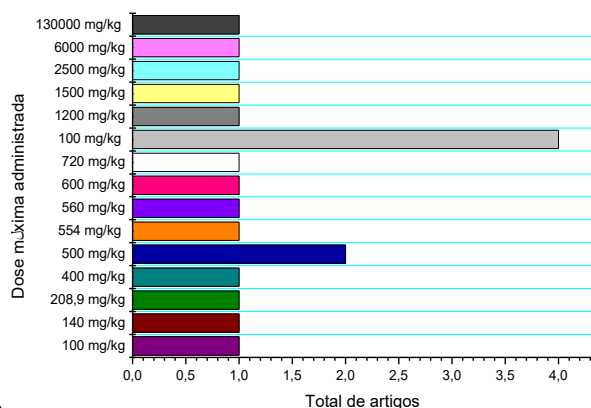


B

Apêndice 5.3 - Frequência (em números absolutos) de dose máxima descrita (administrada por via oral/via intraperitoneal) nos métodos de avaliação de toxicidade subcrônica (n = 34) que A) utilizaram como referências diretrizes OECD ou B) utilizaram outras referências.

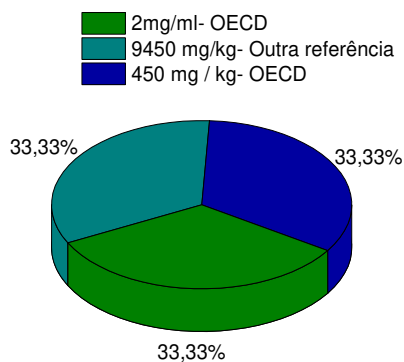


A



B

Apêndice 5.4 - Frequência (em números absolutos) de dose máxima descrita (administrada por via oral/via intraperitoneal) no métodos de avaliação de toxicidade crônica (n = 3) e referências utilizadas por estes artigos.



Anexo 1- As diretrizes ARRIVE- (*The ARRIVE Guidelines Checklist Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*) -(Kilkenny et al., 2010)



The ARRIVE Guidelines Checklist

Animal Research: Reporting In Vivo Experiments

Carol Kilkenny¹, William J Browne², Innes C Cuthill³, Michael Emerson⁴ and Douglas G Altman⁵

¹The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, London, UK, ²School of Veterinary Science, University of Bristol, Bristol, UK, ³School of Biological Sciences, University of Bristol, Bristol, UK, ⁴National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, ⁵Centre for Statistics in Medicine, University of Oxford, Oxford, UK.

	ITEM	RECOMMENDATION	Section/ Paragraph
Title	1	Provide as accurate and concise a description of the content of the article as possible.	
Abstract	2	Provide an accurate summary of the background, research objectives, including details of the species or strain of animal used, key methods, principal findings and conclusions of the study.	
INTRODUCTION			
Background	3	a. Include sufficient scientific background (including relevant references to previous work) to understand the motivation and context for the study, and explain the experimental approach and rationale. b. Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology.	
Objectives	4	Clearly describe the primary and any secondary objectives of the study, or specific hypotheses being tested.	
METHODS			
Ethical statement	5	Indicate the nature of the ethical review permissions, relevant licences (e.g. Animal [Scientific Procedures] Act 1986), and national or institutional guidelines for the care and use of animals, that cover the research.	
Study design	6	For each experiment, give brief details of the study design including: a. The number of experimental and control groups. b. Any steps taken to minimise the effects of subjective bias when allocating animals to treatment (e.g. randomisation procedure) and when assessing results (e.g. if done, describe who was blinded and when). c. The experimental unit (e.g. a single animal, group or cage of animals). A time-line diagram or flow chart can be useful to illustrate how complex study designs were carried out.	
Experimental procedures	7	For each experiment and each experimental group, including controls, provide precise details of all procedures carried out. For example: a. How (e.g. drug formulation and dose, site and route of administration, anaesthesia and analgesia used [including monitoring], surgical procedure, method of euthanasia). Provide details of any specialist equipment used, including supplier(s). b. When (e.g. time of day). c. Where (e.g. home cage, laboratory, water maze). d. Why (e.g. rationale for choice of specific anaesthetic, route of administration, drug dose used).	
Experimental animals	8	a. Provide details of the animals used, including species, strain, sex, developmental stage (e.g. mean or median age plus age range) and weight (e.g. mean or median weight plus weight range). b. Provide further relevant information such as the source of animals, international strain nomenclature, genetic modification status (e.g. knock-out or transgenic), genotype, health/immune status, drug or test naïve, previous procedures, etc.	

The ARRIVE guidelines. Originally published in *PLoS Biology*, June 2010¹

Housing and husbandry	9	Provide details of: a. Housing (type of facility e.g. specific pathogen free [SPF]; type of cage or housing; bedding material; number of cage companions; tank shape and material etc. for fish). b. Husbandry conditions (e.g. breeding programme, light/dark cycle, temperature, quality of water etc for fish, type of food, access to food and water, environmental enrichment). c. Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment.	
Sample size	10	a. Specify the total number of animals used in each experiment, and the number of animals in each experimental group. b. Explain how the number of animals was arrived at. Provide details of any sample size calculation used. c. Indicate the number of independent replications of each experiment, if relevant.	
Allocating animals to experimental groups	11	a. Give full details of how animals were allocated to experimental groups, including randomisation or matching if done. b. Describe the order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed.	
Experimental outcomes	12	Clearly define the primary and secondary experimental outcomes assessed (e.g. cell death, molecular markers, behavioural changes).	
Statistical methods	13	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis. b. Specify the unit of analysis for each dataset (e.g. single animal, group of animals, single neuron). c. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach.	
RESULTS			
Baseline data	14	For each experimental group, report relevant characteristics and health status of animals (e.g. weight, microbiological status, and drug or test naïve) prior to treatment or testing. (This information can often be tabulated).	
Numbers analysed	15	a. Report the number of animals in each group included in each analysis. Report absolute numbers (e.g. 10/20, not 50%). b. If any animals or data were not included in the analysis, explain why.	
Outcomes and estimation	16	Report the results for each analysis carried out, with a measure of precision (e.g. standard error or confidence interval).	
Adverse events	17	a. Give details of all important adverse events in each experimental group. b. Describe any modifications to the experimental protocols made to reduce adverse events.	
DISCUSSION			
Interpretation/scientific implications	18	a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including any potential sources of bias, any limitations of the animal model, and the imprecision associated with the results ² . c. Describe any implications of your experimental methods or findings for the replacement, refinement or reduction (the 3Rs) of the use of animals in research.	
Generalisability/translation	19	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to translate to other species or systems, including any relevance to human biology.	
Funding	20	List all funding sources (including grant number) and the role of the funder(s) in the study.	

References:

1. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8(6): e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412
2. Schulz KF, Altman DG, Moher D, the CONSORT Group (2010) CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ* 340:c332.

Anexo 2- Verificação de Originalidade e Prevenção de Plágio



Recibo digital

Esse recibo confirma que o seu documento foi recebido por **Turnitin**. Abaixo você encontrará a informação do recibo referente ao seu envio.

A primeira página do seu documento está exibida abaixo.

Autor do material: Ana Ruiz
 Título do Trabalho: dissertacao
 Título do envio: dissertacao
 Nome do arquivo: dissertacao final.pdf
 Tamanho de arquivo: 2.36M
 Contagem de páginas: 112
 Contagem de palavras: 30,116
 Contagem de caracteres: 173,230
 Data de envio: 19-ago-2019 02:21PM (UTC-0300)
 Identificação do Envio: 1161483308



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
 FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS

ÂKILA LARA DE OLIVEIRA

TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE PLANTAS MEDICINAIS:
 AVALIANDO A DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS COM BASE NAS
 DIRETRIZES ARRIVE (*Animals in Research: Reporting In Vivo
 Experiments*)

Campinas
 2019

dissertacao

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

3%	3%	1%	1%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS

FONTES PRIMÁRIAS

1	profiles.jefferson.edu Fonte da Internet	1%
2	profiles.lbl.gov Fonte da Internet	1%
3	www.chiroaccess.com Fonte da Internet	1%
4	www.nc3rs.org.uk Fonte da Internet	1%

Excluir citações

Desligado

Excluir correspondências < 1%

Excluir bibliografia

Em