



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Tauana de Souza Scouto

**RISCO DE VIÉS EM ESTUDOS DE TOXICIDADE EM PEIXE-ZEBRA:
UMA REVISÃO NARRATIVA**

Florianópolis

2023

Tauana de Souza Scouto

**RISCO DE VIÉS EM ESTUDOS DE TOXICIDADE EM PEIXE-ZEBRA:
UMA REVISÃO NARRATIVA**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador(a): Prof.(a) Izabel Galhardo Demarchi,
Dr.(a)

Coorientador(a): Prof.(a) Iara Fabricia Kretzer,
Dr.(a)

Florianópolis

2023

de Souza Scouto, Tauana
RISCO DE VIÉS EM ESTUDOS DE TOXICIDADE EM PEIXE-ZEBRA: UMA
REVISÃO NARRATIVA / Tauana de Souza Scouto ; orientadora, Izabel
Galhardo Demarchi, coorientador, Iara Fabricia Kretzer, 2023.
46 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade
Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. qualidade metodológica. 3. toxicidade. 4.
peixe-zebra. I. Galhardo Demarchi, Izabel. II. Fabricia Kretzer,
Iara. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Farmácia. IV. Título.

Tauana de Souza Scouto

**RISCO DE VIÉS EM ESTUDOS DE TOXICIDADE EM PEIXE-ZEBRA: UMA REVISÃO
NARRATIVA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Farmacêutica e aprovado em sua forma final pelo Curso Farmácia.

Florianópolis, 16 de novembro de 2023;

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Profa. Izabel Galhardo Demarchi, Dra.

Orientador(a)

Tainá Larissa Lubschinski, Me.

Instituição UFSC

Profa. Tatiana Herrerias, Dra.

Instituição UFSC

Florianópolis, 2023.

Dedico esse trabalho à minha família. Sirlei, Ney, Davi, Pâmila e Jeferson,
eu amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, a minha família. Aos meus pais que estiveram comigo desde o início e, principalmente, à minha mãe, que não mede esforços para me ver feliz. Ao meu sobrinho, que ainda não entende, mas me tornou uma pessoa melhor desde seu nascimento. À minha irmã, que comprou um caderno para que eu estudasse pro vestibular em 2018 e, mesmo que eu não tenha usado muito, obrigada pelo incentivo. Ao meu namorado, que está sempre do meu lado me apoiando e que acredita em mim muito mais do que eu mesma. Amo muito vocês.

Às duas pessoas que passaram de “colegas” para “amigas” durante esses longos 5 anos. À Taynara que está comigo desde o início, com quem eu combinei todas as minhas matrículas para estarmos sempre juntas, não sei o que seria de mim sem você. À Júlia, que entrou na minha vida nesse último ano, o mais corrido de todos, para segurar minha mão sempre que preciso. A faculdade é um lugar muito difícil de enfrentar sozinha, obrigada por estarem ao meu lado.

À minha orientadora Izabel, que me acolheu mesmo não podendo mais. Escolhi primeiro a orientadora para depois pensar no tema, queria alguém que estivesse ao meu lado para enfrentar esses momentos difíceis de escrita do TCC, e desde a primeira aula de imunologia eu soube que seria você. Agradeço por ter tornado essa caminhada mais leve e por tudo que me ensinou.

Agradeço também à UFSC, sei que foram muitas as reclamações ao longo desses 5 anos, mas foi por conta dessa instituição de ensino que me tornei farmacêutica com um ensino gratuito e de qualidade.

RESUMO

Os estudos primários utilizando o peixe-zebra como modelo animal vêm crescendo na última década. Da mesma forma, há um número cada vez maior de revisões sistemáticas sobre o assunto, demandando uma maior padronização do rigor metodológico, a fim de manter a qualidade das evidências. O presente trabalho analisa a qualidade metodológica das revisões sistemáticas sobre estudos de toxicidade usando o peixe-zebra, demonstrando se estão sendo empregadas ferramentas para análise do viés e quais são. Além de reportar toxicidade dos compostos estudados em embriões, larvas ou adultos de peixe-zebra, as revisões também demonstraram o potencial do peixe-zebra de substituir mamíferos como modelos animais na pesquisa pré-clínica. A ferramenta SYRCLE foi a mais utilizada pelos estudos selecionados, porém não foi a única. Alguns estudos utilizaram outros critérios que não estão incluídos na ferramenta SYRCLE para analisar o viés, como cepa do peixe-zebra, separação dos peixes em macho e fêmea, estágio da exposição, rastreabilidade dos embriões, entre outros. Esses domínios alternativos podem ser importantes para o desenvolvimento de uma ferramenta de análise de viés própria para estudos com peixe-zebra. Diversos domínios analisados por esses estudos de revisão sistemática apresentaram alto risco de viés ou não foram reportados pelos estudos primários. Isso indica a necessidade de maior padronização dos métodos de análise de qualidade metodológica.

Palavras-chave: qualidade metodológica; toxicidade; peixe-zebra.

ABSTRACT

In the last decade, primary studies utilizing the zebrafish as an animal model have seen a notable increase. Similarly, there is a growing number of systematic reviews on the subject, necessitating greater standardization of methodological rigor to uphold the quality of evidence. This study examines the methodological quality of systematic reviews on toxicity studies using zebrafish, elucidating whether tools for bias analysis are being employed and, if so, which ones. In addition to reporting the toxicity of compounds studied in zebrafish embryos, larvae, or adults, the reviews also underscore the zebrafish's potential to replace mammals as animal models in preclinical research. While the SYRCLE tool was the most commonly used among the selected studies, it was not the only one. Some studies employed criteria not included in the SYRCLE tool for bias analysis, such as zebrafish strain, segregation of fish by gender, exposure stage, traceability of embryos, among others. These alternative domains may be crucial for developing a bias analysis tool tailored to zebrafish studies. Several domains analyzed by these systematic review studies exhibited a high risk of bias or were not reported by primary studies, indicating the need for greater standardization of methodological quality analysis methods.

Keywords: methodological quality; toxicity; zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Peixe-zebra.....	12
Figura 2 – Órgãos e tecidos humanos (A) e correspondentes em larvas (B) e adultos (C) do peixe-zebra.....	13
Figura 3 – 10R's para utilização do peixe-zebra como modelo animal.....	14
Figura 4 – Esquema de desenvolvimento de uma revisão sistemática mostrando o momento da análise do risco de viés.....	17
Figura 5 – Distribuição dos estudos recuperados no Pubmed com o termo livre peixe-zebra e filtros (revisão sistemática ou meta-análise).....	23
Figura 6 – Porcentagem de estudos de revisão sistemática excluídos de acordo com o critério de exclusão.....	24
Figura 7 – Principais tópicos do PRISMA.....	26
Figura 8 – Exemplo de avaliação de risco de viés da qualidade metodológica de estudos individuais e entre os estudos utilizando a ferramenta SYRCLE RoB, em uma revisão sistemática.....	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Critérios de exclusão.....	21
Quadro 2 – Características dos estudos de revisão sistemática sobre toxicidade em peixe-zebra.....	25
Quadro 3 – Características da população de peixe-zebra estudada, intervenção e desfechos investigados.....	28
Quadro 4 – Principais resultados e limitações dos estudos incluídos na revisão.....	30
Quadro 5 – Vieses avaliados pela ferramenta SYRCLE RoB.....	33
Quadro 6 – Avaliação da qualidade metodológica dos estudos de revisão sistemática.....	37
Quadro 7 – Domínios afetados nas revisões sistemáticas.....	38
Quadro 8 – Níveis de evidência de acordo com o sistema GRADE.....	39
Quadro 9 – Nível de evidência e outros.....	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	O PEIXE-ZEBRA COMO MODELO ANIMAL	10
1.2	PEIXE-ZEBRA NA PESQUISA DE TOXICIDADE	13
1.3	PEIXE-ZEBRA NA AVALIAÇÃO DE ECOTOXICIDADE	14
1.4	RISCO DE VIÉS EM ESTUDOS EXPERIMENTAIS EM ANIMAIS	14
2	JUSTIFICATIVA	17
3	OBJETIVOS	18
3.1	OBJETIVO GERAL	18
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	18
4	METODOLOGIA	19
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6	CONCLUSÃO	40
7	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 O PEIXE-ZEBRA COMO MODELO ANIMAL

Os modelos animais são essenciais na avaliação de toxicidade, teste de novos fármacos, e inúmeras outras aplicações de pesquisa. O número de métodos e ferramentas que foram desenvolvidas para os estudos com peixe-zebra aumentou consideravelmente, proporcionando que novas abordagens experimentais fossem adotadas (NUSSLEIN-VOLHARD *et al.*, 2002).

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo da família dos ciprinídeos e da classe dos peixes com nadadeiras raiadas (Figura 1). Trata-se de um peixe tropical de origem asiática que vive em média de três a cinco anos (QUINTO, 2017). Estima-se que as linhagens que originaram os ciprinídeos e os mamíferos se dividiram há cerca de 450 milhões de anos (NUSSLEIN-VOLHARD *et al.*, 2002).

Figura 1 – Peixe-zebra

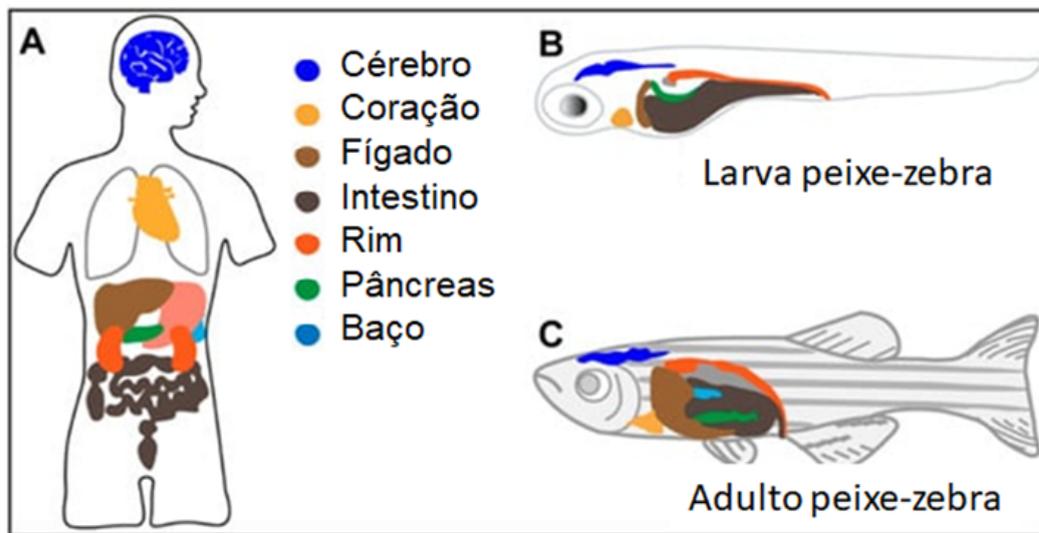


Fonte: QUINTO (2017).

As questões éticas envolvidas no uso de vertebrados impõem restrições para utilização desse tipo de modelo animal, como os ratos e camundongos, criando a necessidade de propor organismos alternativos visando diminuir essas questões. Nesse cenário, os vertebrados inferiores são uma opção atrativa por possuírem genes relacionados aos vertebrados superiores, como os mamíferos (DOKE *et al.*, 2013). Estão classificados como vertebrados inferiores, além dos peixes, os répteis

e os anfíbios (BENNETT *et al.*, 1978). A utilização do peixe-zebra emergiu nesse contexto, já que possui órgãos e tecidos símeis aos humanos (Figura 2). Além disso, possuem muitas células do sistema imune encontradas em seres humanos (WANG *et al.*, 2021).

Figura 2 – Órgãos e tecidos humanos (A) e correspondentes em larvas (B) e adultos (C) do peixe-zebra



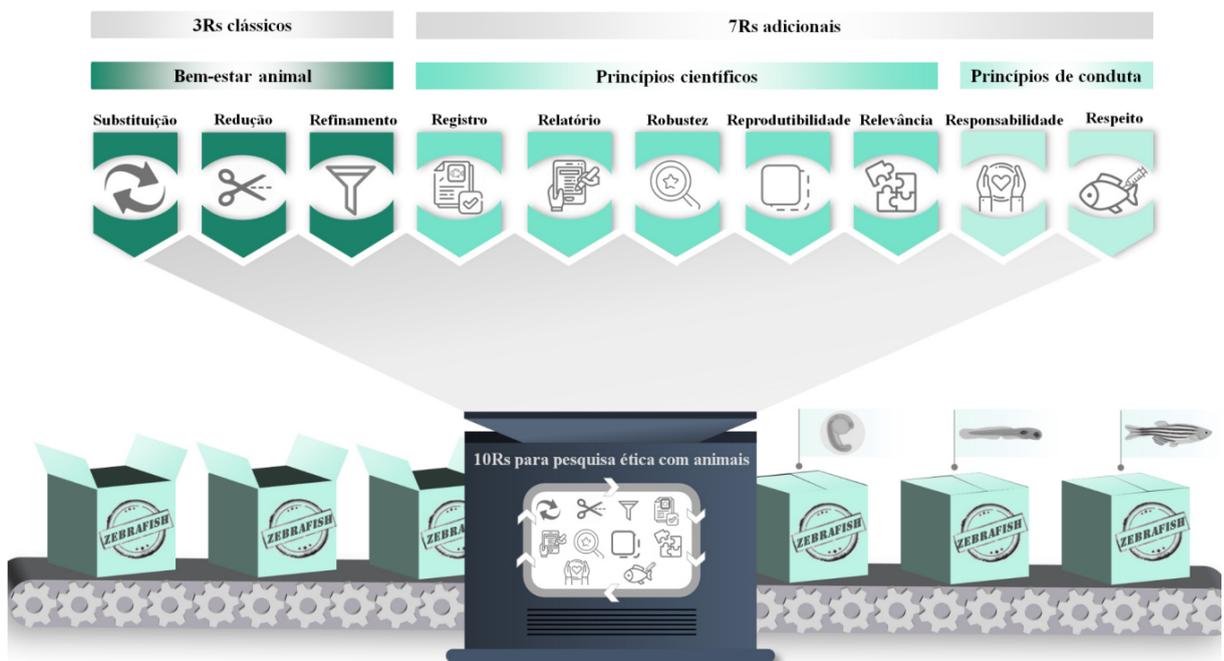
Fonte: Adaptado de WANG *et al.* (2021).

Estudos demonstram que, do ponto de vista genético, o peixe-zebra apresenta cerca de 70 a 80% de genes equivalentes ao genoma humano, enquanto 82% dos genes que possuem relação com alguma doença em humanas podem ser correlacionados com pelo menos um gene ortólogo do peixe-zebra (DI PAOLO *et al.*, 2021; HOWE *et al.*, 2013). Os genes ortólogos são uma classe de genes homólogos que são encontrados em diferentes espécies, derivados de um gene ancestral comum entre elas. Esses genes, geralmente, mantêm a mesma função em diferentes espécies, por derivarem do mesmo ancestral comum (MOREIRA, 2014).

Existe um conjunto de vantagens que tornam o peixe-zebra um modelo animal relevante no campo científico e de desenvolvimento, como seu ciclo de vida curto, genoma completamente sequenciado, fácil reprodução e alta taxa reprodutiva, além de seu tamanho reduzido quando adulto, facilitando sua criação (RIBEIRO *et al.*, 2022).

Em 1959 Willian Russel e Rex Burch publicaram o livro “*Principles of Humane Experimental Technique*”, que trouxe o conceito de 3R’s: “*refinement*” (refinamento, “*reduction*” (redução) e “*replacement*” (substituição) (ABREU *et al.*, 2018). Aos 3R’s originais descritos por Russel e Burch, foram adicionados mais 7R’s (figura 3) relacionados a princípios científicos e de conduta, a fim de melhorar não só a qualidade da evidência desses estudos, como também o bem-estar e a saúde do peixe-zebra (CANEDO *et al.*, 2022).

Figura 3 - 10R’s para utilização do peixe-zebra como modelo animal



Fonte: CANEDO *et al.* (2022).

Durante as primeiras 24 horas de desenvolvimento, o embrião do peixe-zebra é transparente e relativamente grande, permitindo que seja possível visualizar os órgãos em desenvolvimento (NUSSLEIN-VOLHARD *et al.*, 2002). Quando adulto o peixe-zebra mede aproximadamente 2,5 – 3,8 cm, reduzindo assim os custos com espaço e criação. Existem empresas especializadas em aquários para peixe-zebra capazes de abrigar milhares de peixes (HILL *et al.*, 2005).

A alta taxa de fecundidade do peixe-zebra também se destaca, já que um par de peixes adultos é capaz de produzir de 200 a 300 ovos em uma única manhã, e se forem propriamente mantidos, são capazes de fornecer essa colheita a cada 5-7

dias. Os pares de peixes podem ser rotacionados, de forma a fornecer milhares de ovos diariamente durante o ano (HILL *et al.*, 2005).

Há mais de dez anos o peixe-zebra é amplamente utilizado em pesquisas e desenvolvimento em neoplasias, doenças cardíacas, disfunções neurológicas, doenças comportamentais e para observar mutações provenientes da exposição a novas moléculas (DOKE *et al.*, 2013).

1.2 PEIXE-ZEBRA NA PESQUISA DE TOXICIDADE

O objetivo dos estudos toxicológicos é prever possíveis efeitos adversos e agravos que possam surgir da exposição humana à dada substância química, podendo se tratar de um medicamento, agente químico industrial ou pesticida, sendo principalmente utilizados os modelos animais nessas pesquisas (MAYER, 2003).

A avaliação da toxicidade de um composto é uma etapa importante para entender o perfil de segurança de um novo medicamento e imunobiológicos e muitos candidatos a novos fármacos falham nos testes pré-clínicos devido aos efeitos adversos causados. Quando comparado com os testes em mamíferos, o peixe-zebra possui diversas vantagens experimentais em testes de toxicidade. Neste contexto, a agência *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos aceita o uso do peixe-zebra como modelo animal para avaliação da segurança e toxicidade e aprovação de novos medicamentos (HE *et al.*, 2014). A agência FDA dos Estados Unidos é responsável pela regulamentação e garantia da eficácia, segurança e proteção de medicamentos humanos e veterinários, produtos biológicos e dispositivos médicos, além de garantir segurança de alimentos e cosméticos (FDA, 2018).

O grande potencial de uso do peixe-zebra para triagem de novos fármacos é exemplificado no desenvolvimento de antimicrobianos, onde são usados embriões do peixe-zebra para avaliação de possíveis efeitos tóxicos de novos candidatos a fármacos (SCHIMITH *et al.*, 2018).

1.3 PEIXE-ZEBRA NA AVALIAÇÃO DE ECOTOXICIDADE

O termo ecotoxicidade reflete a preocupação com possíveis contaminantes no meio ambiente, podendo afetar outras espécies animais além do homem. Essa área estuda efeitos nocivos de produtos químicos que afetam todo o ecossistema (WALKER *et al.*, 2006). Nas últimas décadas a produção de agentes químicos vêm aumentando, sendo muitos deles potencialmente tóxicos aos humanos. Nesse sentido, a avaliação da toxicidade usando mamíferos é um processo trabalhoso e caro (HE *et al.*, 2014). Os testes de produtos químicos em embriões de peixe-zebra aumentaram nas últimas décadas, a tal ponto que rapidamente ocorreu a padronização internacional, e cada vez mais se busca a validação de novos métodos e ampliação da cobertura de substâncias analisadas nos testes de ecotoxicidade (LAMMER *et al.*, 2008; TSANG *et al.*, 2017; WATTS *et al.*, 2021).

Um tópico em evidência na área da ecotoxicidade é o estudo de compostos farmacêuticos no ambiente aquático, pois o acúmulo de produtos farmacêuticos no meio ambiente pode trazer efeitos adversos tanto em organismos aquáticos quanto terrestres. Assim, uma vez que sejam devidamente estabelecidos e elucidados esses efeitos, se torna possível estabelecer limites de concentração a serem aplicados no descarte seguro de efluentes (PASCHOA *et al.*, 2017).

1.4 RISCO DE VIÉS EM ESTUDOS EXPERIMENTAIS EM ANIMAIS

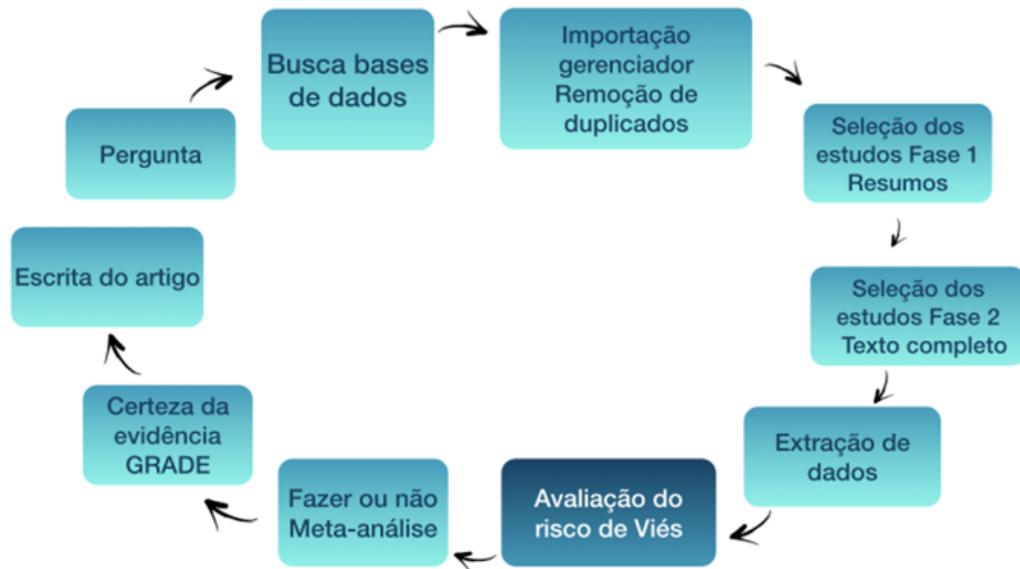
O estudo com modelos animais desempenha um papel essencial na ciência, porém é comum encontrar na literatura experimentos repetidos de forma desnecessária, algumas vezes antiéticos e com um desperdício de recursos. Sendo assim, revisões sistemáticas com ou sem meta-análises de estudos pré-clínicos representam um passo importante nesse processo de avaliação da qualidade metodológica. O viés é caracterizado como o produto de um equívoco sistemático no planejamento, execução ou análise estatística de um estudo, resultando em possíveis distorções nos resultados e comprometendo a validade do estudo (CANTO *et al.*, 2020). Os vieses e resultados imprecisos de experimentos animais podem resultar em testes clínicos de substâncias inertes ou até mesmo prejudiciais, tornando-se um risco desnecessário à saúde, além de desperdício de recursos muitas vezes escassos (AGUILAR-NASCIMENTO, 2005).

Nesse sentido, o rigor da qualidade metodológica desses estudos é uma característica importante para a confiabilidade nos resultados encontrados e na recomendação do uso de substâncias. No campo das ciências farmacêuticas, novas ferramentas têm sido desenvolvidas para análise de risco de viés da qualidade metodológica de estudos experimentais em animais, principalmente quando aplicadas em estudos secundários de revisão sistemática e em *guidelines* (ou manuais técnicos). Essa análise crítica do estudo experimental tem sido cada vez mais requisitada no âmbito científico, e já tem sido amplamente empregada para estudos que utilizam camundongos e ratos (OHAT, 2015; ROTH *et al.*, 2021).

Quando se trata de intervenções em saúde, problemas na concepção ou execução de estudos podem gerar dúvidas sobre a validade das descobertas feitas. O risco de viés também inclui a possibilidade de desviar os resultados do estudo do verdadeiro efeito, podendo o mesmo ser superestimado ou subestimado (BOUSTRON *et al.*, 2022).

Nesse contexto, as revisões sistemáticas surgem como uma abordagem de pesquisa científica que coleta os desfechos dos estudos primários a partir da formulação de uma questão específica, empregando abordagens sistemáticas para agrupar as informações, avaliando de forma crítica a qualidade das evidências (CANTO *et al.*, 2020). As revisões sistemáticas de estudo em animais apresentam evidências sobre como os resultados experimentais impactam os ensaios clínicos futuros, e podem ser consideradas um *driver* para melhorar a validade interna, a qualidade dos relatórios publicados e reduzir os vieses nas publicações dos estudos experimentais (SILVA *et al.*, 2012). A análise do risco de viés é uma das últimas etapas a serem executadas em uma revisão sistemática (Figura 4), sendo importante que seja realizada por ao menos dois revisores cegados, para garantir maior confiabilidade na avaliação (CANTO *et al.*, 2021).

Figura 4 – Esquema de desenvolvimento de uma revisão sistemática mostrando o momento da análise do risco de viés



Fonte: CANTO *et al.* (2021).

O risco de viés da qualidade metodológica de estudos experimentais com peixe-zebra tem sido pobremente reportado em revisões sistemáticas. Alguns autores têm utilizado a ferramenta SYRCLE RoB (*SYsystematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation*) (AMES *et al.*, 2022; Buenhombre *et al.*, 2021).

Por isso, esta revisão narrativa da literatura contextualiza a avaliação do risco de viés metodológico de estudos experimentais em peixe-zebra, a fim de verificar quais são as ferramentas utilizadas e ainda destacar as lacunas existentes na experimentação que poderiam impactar no nível da evidência.

2 JUSTIFICATIVA

O peixe-zebra tem sido considerado uma alternativa promissora para a pesquisa toxicológica por possuir similaridades quando comparado aos mamíferos, permitindo extrapolar os resultados a humanos mais diretamente do que outros modelos invertebrados e de maneira mais econômica quando comparado aos vertebrados, pois possui alta taxa de reprodutibilidade, baixo custo e fácil cultivo. Atualmente, existe uma vasta literatura de estudos primários com peixe-zebra, e poucos estudos secundários sendo realizados com síntese da evidência. Para isso, busca-se cada vez mais a qualidade metodológica das experimentações para assegurar as melhores evidências no âmbito da saúde. Para avaliar a qualidade e o nível da evidência dos estudos experimentais em animais existem ferramentas que permitem a verificação de itens pelos pesquisadores, como, por exemplo, o SYRCLE. Essas recomendações têm sido utilizadas para revisões sistemáticas de estudos em camundongos e ratos. Atualmente, a publicação de revisões sistemáticas com esse modelo animal ainda é escassa, sendo importante identificar as ferramentas que as revisões estão utilizando para avaliar os vieses desses estudos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a qualidade da evidência em estudos de revisão sistemática sobre toxicidade em peixe-zebra.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as ferramentas utilizadas para avaliação do risco de viés em estudos experimentais em peixe-zebra.
- Verificar o impacto da análise do viés no nível da evidência nas revisões sistemáticas em peixe-zebra.

4 METODOLOGIA

Este estudo trata-se de uma revisão narrativa da literatura, para a qual foi elaborada a seguinte pergunta científica: “Como tem sido avaliado o viés em estudos de toxicidade usando como modelo animal o peixe-zebra?”.

As buscas por artigos foram feitas na base de dados eletrônica do PubMed em agosto de 2023, utilizando o termo livre ‘*zebrafish*’ e aplicando o filtro por tipo de publicação (“*systematic review*” OR “*meta-analysis*”).

Foram recuperados os artigos completos sobre o tema, consultando também professores especialistas em revisão sistemática e experimentação animal para indicação de referências bibliográficas sobre o assunto. Não foi aplicado limite de tempo de publicação e foram recuperados apenas artigos em inglês.

Para a síntese narrativa, foram incluídas apenas as revisões que aplicaram alguma ferramenta para avaliação do risco de viés de estudos primários. Foram excluídos os estudos que não reportaram os vieses de qualidade metodológica, assim como aqueles que reportam apenas a qualidade do relatório publicado (Quadro 2).

Inicialmente, para a seleção dos estudos a serem incluídos na revisão, os estudos recuperados no PubMed foram gerenciados no website Rayyan QCRI (OUZANNI *et al.*, 2016). Os artigos secundários foram selecionados por dois pesquisadores não cegados a partir da leitura dos títulos e resumos, e posteriormente, pela leitura do texto na íntegra.

Quadro 1 - Critérios de exclusão

Critério de exclusão	Descrição
<i>Wrong population</i> População errada	Estudos não usam o peixe-zebra como modelo animal.
<i>Wrong intervention</i> Intervenção errada	Estudos não avaliam toxicidade (por exemplo> mecanismos relacionados a doenças).

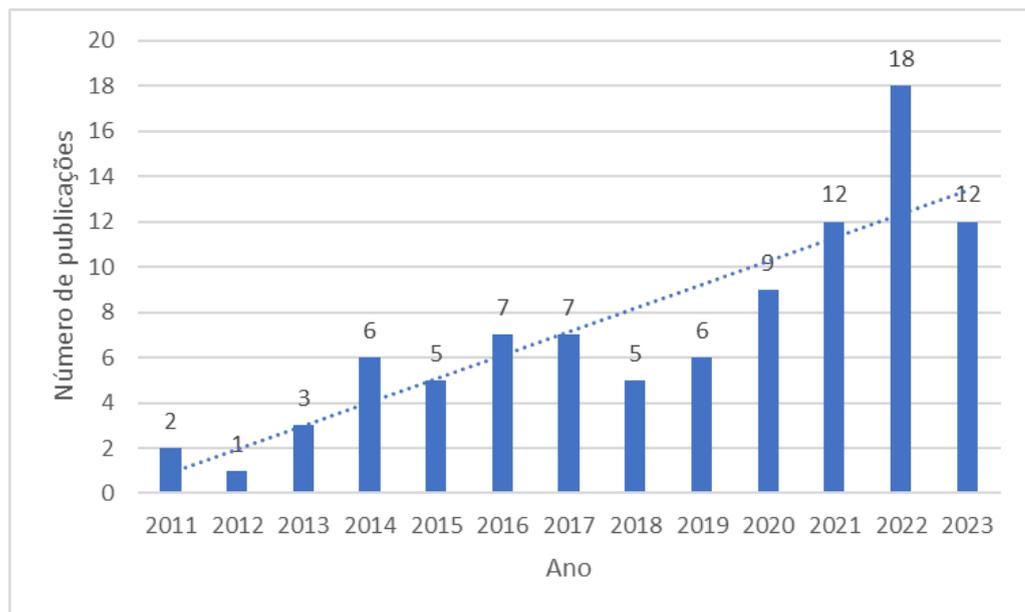
Critério de exclusão	Descrição
<i>Wrong outcome</i> Desfecho/resultado errado	Estudos não avaliam o viés metodológico.
<i>Wrong publication type</i> Tipo de publicação errado	Estudos não são revisão sistemática ou meta-análise.

Fonte: Elaborado pela autora.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, a busca por revisões sistemáticas e/ou meta-análises na base de dados Pubmed resultou em 83 estudos recuperados. Os primeiros estudos secundários neste tópico foram publicados em 2011, e desde então houve um aumento no número de publicações (Figura 5). Após realizar a leitura dos títulos e resumos dos artigos, foram selecionados 5 artigos que se encaixam nos requisitos de inclusão.

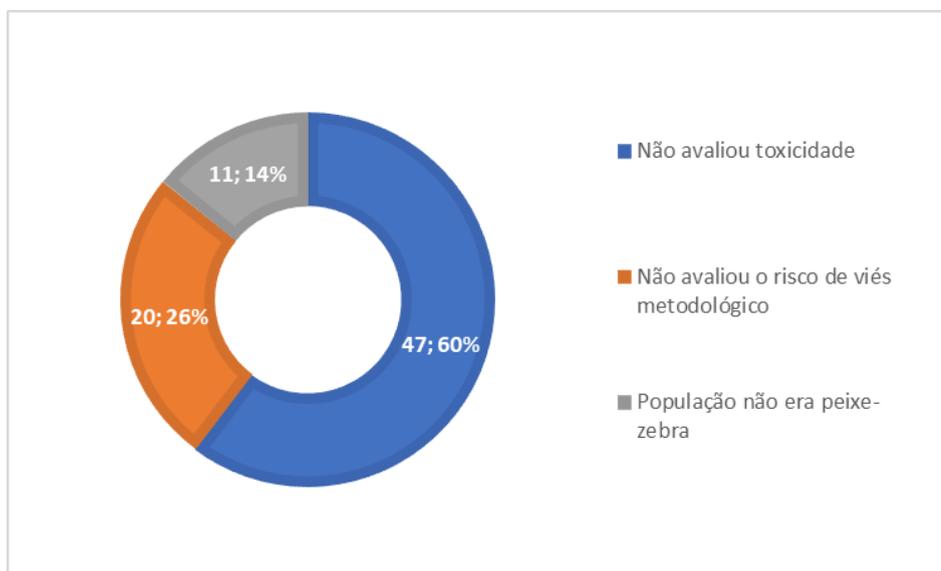
Figura 5 - Distribuição dos estudos recuperados no Pubmed com o termo livre peixe-zebra e filtros (revisão sistemática ou meta-análise).



Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de PubMed.

De 83 artigos recuperados, foram excluídos 78, sendo 47 por não avaliar a toxicidade (“*wrong intervention*” = intervenção “errada”), 20 por diferir do desfecho esperado (“*wrong outcome*” = resultado “errado”) e 11 por não se tratarem de estudos com peixe-zebra (“*wrong population*” = população “errada”) (Figura 6).

Figura 6 - Porcentagem de estudos de revisão sistemática excluídos de acordo com o critério de exclusão



Fonte: Elaborado pela autora.

Das cinco revisões sistemáticas incluídas nesta revisão (AMES *et al.*, 2022; HOFFMANN *et al.*, 2021; SOUZA-SILVA *et al.*, 2022; STEPHENS *et al.*, 2019; THAKKAR *et al.*, 2022), três (HOFFMANN *et al.*, 2021; SOUZA-SILVA *et al.*, 2022; STEPHENS *et al.*) registraram o protocolo da revisão na base de dados *International Prospective Register of Systematic Reviews* (PROSPERO, Universidade de Oxford, Reino Unido) (SHAMSEER *et al.*, 2015) (Quadro 2). O protocolo garante que os métodos desta revisão sejam transparentes e reprodutíveis, além de ajudar a diminuir vieses que interfiram na qualidade metodológica da revisão e evitar a duplicidade de revisões (STEWART *et al.*, 2012). O registro exige que os revisores forneçam informações sobre 22 itens obrigatórios e mais 18 itens opcionais, incluindo informações administrativas (por exemplo, título e data de início), métodos da revisão sistemática (por exemplo, critérios de elegibilidade, métodos para coletar e tratar dados), e outras informações gerais (PAGE *et al.*, 2018).

A base de dados mais usada pelas revisões sistemáticas para buscar os estudos primários foi o PubMed, estando presente em todas as revisões selecionadas. Todos os estudos buscaram ao menos duas bases de dados, o que é recomendado para as revisões sistemáticas, uma vez que aumenta as chances de

incluir um estudo primário e alcançar uma maior representatividade dos estudos incluídos na revisão, e assim, ter maior confiabilidade na evidência gerada (HIGGINS *et al.*, 2011).

Nenhuma revisão selecionada utilizou a literatura cinzenta (Quadro 2). O termo literatura cinzenta refere-se às informações protegidas por direitos intelectuais que são produzidas em formato eletrônico ou impresso e que não são controladas pela publicação comercial (SCHOPFEL, 2010). A literatura cinzenta é importante, pois pode alencar resultados de publicações com desfechos negativos ou nulos, o que não é abordado em editores comerciais, que podem ter uma estratégia de publicação mais voltada ao lucro. Esse tipo de literatura também pode trazer resultados mais atuais, uma vez que a pesquisa publicada formalmente passa por um processo mais longo (PAEZ, 2017).

Quadro 2 - Características dos estudos de revisão sistemática sobre toxicidade em peixe-zebra

Referência	Número do Protocolo	Países Envolvidos na Publicação	Número de Estudos Incluídos	Base de Dados Principais	Literatura Cinzenta	PRISMA
Ames <i>et al.</i> , 2022	NR	Brasil	36 (16 incluídos na meta-análise)	1 PubMed 2 Science Direct	Não realizado	Sim
Hoffmann <i>et al.</i> , 2021	CRD42018096120	EUA, Brasil, Turquia, Bélgica, Canadá	32 estudos de ZET (<i>zebrafish embryo toxicity test</i>) 37 estudos em mamíferos	1 BIOSIS 2 Embase 3 PubMed 4 TOXLINE	Não realizado	Sim
Souza-Silva <i>et al.</i> , 2022	CRD42021234719	Brasil	28 no total 6 em peixe zebra	1 Pubmed/Medline 2 Scopus 3 Web of Science	Não realizado	Sim

Referência	Número do Protocolo	Países Envolvidos na Publicação	Número de Estudos Incluídos	Base de Dados Principais	Literatura Cinzenta	PRISMA
Stephens <i>et al.</i> , 2019	CRD42018096120	EUA, Turquia, Alemanha, Holanda, Canadá	1 em peixe zebra 12 em mamíferos	1 BIOSIS 2 Embase 3 PubMed 4 TOXLINE	Não realizado	Sim
Thakkar <i>et al.</i> , 2022	NR	Índia	17	1 PubMed 2 ZFIN	Não realizado	Não

Fonte: elaborado pela autora.

Quatro estudos conduziram a revisão sistemática de acordo com as recomendações PRISMA (AMES *et al.*, 2022; HOFFMANN *et al.*, 2021; SOUZA-SILVA *et al.*, 2022; STEPHENS *et al.*, 2019). A ferramenta PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) foi criada em 2009 e recebeu uma atualização em 2020, visando acompanhar as inovações e mudanças na condução das revisões sistemáticas (DOURADO *et al.*, 2022). A ferramenta tem como objetivo auxiliar os autores de revisões sistemáticas a relatarem de forma mais transparente os métodos e resultados de seus trabalhos e possui um checklist de 27 itens divididos em 7 tópicos principais (Figura 7) (PAGE *et al.*, 2021).

Figura 7 - Principais tópicos do PRISMA



Fonte: Dourado *et al.* (2022).

Do total de revisões selecionadas, duas (HOFFMANN *et al.*, 2021; STEPHENS *et al.*, 2019) utilizaram somente o embrião do peixe-zebra, duas (AMES *et al.*, 2022; THAKKAR *et al.*, 2022) utilizaram embrião, larva e adulto, e uma (SOUZA-SILVA *et al.*, 2022) utilizou apenas o peixe-zebra adulto entre 16 e 26 semanas.

Duas revisões selecionadas (HOFFMANN *et al.*, 2021; STEPHENS *et al.*, 2019) citam a utilização do ZET (zebrafish embryo toxicity test). O teste de toxicidade em embriões de peixe-zebra concentra-se em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, sendo considerado um modelo mais humano quando comparado ao teste em peixes-zebras adultos (ACHENBACH *et al.*, 2020). O ZET concentra-se nos primeiros dias após a fertilização, iniciando a exposição química no período de clivagem (0,7–2,2 horas pós fertilização [hpf]) e finalizando no período larval inicial (aproximadamente 72-120 horas pós fertilização [hpf]) (HOFFMANN *et al.*, 2021).

Apenas uma das cinco revisões (STEPHENS *et al.*, 2019) não reportou a dose utilizada. As quatro revisões que reportaram (AMES *et al.*, 2022; HOFFMANN *et al.*, 2021; SOUZA-SILVA *et al.*, 2022; STEPHENS *et al.*, 2019; THAKKAR *et al.*, 2022) utilizaram diferentes doses, sendo a menor 0,00000852 uM e a maior 400 mg/L. Uma revisão (AMES *et al.*, 2022) reportou que 17 dos 36 estudos incluídos realizaram reposição da dose.

Para estabelecer a dose tóxica de um produto químico, é de suma importância o relato dessas concentrações nos estudos pré-clínicos. As recomendações sobre análise da qualidade evidência de estudos *in vivo* destacam que, além da concentração/dose do fármaco utilizada, é importante relatar o tempo de exposição dos animais aos compostos (WASPE *et al.*, 2021).

Uma revisão (THAKKAR *et al.*, 2022) não reportou o tempo de exposição dos estudos, as outras quatro revisões (AMES *et al.*, 2022; HOFFMANN *et al.*, 2021; SOUZA-SILVA *et al.*, 2022; STEPHENS *et al.*, 2019) reportaram entre 0 a 21 dias de exposição (Quadro 3).

Quadro 3 - Características da população de peixe-zebra estudada, intervenção e desfechos investigados

Referência	População do Peixe-Zebra	Intervenção	Dose	Reposição	Tempo de Exposição	Desfechos investigados
Ames <i>et al.</i> , 2022	Embrião, larva e adulto	Exposição ao glifosato	0,00005 até 400 mg/L, diluído em meio de cultura ou água (Milli Q por exemplo)	17/36 fizeram reposição	30 minutos a 672 h	Mortalidade (hpf, horas após a fertilização)
Hoffmann <i>et al.</i> , 2021	Embrião	Toxicidade de 75 compostos selecionados aleatoriamente e elencadas numa lista de referência. Ex: acetaminofeno, ácido valproico, cafeína, .	A dose foi reportada pelos estudos em μM 0,000008 a 24,400	NR	De 0 a 120 hpf	Teste de concentração mínima para: Mortalidade Embriotoxicidade geral Embriotoxicidade específica
Souza-Silva <i>et al.</i> , 2022	Adulto (entre 16 e 26 semanas)	Resposta da microbiota intestinal à exposição aos microplásticos	50 $\mu\text{g/L}$ a 40 mg/L	NR	7, 14 ou 21 dias	Mortalidade, mudança no tamanho do corpo e microbiota afetada
Stephens <i>et al.</i> , 2019	Embrião	Potencial de 7 substâncias para toxicidade aguda e toxicidade cardiovascular, bem como desenvolvimento de toxicidade mental.	NR	NR	48 a 120 hpf	Potencial de um produto químico causar efeitos adversos relevantes no desenvolvimento pré-natal. Se o produto químico foi negativo, ou seja, não embriotóxico no ZET ou ausência de resultados adversos no exame fetal dos estudos em mamíferos, ou positivo, ou seja, embriotóxico no ZET ou presença de resultados adversos nos exames fetais de mamíferos.

Referência	População do Peixe-Zebra	Intervenção	Dose	Reposição	Tempo de Exposição	Desfechos investigados
Thakkar <i>et al.</i> , 2022	Larva, embrião e adulto	Impacto cardíaco e neurológico dos EDCs	0,01 µM a 1000 µM 0,2 a 1,8 mg/mL 0,5 a 20 µg/L 0,5 a 75 ng/L 0,1 a 110 ppb	NR	NR	Resultados relacionados às funções cardíacas e neurológicas

Fonte: elaborado pela autora.

Das cinco revisões selecionadas, uma (AMES *et al.*, 2022) realizou meta-análise. A revisão analisou a toxicidade do glifosato, substância amplamente utilizada em herbicida na prática agrícola, concluindo que diversas condições foram afetadas no peixe-zebra, induzindo aumento da mortalidade nas fases embrionária e larval, causando má formação no organismo e afetando a eclosão e frequência cardíaca, além de danos bioquímicos e comportamentais na fase adulta do ciclo de vida do peixe-zebra, sendo considerado tóxico. Dentre as limitações reportadas pelo autor está o pequeno número de estudos contemplados com dificuldade de comparação entre eles. Além disso, o autor relata que reconhece a diferença entre os herbicidas a base de glifosato e a substância glifosato pura, e que, em alguns casos, é difícil dizer se os efeitos tóxicos foram advindos de substâncias adjuvantes presentes no herbicidas ou do glifosato em si (AMES *et al.*, 2022).

Duas revisões (HOFFMANN *et al.*, 2021; STEPHENS *et al.*, 2019) buscavam demonstrar se há relação entre resultados de toxicidade de produtos químicos no desenvolvimento pré-natal em ratos e coelhos e no ZET. Ambas (HOFFMANN *et al.*, 2021; STEPHENS *et al.*, 2019) concluíram que a toxicidade apresentada em ratos e coelhos também poderia ser observada no ZET, porém uma revisão relatou possível superestimação dos resultados positivos em peixe-zebra, requerendo maior padronização do método (HOFFMANN *et al.*, 2021).

As limitações reportadas foram relacionadas com o baixo número de substâncias incluídas nos estudos, o que pode ter sido em razão dos critérios muito restritos, porém o autor relata que menos critérios resultariam em outros problemas (HOFFMANN *et al.*, 2021). No outro estudo, foram reportadas limitações relativas à qualidade dos relatórios e a dificuldade de extração de dados, além da seleção da evidência devido à diversidade dos resultados (STEPHENS *et al.*, 2019).

Os produtos químicos exógenos conhecidos por interferir no funcionamento normal do sistema neuroendócrino do corpo, como o bisfenol A e o triclosan, também foram avaliados quanto à sua toxicidade. Nos dados dos estudos selecionados pela revisão, foi possível concluir que todos os EDCs (desreguladores endócrinos) testados afetam o neurocomportamento, causando ansiedade, hiperatividade, medo e estresse. Alguns EDCs ainda causam defeitos na locomoção e velocidade de natação (THAKKAR *et al.*, 2022).

Para avaliar o impacto dos microplásticos na microbiota intestinal e as alterações morfofuncionais envolvendo a mucosa intestinal, foram usados estudos primários em peixe-zebra e ratos. A utilização de mais de um modelo animal é interessante, pois possibilita avaliar os efeitos em diferentes microbiotas intestinais, tendo sido o peixe-zebra o modelo animal mais utilizado nos estudos primários, seguido pelo rato. Os resultados mostraram potencial desencadeamento de disbiose, caracterizada pelo enriquecimento de *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Chlamydia*, enquanto houve uma redução de *Bacteroidetes*, e alterações na mucosa intestinal (SOUZA-SILVA *et al.*, 2022).

Houveram dois estudos nos quais os autores não reportaram limitações (SOUZA-SILVA *et al.*, 2022; THAKKAR *et al.*, 2022).

Quadro 4 - Principais resultados e limitações dos estudos incluídos na revisão

Referência	Principais Resultados	Meta-análise	Limitações Reportadas
Ames <i>et al.</i> , 2022	<p>Glifosato afeta mortalidade e incubação de embriões de peixe zebra;</p> <p>Causa má formação e anormalidades estruturais em embriões;</p> <p>Altera o ritmo cardíaco em embriões;</p> <p>Altera a capacidade antioxidante contra radicais peróxido em peixes adultos;</p> <p>Altera o comportamento em peixes adultos.;</p>	<p>Todos os estudos mostraram toxicidade no estágio embrionário e larval . A toxicidade está relacionada à concentração utilizada, quanto maior a concentração, maior a toxicidade.</p>	<p>Os dados incluíram um pequeno número de estudos, o que pode criar dificuldades de comparação; Devido ao número pequeno de estudos comparáveis, não foi possível separar os efeitos do glifosato no GBH ou substância ativa.</p>
Hoffmann <i>et al.</i> , 2021	<p>ZET possui potencial para identificar produtos químicos que já se mostraram tóxicos para o desenvolvimento pré-natal de ratos e coelhos, porém esse teste possui uma tendência de superestimar resultados negativos como sendo positivos, requerendo maior padronização do método.</p>	NA	<p>O maior número de substâncias químicas incluídas implicaria em maior confiança, porém as substâncias foram selecionadas de forma não aleatória, considerando aqueles que haviam sido bem estudadas para toxicidade no desenvolvimento pré natal, possivelmente introduzindo um viés. O autor supôs que dessa forma seria recuperado um alto número de substâncias, porém não foi o que aconteceu.</p> <p>Fatores associados ao número baixo de substâncias recuperadas foram: rigor nos critérios de elegibilidade e exclusão de bases de dados regulatórias das fontes de informação.</p>

Referência	Principais Resultados	Meta-análise	Limitações Reportadas
Souza-Silva <i>et al.</i> , 2022	MPs são potenciais desencadeantes da disbiose intestinal, que se caracterizou pelo aumento do desenvolvimento de <i>Firmicutes</i> , <i>Proteobacteria</i> e <i>Chlamydia</i> , enquanto o <i>Bacteroidetes filo</i> teve significativa redução. Como consequência de um material tóxico e o estado de disbiose conferido pelos MPs, alterações imunológicas, estruturais e morfofuncionais na mucosa intestinal foram encontradas em animais alimentados com MPs.	NA	NR
Stephens <i>et al.</i> , 2019	Foi possível encontrar estudos em mamíferos para comparação apenas para 2 das 7 substâncias testadas no estudo de ZET incluído. Essas 2 substâncias mostraram uma relação de resultados ao tratamento em peixe zebra e mamíferos..	NA	Formular a questão de pesquisa, procurar e selecionar as evidências, extrair e analisar os dados, má qualidade dos relatórios.
Thakkar <i>et al.</i> , 2022	Os artigos citados reúnem dados sobre EDCs. Todos eles afetam o neurocomportamento, causando ansiedade, hiperatividade, hipoatividade, medo ou estresse. A maioria também afeta a locomoção e velocidade de natação, distância e tempo gasto em movimento.	NA	NR

Fonte: elaborado pela autora.

A ferramenta para análise do risco de viés mais utilizada pelos estudos selecionados foi SYRCLE, sendo utilizada por quatro dos cinco estudos (AMES *et al.*, 2022; HOFFMANN *et al.*, 2021; SOUZA-SILVA *et al.*, 2022; STEPHENS *et al.*, 2019). Um estudo utilizou domínios alternativos e o autor não citou uma ferramenta específica (THAKKAR *et al.*, 2022).

Baseada na *Cochrane Collaboration RoB Tool*, utilizada para avaliação de risco de viés para estudos clínicos randomizados, o objetivo principal da ferramenta SYRCLE RoB é avaliar a qualidade metodológica de estudos de intervenção com

animais. A partir da ferramenta SYRCLE RoB, é possível avaliar seis tipos de viés: viés de seleção, viés de performance, viés de detecção, viés de atrito, viés de relatório e outros tipos de vieses (Quadro 1) (HOOIJMANS *et al.*, 2014).

Quadro 5 - Vieses avaliados pela ferramenta SYRCLE RoB.

Item	Tipo de Viés	Domínio	Descrição do Domínio	Julgamento dos Autores da Revisão
1	Viés de Seleção	Geração de Sequência	Descreve os métodos usados, se houver, para gerar a sequência de alocação com detalhes suficientes para permitir uma avaliação se produzirá grupos comparáveis	A sequência de alocação foi adequadamente gerada e aplicada?
2	Viés de Seleção	Características Base	Descreve todos os possíveis fatores prognósticos ou características dos animais, se houver, que são comparadas a fim de julgar se a intervenção e os grupos de controle eram semelhantes no início do experimento.	Os grupos eram semelhantes quanto às características de base ou foram ajustados os fatores de confusão na análise?
3	Viés de Seleção	Ocultação de Alocação	Descreve o método usado para ocultar a sequência de alocação com detalhes suficientes para determinar se intervenções de alocação poderiam ter sido previstas antes ou durante o registro.	A alocação foi adequadamente escondida?
4	Viés de Performance	Habitação Aleatória	Descreve todas as medidas utilizadas, se houver, para abrigar os animais aleatoriamente dentro da sala de manutenção dos animais.	Os animais foram aleatoriamente abrigados durante o experimento?
5	Viés de Performance	Cegamento	Descreve todas as medidas usadas, se houver, para cegar os cuidadores e pesquisadores sobre qual intervenção o animal recebeu.	Os cuidadores e/ou investigadores foram cegados sobre qual intervenção cada animal recebeu durante o experimento?

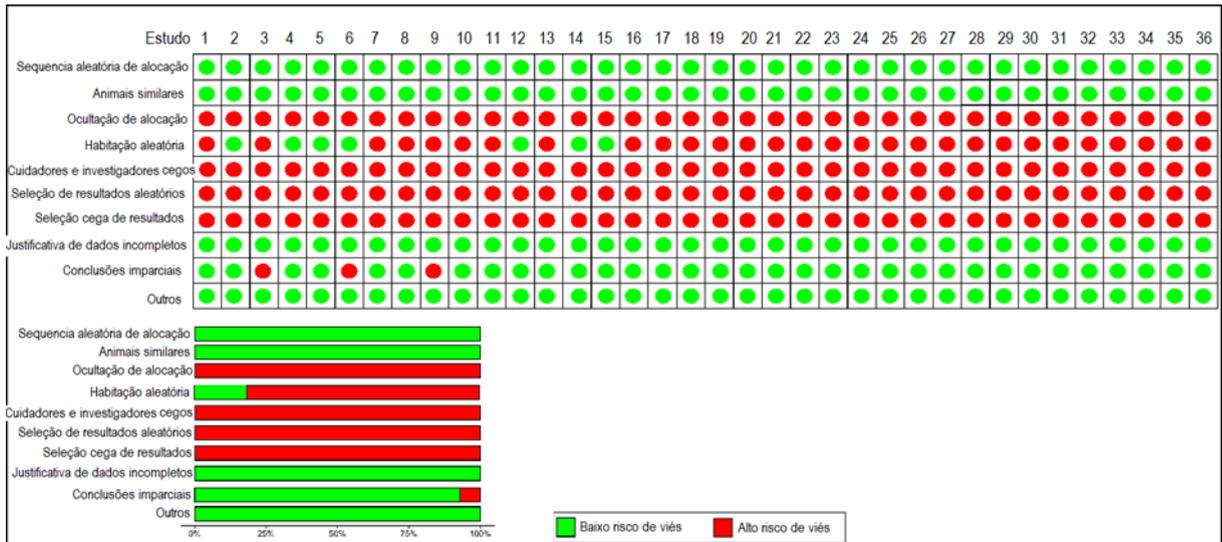
Item	Tipo de Viés	Domínio	Descrição do Domínio	Julgamento dos Autores da Revisão
6	Viés de Detecção	Avaliação de Resultado Aleatório	Descreve se os animais foram ou não selecionados aleatoriamente para avaliação do resultado, e que métodos para selecionar os animais foram usados, se houver.	Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação dos resultados?
7	Viés de Detecção	Cegamento	Descreve todas as medidas usadas, se houver, para cegar os avaliadores dos resultados sobre qual intervenção cada animal recebeu. Fornecer qualquer informação relativa a efetividade do cegamento.	O avaliador dos resultados foi cegado?
8	Viés de Atrito	Dados dos Resultados Incompletos	Descreve a integridade dos dados para cada resultado principal, incluindo atrito e exclusões da análise. Estabelece se os atritos e exclusões foram relatados, os números em cada grupo de intervenção (em comparação com o total de animais randomizados), razões pra atrito ou exclusão e qualquer reinclusões em análises para a revisão.	Os dados de resultados incompletos foram tratados adequadamente?
9	Viés de Relatório	Relatório de Resultados Selecionados	Estabelece como o relatório de resultados seletivos foi examinado e o que foi encontrado.	Os resultados do estudo são livres de relatórios com dados seletivos?
10	Outros	Outras Fontes de Vieses	Estabelece quaisquer preocupações importantes sobre vieses não cobertos por outros domínios na ferramenta.	O estudo foi aparentemente livre de outros problemas que podem resultar em alto risco de viés?

Fonte: Adaptado de HOOIJMANS *et al.* (2014).

Ao final da avaliação do risco de viés, o mesmo pode ser apresentado como figuras esquemáticas semelhantes às da Cochrane (Figura 8). Nesse esquema é apresentado o risco de viés "alto" ou "baixo" para cada domínio avaliado quanto ao

risco de viés em cada estudo individual e entre os estudos, respectivamente (AMES *et al.*, 2022).

Figura 8 – Exemplo de avaliação de risco de viés da qualidade metodológica de estudos individuais e entre os estudos utilizando a ferramenta SYRCLE RoB, em uma revisão sistemática.



Fonte: Adaptado de AMES *et al.* (2022).

A implementação desse tipo de ferramenta facilita a avaliação crítica das evidências de estudos com animais, resultando em uma maior otimização de quais estudos são melhores candidatos a evoluir para a fase de pesquisa clínica (HOOIJMANS *et al.*, 2014).

A primeira revisão analisou o risco de viés através de dez domínios do SYRCLE. Todos os estudos primários utilizados nesta revisão apresentaram ao menos 4 tipos de vieses, sendo eles: distribuição aleatória dos animais; investigadores e cuidadores cegados; seleção aleatória dos resultados e seleção cegada dos resultados. Dos estudos, 80% apresentaram alto risco de viés na alocação aleatória e 8% apresentaram alto risco de viés nas conclusões (AMES *et al.*, 2022).

A segunda revisão analisou oito critérios do SYRCLE e todos os domínios investigados foram afetados em ao menos um dos estudos. Os resultados encontrados demonstraram que muitos estudos primários não reportaram alguns

dos domínios investigados: 46,88% não reportaram se os grupos foram ajustados por confundidores; 93,75% não reportaram se a alocação foi adequada; 96,88% não reportaram se os embriões foram mantidos em condições homogêneas; 96,88% não reportaram se os investigadores foram cegados; 100% não reportaram randomização da ordem dos embriões; 96,88% não reportaram se a avaliação dos resultados foi cegada e 93,75% não reportaram a rastreabilidade dos embriões. O domínio de ajuste dos embriões por confundidores apresentou alto risco de viés em 3,13% dos estudos primários, sendo o único domínio a apresentar alto risco (HOFFMANN *et al.*, 2021).

A terceira revisão selecionada analisou dez domínios do SYRCLE. Todos os estudos apresentaram ao menos um domínio analisado afetado. Dentre os 6 estudos primários selecionados pela revisão que utilizaram como modelo animal o peixe-zebra, nenhum foi claro quanto à ocultação da alocação dos grupos; 4 estudos não foram claros e 2 estudos possuíam alto risco de viés quanto ao cegamento do avaliador de resultados; apenas 2 estudos selecionaram os animais aleatoriamente para avaliação dos resultados; todos os estudos apresentaram risco de viés baixo para apresentação de dados incompletos e relatórios com resultados selecionados (SOUZA-SILVA *et al.*, 2022).

A quarta revisão usou ferramentas para estudos em animais e estudos pré-clínicos em animais, combinando 8 domínios do SYRCLE com mais 3 domínios analisados. Os domínios investigados foram selecionados para contemplar estudos em peixe-zebra e em mamíferos, uma vez que até a publicação da revisão não havia uma ferramenta específica. Para estudos com o peixe-zebra, todos os domínios do SYRCLE foram tidos como inconclusivos. Sobre os critérios de viés de relatório, não foi mencionado o poder amostral e se os estudos foram randomizados e cegados (STEPHENS *et al.*, 2019).

A última revisão selecionada não deixa claro qual foi a ferramenta usada para análise do viés, usando oito critérios de estudos em animais. Todos os estudos selecionados pela revisão apresentaram ao menos um domínio afetado. O domínio que apresentou risco de viés no maior número de estudos foi se os peixes foram separados em macho e fêmea. Alguns domínios não foram afetados em nenhum estudo, como uma exposição própria de EDCs dada aos peixes; tempo de exposição

foi mencionado; concentração de exposição foi mencionada e estágio da exposição foi mencionado (THAKKAR *et al.*, 2022).

No quadro 6 é possível observar uma síntese dos estudos e as ferramentas utilizadas, bem como os domínios afetados em cada estudo.

Quadro 6 - Avaliação da qualidade metodológica dos estudos de revisão sistemática

Referência	Instrumento do risco de viés metodológico	Domínios afetados
Ames <i>et al.</i> , 2022	SYRCLE	Alocação cegada; alocação aleatória; investigador e cuidador cegado; seleção aleatória dos resultados; seleção cegada dos resultados; conclusões imparciais.
Hoffmann <i>et al.</i> , 2021	SYRCLE	Grupos com características similares ou ajustados por confundidores; Alocação adequada; Os embriões mantidos em condições homogêneas; Investigador cegado; Avaliador dos resultados cegado; Todos os embriões são rastreáveis do início do experimento à avaliação dos resultados.
Souza-Silva <i>et al.</i> , 2022	SYRCLE	Sequência de alocação aleatória; Cegamento da alocação; Animais alocados aleatoriamente; Cuidadores/investigadores cegados; Animais selecionados aleatoriamente para avaliação; Avaliador cegado; Outros vieses;
Stephens <i>et al.</i> , 2019	11 critérios usados, sendo 8 do SYRCLE e 3 de relatórios (randomização, cegamento e cálculo do tamanho da amostra)	Grupos com características similares ou ajustados por confundidores; Sequência de alocação gerada e aplicada adequadamente; Alocação cegada; Cuidadores/investigadores cegados; Animais selecionados aleatoriamente para avaliação dos resultados; Avaliação dos resultados cegada; Dados incompletos devidamente abordados.
Thakkar <i>et al.</i> , 2022	Não deixa clara a ferramenta	Um grupo controle foi considerado? Foi mencionado um grupo controle para os solventes? Os peixes foram divididos entre macho e fêmea? A cepa foi mencionada?

Fonte: elaborado pela autora.

É possível realizar uma análise de todos os domínios analisados nas revisões sistemáticas, demonstrando quais apresentaram mais problemas (Quadro 7). Alguns domínios foram afetados em 100% das revisões nas quais foram analisados. Isso

significa dizer que, nas revisões sistemáticas que analisaram esse domínio, ao menos um estudo primário apresentou alto risco de viés ou não reportou o domínio analisado.

Quadro 7 - Domínios afetados nas revisões sistemáticas

Domínio	Domínio de qual ferramenta?	Em quantas revisões foi analisado?	Em quantas revisões foi afetado?	Quanto % de revisões apresentaram esse domínio afetado
Sequência de alocação aleatória	SYRCLE	4	3	75%
Alocação aleatória	SYRCLE	3	2	66%
Grupos de animais similares	SYRCLE	4	3	75%
Alocação cegada	SYRCLE	4	4	100%
Investigadores e cuidadores cegados	SYRCLE	4	4	100%
Seleção aleatória dos resultados	SYRCLE	3	3	100%
Seleção cegada dos resultados	SYRCLE	4	4	100%
Justificativa de dados incompletos	SYRCLE	3	2	67%
Conclusões imparciais	SYRCLE	2	2	100%
Outros	SYRCLE	2	1	50%
Alocação adequada ao peixe-zebra	Outro	1	1	100%
Embriões em condições homogêneas	Outro	1	1	100%
Rastreabilidade dos embriões	Outro	1	1	100%
Exposição apropriada de EDCs aos peixes	Outro	1	0	0%
Grupo controle considerado	Outro	1	1	100%

Domínio	Domínio de qual ferramenta?	Em quantas revisões foi analisado?	Em quantas revisões foi afetado?	Quantos % de revisões apresentaram esse domínio afetado
Grupo controle para os solventes	Outro	1	1	100%
Peixes separados entre macho e fêmea	Outro	1	1	100%
Tempo de exposição foi mencionado	Outro	1	0	0%
Concentração de exposição mencionada	Outro	1	0	0%
Estágio de exposição mencionado	Outro	1	0	0%
Tipo de cepa mencionada	Outro	1	1	100%

Em relação ao nível de evidência, nenhum estudo fez uso do GRADE (*Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluations*). A aplicação do GRADE permite graduar o nível de evidência em quatro categorias: alta, moderada, baixa e muito baixa (Quadro 8). Para melhor avaliação, é preciso levar em consideração o risco de viés dos estudos primários, as inconsistências nos resultados, evidência indireta, viés de publicação, entre outros (HIGGINS *et al.*, 2019).

Quadro 8 - níveis de evidência de acordo com o sistema GRADE

Nível	Definição	Implicações
Alto	Há forte confiança de que o verdadeiro efeito esteja próximo daquele estimado	É improvável que trabalhos adicionais irão modificar a confiança na estimativa do efeito.
Moderado	Há confiança moderada no efeito estimado.	Trabalhos futuros poderão modificar a confiança na estimativa de efeito, podendo, inclusive, modificar a estimativa

Nível	Definição	Implicações
Baixo	A confiança no efeito é limitada.	Trabalhos futuros provavelmente terão um impacto importante em nossa confiança na estimativa de efeito.
Muito baixo	A confiança na estimativa de efeito é muito limitada. Há um importante grau de incerteza nos achados.	Qualquer estimativa de efeito é incerta.

Fonte: adaptado de GRADE working group.

Mais de 110 organizações de 19 países ao redor do mundo fazem uso do GRADE, dentre elas encontra-se a OMS (Organização Mundial da Saúde), NICE (*National Institute for Health and Clinical Excellence*), CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) e colaboração Cochrane (GRADE WORKING GROUP). Como é possível observar no Quadro 9, ainda há uma escassa utilização desta ferramenta em revisões sistemáticas de estudos de toxicidade em peixe-zebra.

Quadro 9 - Nível de evidência e outros

Referência	Viés de publicação	GRADE	Financiamento	Conflito de interesse
Ames <i>et al.</i> , 2022	Sim	Não	Reportou como financiado.	Reportou que não há conflito de interesse
Hoffmann <i>et al.</i> , 2021	Não	Não	Reportou como financiado.	Reportou que não há conflito de interesse.
Souza-Silva <i>et al.</i> , 2022	Não	Não	Reportou como financiado.	Reportou que não há conflito de interesse.
Stephens <i>et al.</i> , 2019	Não	Não	Reportou como financiado.	Reportou que não há conflito de interesse.
Thakkar <i>et al.</i> , 2022	Não	Não	Reportou como não financiado.	Reportou que não há conflito de interesse.

Fonte: elaborado pela autora.

Quando os autores declaram conflitos de interesse, demonstram responsabilidade ética e contribuem para a confiabilidade da revisão sistemática, o que fortalece a evidência na área de pesquisa (MOHER et al., 2009). Todas as 5 revisões selecionadas reportaram que não houve conflito de interesse, o que é caracterizado por circunstâncias que colocam em risco o julgamento profissional ou influenciam as ações indevidamente por um interesse (HIGGINS et al., 2019). Apenas uma revisão (THAKKAR et al., 2022) reportou que não houve financiamento, as demais reportaram que foram financiadas.

6 CONCLUSÃO

Poucos estudos de revisão sistemática publicados sobre pesquisas de toxicidade em peixe-zebra avaliaram o risco de viés dos estudos primários. Apesar do número limitado de revisões sistemáticas incluídas, as mesmas foram conduzidas com um bom rigor metodológico, já que a maioria utilizou a ferramenta PRISMA e registrou protocolo na PROSPERO e todas utilizaram mais de duas base de dados. As revisões sistemáticas apresentadas reportaram toxicidade dos compostos estudados em embriões, larvas ou adultos de peixe-zebra, e também demonstraram o potencial do peixe-zebra de substituir mamíferos como modelos animais na pesquisa pré-clínica.

Para os estudos futuros, os pesquisadores devem procurar melhorar o cegamento da alocação e dos investigadores e cuidadores, selecionar aleatoriamente os resultados e de forma cegada, justificar propriamente os dados incompletos apresentados, concluir de forma parcial os resultados, tendo sido esses os domínios mais afetados nas análises.

Apesar do SYRCLE ter sido a ferramenta mais utilizada pelas revisões sistemáticas, também foram utilizados domínios alternativos, como o estágio do ciclo de vida em que o peixe-zebra foi exposto ao produto químico, a cepa do peixe-zebra e se foram separados entre macho e fêmea. Ainda não existe uma ferramenta própria para estudos com peixe-zebra, porém esses domínios podem ser importantes para discussões futuras nessa área, uma vez que são fatores que podem influenciar os resultados.

É possível dizer que a ferramenta SYRCLE é a mais utilizada atualmente para analisar o risco de viés em estudos de toxicidade com peixe-zebra. Outros domínios não contemplados pela ferramenta, como os citados anteriormente, precisam passar por validação para avaliar se devem ou não ser incluídos na análise do risco de viés. Esses domínios podem ser interessantes para aumentar a qualidade metodológica dos estudos e, futuramente, criar ferramentas que se apliquem especificamente para o modelo animal peixe-zebra.

REFERÊNCIAS

ABREU, Clarice Lima do Canto; PRESGRAVE, Octavio Augusto França; DELGADO, Isabella Fernandes. Metodologias Alternativas à Experimentação Animal: Aplicação no Controle da Qualidade de Produtos sujeitos à Ação da Vigilância Sanitária. **Revista Cfmv**, Brasília, v. 45, p. 15-23, mar. 2009.

ACHENBACH, John C.; LEGGIADRO, Cindy; SPERKER, Sandra A.; WOODLAND, Cindy; ELLIS, Lee D.. Comparison of the Zebrafish Embryo Toxicity Assay and the General and Behavioral Embryo Toxicity Assay as New Approach Methods for Chemical Screening. **Toxics**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 126, 21 dez. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxics8040126>.

AGUILAR-NASCIMENTO, José Eduardo de. Fundamental steps in experimental design for animal studies. **Acta Cirurgica Brasileira**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 2-3, fev. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-86502005000100002>.

AMES, Jaíne; MIRAGEM, Antônio Azambuja; CORDEIRO, Marcos Freitas; CEREZER, Felipe Osmari; LORO, Vania Lucia. Effects of glyphosate on zebrafish: a systematic review and meta-analysis. **Ecotoxicology**, [S.L.], v. 31, n. 8, p. 1189-1204, 5 set. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-022-02581-z>.

BENNET, Albert F.. **Activity metabolism of the lower vertebrates**. California: Ann. Rev. Physiol., 1978.

BOUTRON, Isabelle; PAGE, Matthew J; HIGGINS, Julian Pt; ALTMAN, Douglas G; LUNDH, Andreas; HRÓBJARTSSON, Asbjørn. Considering bias and conflicts of interest among the included studies. **Cochrane Handbook For Systematic Reviews Of Interventions**, [S.L.], p. 177-204, 20 set. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/9781119536604.ch7>.

BUENHOMBRE, Jhon; DAZA-CARDONA, Erika Alexandra; SOUSA, Pêssi; GOUVEIA, Amauri. Different influences of anxiety models, environmental enrichment, standard conditions and intraspecies variation (sex, personality and strain) on stress and quality of life in adult and juvenile zebrafish: a systematic review. **Neuroscience**

& **Biobehavioral Reviews**, [S.L.], v. 131, p. 765-791, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.09.047>.

CANEDO, Aryelle; SAIKI, Patrícia; SANTOS, Andressa Liberal; CARNEIRO, Karla da Silva; SOUZA, Andreza Martins de; QUALHATO, Gabriel; BRITO, Rafaella da Silva; MELLO-ANDRADE, Francielli; ROCHA, Thiago Lopes. Zebrafish (Danio rerio) meets bioethics: the 10rs ethical principles in research. **Ciência Animal Brasileira**, [S.L.], v. 23, 2022. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1809-6891v22e-70884>.

CANTO, Graziela de Luca; PORPORATTI, André; MENDES, Beatriz; MASSIGNAN, Carla; FLORES-MIR, Carlos; CASETT, Elora; PORFÍRIO, Gustavo José Martiniano ; POLMANN, Helena; PORTO DE TOLEDO, Isabela; RÉUS, Jéssica Conti; DE OLIVEIRA, Júlia Meller; DUTRA-HORSTMANN, Kamile Leonardi; MEZZOMO, Luís André; SAVI, Maria Gorete Monteguti; BOLAN, Michele; PAULETTO, Patrícia ; PACHECO-PEREIRA, Camila; MARTINS, Carolina Castro; GUERRA, Eliete; MELO, Gilberto. **Revisões sistemáticas da literatura: guia prático**. 1. ed. Curitiba: Brazil Publishing, 2020.

DOKE, Sonali K.; DHAWALE, Shashikant C.. Alternatives to animal testing: a review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 223-229, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>.

DOURADO, Andréa da Silva. **PRISMA 2020 – checklist para relatar uma revisão sistemática**. 2022. Disponível em: <https://eme.cochrane.org/prisma-2020-checklist-para-relatar-uma-revisao-sistemica/>. Acesso em: 15 nov. 2023.

FDA, U.S. Food & Drug Administration. **What we do**. 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/about-fda/what-we-do>. Acesso em: 05 jun. 2023.

GRADE WORKING GROUP. **Whats is GRADE?** Disponível em: <https://www.gradeworkinggroup.org/>. Acesso em: 15 nov. 2023.

HE, Jian-Hui; GAO, Ji-Min; HUANG, Chang-Jiang; LI, Chun-Qi. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. **Neurotoxicology And Teratology**, [S.L.], v. 42, p. 35-42, mar. 2014. Elsevier BV.

HIGGINS, Julian P.T.; THOMAS, James; CHANDLER, Jacqueline; CUMPSTON, Miranda; LI, Tianjing; PAGE, Matthew J.; WELCH, Vivian A.. **Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2019.

HILL, Adrian J.; TERAOKA, Hiroki; HEIDEMAN, Warren; PETERSON, Richard E.. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological Sciences**, [S.L.], v. 86, n. 1, p. 6-19, 9 fev. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>.

HOFFMANN, Sebastian; MARIGLIANI, Bianca; AKGÜN-ÖLMEZ, Sevcan Gül; IRELAND, Danielle; CRUZ, Rebecca; BUSQUET, Francois; FLICK, Burkhard; LALU, Manoj; GHANDAKLY, Elizabeth C; VRIES, Rob B M de. A Systematic Review to Compare Chemical Hazard Predictions of the Zebrafish Embryotoxicity Test With Mammalian Prenatal Developmental Toxicity. **Toxicological Sciences**, [S.L.], v. 183, n. 1, p. 14-35, 9 jun. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfab072>.

HOOIJMANS, Carlijn R; ROVERS, Maroeska M; VRIES, Rob Bm de; LEENAARS, Marlies; RITSKES-HOITINGA, Merel; LANGENDAM, Miranda W. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **Bmc Medical Research Methodology**, [S.L.], v. 14, n. 1, 26 mar. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>.

LAMMER, E.; CARR, G.J.; WENDLER, K.; RAWLINGS, J.M.; BELANGER, S.e.; BRAUNBECK, Th.. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S.L.], v. 149, n. 2, p. 196-209, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006>.

MEYER, Otto. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 140-141, p. 21-30, abr. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4274\(02\)00492-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4274(02)00492-7).

MOREIRA, David. Orthologous Gene. In: GARGAUD, Muriel. **Encyclopedia of Astrobiology**. Berlin: Springer, 2015.

NUSSLEIN-VOLHARD, Christiane; DAHM, Ralf. **Zebrafish**. New York: Oxford University Press, 2002.

OHAT, NTP. OHAT risk of bias rating tool for human and animal studies. **US Department of Health and Human Services**, 2015.

OUZZANI, Mourad; HAMMADY, Hossam; FEDOROWICZ, Zbys; ELMAGARMID, Ahmed. Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. **Systematic Reviews**, [S.L.], v. 5, n. 1, dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>.

PAEZ, Arsenio. Gray literature: an important resource in systematic reviews. **Journal Of Evidence-Based Medicine**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 233-240, ago. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jebm.12266>.

PAGE, Matthew J.; MCKENZIE, Joanne E.; BOSSUYT, Patrick M.; BOUTRON, Isabelle; HOFFMANN, Tammy C.; MULROW, Cynthia D.; SHAMSEER, Larissa; TETZLAFF, Jennifer M.; AKL, Elie A.; BRENNAN, Sue E.. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **International Journal Of Surgery**, [S.L.], v. 88, p. 105906, abr. 2021.

PAGE, Matthew J.; SHAMSEER, Larissa; TRICCO, Andrea C.. Registration of systematic reviews in PROSPERO: 30,000 records and counting. **Systematic Reviews**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-1, 20 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13643-018-0699-4>.

PAOLO, Carolina di; HOFFMANN, Sebastian; WITTERS, Hilda; CARRILLO, Juan-Carlos. Minimum reporting standards based on a comprehensive review of the zebrafish embryo teratogenicity assay. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 127, p. 105054, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.105054>.

PASCHOA, Claudomiro Vinicius Moreno; AMÉRICO-PINHEIRO, Juliana Heloisa Pinê. Ecotoxicidade e risco ambiental de fármacos para peixes. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 13, n. 5, 2017.

QUINTO, Antonio Carlos. **Peixe-zebra é testado como modelo para experimentos com anestésico**. 2017. Disponível em: <https://jornal.usp.br/?p=59273>. Acesso em: 03 maio 2023.

RIBEIRO, Ondina Martins Ribeiro; PINTO, Mónica Quelhas Pinto; FÉLIX, Luís; MONTEIRO, Sandra; FERNANDES, António; CARROLA, João Soares Carrola. O peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo emergente na ecotoxicologia. **Revista de Ciência Elementar**, [S.L.], v. 10, n. 2, 30 jun. 2022. ICETA. <http://dx.doi.org/10.24927/rce2022.021>.

ROTH, Nicolas; ZILLIACUS, Johanna; BERONIUS, Anna. Development of the SciRAP Approach for Evaluating the Reliability and Relevance of in vitro Toxicity Data. **Frontiers In Toxicology**, [S.L.], v. 3, 15 out. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/ftox.2021.746430>.

SCHIMITH, Lucia et al. Peixe-zebra (*danio rerio*) como modelo alternativo para avaliação da toxicidade de novos compostos antimicrobianos. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 10, n. 2, 2018.

SCHOPFEL, Joachin. Towards a Prague Definition of Grey Literature. Twelfth International Conference on Grey Literature: Transparency in Grey Literature. **Grey Tech Approaches to High Tech Issues**. Prague, 6-7 December 2010, Dec 2010, Czech Republic. pp.11-26. ffsic_00581570f

SHAMSEER, L.; MOHER, D.; CLARKE, M.; GHERSI, D.; LIBERATI, A.; PETTICREW, M.; SHEKELLE, P.; STEWART, L. A.. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. **Bmj**, [S.L.], v. 349, 2 jan. 2015. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.g7647>.

SOUZA-SILVA, Thaiany Goulart de; OLIVEIRA, Isadora Azevedo; SILVA, Geovana Gabriele da; GIUSTI, Fabiana Cardoso Vilela; NOVAES, Rômulo Dias; PAULA, Hudsara Aparecida de Almeida. Impact of microplastics on the intestinal microbiota: a systematic review of preclinical evidence. **Life Sciences**, [S.L.], v. 294, p. 120366, abr. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120366>.

STEPHENS, Martin L; AKGÜN-ÖLMEZ, Sevcan Gül; HOFFMANN, Sebastian; VRIES, Rob de; FLICK, Burkhard; HARTUNG, Thomas; LALU, Manoj; MAERTENS, Alexandra; WITTERS, Hilda; WRIGHT, Robert. Adaptation of the Systematic Review Framework to the Assessment of Toxicological Test Methods: challenges and lessons learned with the zebrafish embryotoxicity test. **Toxicological Sciences**, [S.L.], v. 171, n. 1, p. 56-68, 13 jun. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfz128>.

STEWART, Lesley; MOHER, David; SHEKELLE, Paul. Why prospective registration of systematic reviews makes sense. **Systematic Reviews**, [S.L.], v. 1, n. 1, 9 fev. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/2046-4053-1-7>.

THAKKAR, Sweta; SEETHARAMAN, Barathi; KUMAR, Hamsini; VASANTHAREKHA, Ramasamy. Endocrine-Disrupting Chemicals Exposure Alter Neuroendocrine Factors, Disrupt Cardiac Functions and Provokes Hypoxia Conditions in Zebrafish Model. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 201-213, 7 set. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-022-00955-2>.

TSANG, Benjamin; ZAHID, Hifsa; ANSARI, Rida; LEE, Richard Chi-Yeung; PARTAP, Aman; GERLAI, Robert. Breeding Zebrafish: a review of different methods and a discussion on standardization. **Zebrafish**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 561-573, dez. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/zeb.2017.1477>.

WANG, Xixin; COPMANS, Daniëlle; WITTE, Peter A. M. de. Using Zebrafish as a Disease Model to Study Fibrotic Disease. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 12, p. 6404, 15 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22126404>.

WASPE, Jennifer; BUI, Thuy; DISHAW, Laura; KRAFT, Andrew; LUKE, April; BERONIUS, Anna. Evaluating reliability and risk of bias of in vivo animal data for risk assessment of chemicals – Exploring the use of the SciRAP tool in a systematic review context. **Environment International**, [S.L.], v. 146, p. 106103, jan. 2021.

WATTS, Stephen A.; D'ABRAMO, Louis R.. Standardized Reference Diets for Zebrafish: addressing nutritional control in experimental methodology. **Annual**

Review Of Nutrition, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 511-527, 11 out. 2021. Annual Reviews.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-nutr-120420-03480>.