



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE ENFERMAGEM
GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM

BÁRBARA FREIRE BENEVIDES

MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO EM
PESQUISAS CARDIOVASCULARES: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

FORTALEZA

2024

BÁRBARA FREIRE BENEVIDES

MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO EM
PESQUISAS CARDIOVASCULARES: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Graduação em Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Enfermagem.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Roberta Jeane Bezerra Jorge.

Coorientadora: Prof^ª. M^a. Priscilla Nascimento dos Santos

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B413m Benevides, Bárbara Freire.

Métodos alternativos ao uso de animais de laboratório em pesquisas cardiovasculares : uma revisão sistemática / Bárbara Freire Benevides. – 2024.
76 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Enfermagem, Fortaleza, 2024.

Orientação: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge.

Coorientação: Profa. Ma. Priscilla Nascimento dos Santos.

1. Alternativas ao uso de animais. 2. Direitos dos animais. 3. Sistema cardiovascular. I. Título.
CDD 610.73

BÁRBARA FREIRE BENEVIDES

MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO EM
PESQUISAS CARDIOVASCULARES: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Graduação em Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Enfermagem.

Aprovado em: 24/06/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Roberta Jeane Bezerra Jorge (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. M^a. Priscilla Nascimento dos Santos (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. M^a. Francisca Amanda de Oliveira Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

À minha amada mãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha profunda gratidão a Deus por me guiar ao longo desta jornada acadêmica e por me conceder força e perseverança para superar os desafios. Sou grata por Sua presença constante em minha vida, por me sustentar nos momentos de dificuldade, por me dar esperança nos momentos de incerteza e por me abençoar com esta oportunidade de crescimento e aprendizado.

À minha mãe, Ilza, minha eterna gratidão. Sem o amor incondicional, o apoio incansável, os sacrifícios e as renúncias que ela fez por mim, esta conquista não seria possível. Suas palavras de encorajamento, seus gestos de carinho e sua presença constante foram fundamentais para manter minha motivação e determinação. Obrigada por ser meu porto seguro, minha fonte de inspiração, por me incentivar a perseguir meus sonhos e por estar sempre ao meu lado, celebrando minhas vitórias e me amparando nos momentos difíceis. Sem você, nada disso seria possível. Essa realização é nossa!

Ao meu falecido pai, Walter, agradeço por todos os ensinamentos e por ser um exemplo de inteligência e esforço. No seu momento de maior fragilidade, cuidar de você me inspirou a cuidar de outras pessoas. Espero te honrar trabalhando com o máximo de cuidado, respeito e humanização. Você não conseguiu me ver ingressar na faculdade, no entanto, onde quer que você esteja, espero que esteja orgulhoso.

À minha dedicada orientadora, Prof^a. Dr^a. Roberta Jeane, expresso minha sincera gratidão por sua orientação especializada, seu apoio inestimável e sua paciência ao longo deste trabalho. Sua expertise e *insights* foram cruciais para o desenvolvimento deste estudo, e sou imensamente grata por sua disponibilidade em compartilhar seu conhecimento e experiência.

A todos os professores do curso de Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, minha gratidão por seu comprometimento, dedicação e excelência acadêmica. Suas aulas inspiradoras e orientações valiosas foram fundamentais para meu crescimento intelectual e profissional.

Às minhas fiéis companheirinhas de quatro patas, Nala e Luna, que estiveram ao meu lado durante os momentos de estudo intenso e também nos momentos de descontração e relaxamento. Sua lealdade, carinho e alegria foram um bálsamo para minha alma.

Por fim, sou grata a todos que, direta ou indiretamente, me fizeram chegar até aqui. Muito obrigada!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

As pesquisas sobre saúde cardiovascular desempenham um papel crucial na promoção do bem-estar da sociedade, uma vez que as doenças cardíacas representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. No Brasil, cerca de um terço das mortes são causadas por doenças cardiovasculares. Ao longo dos anos, diversas discussões foram iniciadas sobre as pesquisas clínicas em animais de laboratório e os direitos dos animais. Em 1959, surgiu o conceito do "Princípio dos 3Rs", os 3Rs referem-se à redução, refinamento e substituição (*replacement*). Esse compromisso visa diminuir o número de animais utilizados em procedimentos experimentais, aprimorar os procedimentos para reduzir o desconforto e o sofrimento animal, e substituir o uso de animais sempre que possível. Em razão disso, vários métodos alternativos têm sido investigados para a substituição de animais em pesquisas, como técnicas *in vitro* e *in silico*, modelagem computacional e estudos epidemiológicos. A aplicação de abordagens alternativas não apenas implica na resolução de questões éticas, mas também apresenta vantagens em termos de custo financeiro, tempo e sustentabilidade, além de possuir o potencial de fornecer resultados mais relevantes para os seres humanos. A estratégia metodológica escolhida para a realização desta pesquisa foi a revisão sistemática de literatura com abordagem qualitativa. Foram estudados 12 artigos que mostrassem as atualizações recentes em métodos alternativos ao uso de animais em pesquisas cardiovasculares. Após a discussão de diversos artigos que utilizaram métodos alternativos ao uso de animais de laboratório em pesquisas cardiovasculares, pode-se concluir que o método alternativo de escolha dependerá do objetivo da pesquisa. Assim como nas pesquisas *in vivo*, os métodos estudados apresentaram suas vantagens e desvantagens, como limitações técnicas e necessidade de validação. No entanto, é possível perceber que os resultados obtidos nos estudos com métodos alternativos mostram-se satisfatórios e, muitas vezes, superiores quando comparados aos estudos em animais devido aos seus potenciais de agilidade de resultados, baixo custo econômico, grande diversidade de dados e maximização do potencial de complexidade das pesquisas.

Palavras-chave: alternativas ao uso de animais; direitos dos animais; sistema cardiovascular.

ABSTRACT

Cardiovascular health research plays a crucial role in promoting the well-being of society, as heart disease represents a leading cause of morbidity and mortality worldwide. In Brazil, around a third of deaths are caused by cardiovascular diseases. Over the years, several discussions have been initiated about clinical research on laboratory animals and animal rights. In 1959, the concept of the "3Rs Principle" emerged, the 3Rs refer to reduction, refinement and replacement. This commitment aims to reduce the number of animals used in experimental procedures, improve procedures to reduce animal discomfort and suffering, and replace the use of animals whenever possible. Therefore, several alternative methods have been investigated for replacing animals in research, such as *in vitro* and *in silico* techniques, computational modeling and epidemiological studies. The application of alternative approaches not only involves resolving ethical issues, but also presents advantages in terms of financial cost, time and sustainability, in addition to having the potential to provide results that are more relevant to human beings. The methodological strategy chosen to carry out this research was a systematic literature review with a qualitative approach. 12 articles were trained that show recent updates on alternative methods to the use of animals in cardiovascular research. After discussing several articles that used alternative methods to the use of laboratory animals in cardiovascular research, we can conclude that the alternative method of choice will depend on the objective of the research. As with *in vivo* research, trained methods have their advantages and disadvantages, such as technical limitations and the need for validation. However, it is possible to see that the results obtained in studies with alternative methods are superior and, often, superior when compared to animal studies due to their potential for agility of results, low economic cost, great diversity of data and maximization of the potential complexity of research.

Keywords: animal use alternatives; animal rights; cardiovascular system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Diagrama de fluxo do PRISMA 2020 para novas revisões sistemáticas que incluíram pesquisas apenas em bancos de dados e registros	27
Figura 2	– Esquema de vantagens e desvantagens do método com aprendizado de máquina baseado nos artigos	56
Figura 3	– Esquema de vantagens e desvantagens do método <i>in-ovo</i> baseado nos artigos	58
Figura 4	– Esquema de vantagens e desvantagens do método com zebrafish baseado nos artigos	60
Figura 5	– Esquema de vantagens e desvantagens do método <i>in silico</i> baseado nos artigos	61
Figura 6	– Esquema de vantagens e desvantagens do método <i>in vitro</i> baseado nos artigos	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Resolução Normativa CONCEA nº 18, nº 31 e nº 45	21
Tabela 2	– Resolução Normativa CONCEA nº 56	22
Tabela 3	– Distribuição dos artigos, segundo ano de publicação	28
Tabela 4	– Distribuição dos artigos, segundo país de publicação	29
Tabela 5	– Distribuição dos artigos, segundo o periódico de publicação.	29
Tabela 6	– Distribuição dos artigos, segundo o modelo utilizado nas publicações.	30
Tabela 7	– Estudos analisados.	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Legislação internacional sobre experimentação animal	18
2.2	Legislação nacional sobre experimentação animal	19
3	METODOLOGIA	24
3.1	Tipo de estudo	25
3.2	Coleta de dados	25
3.3	Critérios de seleção	25
3.4	Análise e tratamento dos dados	25
4	RESULTADOS	27
4.1	Características dos estudos	27
4.1.1	<i>Período de publicação</i>	27
4.1.2	<i>Local e fonte de publicação</i>	27
4.1.3	<i>Modelo utilizado nas publicações</i>	29
4.2	Análise dos estudos	29
4.2.1	<i>GENESIS: Gene-Specific Machine Learning Models for Variants of Uncertain Significance Found in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia and Long QT Syndrome-Associated Genes (GENESIS: Modelos de aprendizado de máquina específicos de genes para variantes de significado incerto encontradas em taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica e genes associados à síndrome do QT longo)</i>	31
4.2.2	<i>Machine-learning versus traditional approaches for atherosclerotic</i>	32

	<i>cardiovascular risk prognostication in primary prevention cohorts: a systematic review and meta-analysis (Aprendizado de máquina versus abordagens tradicionais para prognóstico de risco cardiovascular aterosclerótico em coortes de prevenção primária: uma revisão sistemática e meta-análise)</i>	
4.2.3	<i>Coronary Artery Disease Detection by Machine Learning with Coronary Bifurcation Features (Detecção de doença arterial coronariana por aprendizado de máquina com recursos de bifurcação coronariana)</i>	33
4.2.4	<i>Correlation Analysis of Variables From the Atherosclerosis Risk in Communities Study (Análise de correlação de variáveis do estudo de risco de aterosclerose em comunidades)</i>	34
4.2.5	<i>Cardiac MRI: An Alternative Method to Determine the Left Ventricular Function (RM cardíaca: um método alternativo para determinar a função ventricular esquerda)</i>	37
4.2.6	<i>A Multimodel Fusion Method for Cardiovascular Disease Detection Using ECG (Um método de fusão multimodelo para detecção de doenças cardiovasculares usando ECG)</i>	39
4.2.7	<i>In-ovo echocardiography for application in cardiovascular research (Ecocardiografia in-ovo para aplicação em pesquisa cardiovascular)</i>	40
4.2.8	<i>Generation and Application of the Zebrafish <i>heg1</i> Mutant as a Cardiovascular Disease Model (Geração e aplicação do mutante Zebrafish <i>heg1</i> como modelo de doença cardiovascular)</i>	41
4.2.9	<i>Expression and Purification of Recombinant GHK Tripeptides Are Able to Protect against Acute Cardiotoxicity from Exposure to Waterborne-Copper in Zebrafish (Expressão e purificação de tripeptídeos GHK recombinantes são capazes de proteger contra cardiotoxicidade aguda causada pela exposição ao cobre transmitido pela água em zebrafish)</i>	42

4.2.10	<i>Permeability Data of Organosulfur Garlic Compounds Estimated by Immobilized Artificial Membrane Chromatography: Correlation Across Several Biological Barriers (Dados de permeabilidade de compostos organossulfurados de alho estimados por cromatografia de membrana artificial imobilizada: correlação entre várias barreiras biológicas)</i>	44
4.2.11	<i>A glance at the application of CRISPR/Cas9 gene-editing technology in cardiovascular diseases (Um olhar sobre a aplicação da tecnologia de edição genética CRISPR/Cas9 em doenças cardiovasculares)</i>	46
4.2.12	<i>7-Ketocholesterol and 7β-hydroxycholesterol: In vitro and animal models used to characterize their activities and to identify molecules preventing their toxicity (7-Cetocolesterol e 7β-hidroxicoolesterol: Modelos in vitro e animais utilizados para caracterizar suas atividades e identificar moléculas que previnem sua toxicidade)</i>	47
5	DISCUSSÃO	52
5.1	Método com aprendizado de máquina	53
5.2	Método <i>in-ovo</i>	56
5.3	Método com zebrafish	57
5.4	Método <i>in silico</i>	59
5.5	Método <i>in vitro</i>	60
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
7	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO A - MÉTODO PRISMA 2020	73

1 INTRODUÇÃO

A utilização de animais de laboratório no contexto das pesquisas científicas tem sido uma prática amplamente implementada há décadas, desempenhando um papel fundamental no avanço do conhecimento em diversas áreas científicas (Machado, 2023), incluindo a medicina, biologia e farmacologia. No entanto, essa abordagem convencional tem gerado diversas discussões éticas (Nicacio, 2023). Essa preocupação ética impulsiona a busca por alternativas à utilização de animais de laboratório. De acordo com Greif (2003), os métodos alternativos, incluindo técnicas *in vitro* e *in silico*, modelagem computacional e estudos epidemiológicos, representam uma abordagem promissora para substituir, reduzir e aprimorar o uso de animais em experimentos científicos.

Em relação à saúde cardiovascular, a pesquisa desempenha um papel crucial na promoção do bem-estar da sociedade, uma vez que as doenças cardíacas representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Conforme Oliveira *et al.* (2022), no Brasil, cerca de um terço das mortes são causadas por doenças cardiovasculares. O impacto social dessas condições é significativo, afetando não apenas a qualidade de vida dos indivíduos, mas também exercendo pressão substancial sobre os sistemas de saúde e as economias globais (Castro *et al.*, 2019). Investigações nesse campo proporcionam *insights* essenciais para o desenvolvimento de estratégias preventivas e tratamentos mais eficazes, contribuindo assim para a redução de complicações advindas das doenças cardiovasculares.

A busca por métodos alternativos ao uso de animais de laboratório na pesquisa cardiovascular é de extrema importância, refletindo avanços éticos e científicos. O emprego de tecnologias inovadoras, como modelos computacionais, culturas celulares avançadas e órgãos em chip, não apenas reduz a dependência de experimentos em animais, mas também oferece vantagens significativas (Silveira; Schneider; Hammes, 2012). De acordo com Kreutzer *et al.* (2021), essas técnicas modernas proporcionam resultados mais rápidos, custos reduzidos e evitam questões éticas associadas ao uso de animais, alinhando-se a uma abordagem mais humanitária para a pesquisa científica. Segundo Wang *et al.* (2021), esses métodos alternativos permitem uma abordagem mais precisa e personalizada, levando em consideração a variabilidade genética humana, algo frequentemente negligenciado nos modelos animais.

A implementação bem-sucedida de métodos alternativos na pesquisa cardiovascular também contribui para a validade translacional dos resultados. Modelos mais relevantes para a biologia humana permitem uma melhor compreensão das doenças cardiovasculares e

facilitam a transição dos achados laboratoriais para a aplicação clínica (McAleer *et al.*, 2021). Em última análise, a adoção de métodos alternativos não apenas responde a preocupações éticas, mas também impulsiona a qualidade e relevância dos estudos na área cardiovascular, promovendo avanços mais significativos e aplicáveis ao cuidado da saúde.

Esta monografia tem como objetivo analisar e atualizar as informações sobre métodos alternativos em estudos cardiovasculares, destacando as abordagens mais recentes e as tendências na pesquisa. Os objetivos gerais desta pesquisa são realizar uma revisão sistemática da literatura científica sobre métodos alternativos ao uso de animais em laboratório em estudos cardiovasculares, com foco nas publicações mais recentes, bem como avaliar a eficácia, validade e limitações dos métodos alternativos em comparação com os métodos tradicionais que envolvem animais.

Já os objetivos específicos desta pesquisa são identificar os principais métodos alternativos para avaliações cardiovasculares e destacar os avanços e descobertas mais relevantes em cada um deles, além de aplicar o método PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) para garantir a transparência e a qualidade da revisão sistemática.

Ao adotar uma abordagem sistemática, esta monografia pretende fornecer uma visão abrangente e baseada em evidências que contribua para a compreensão dos progressos alcançados e dos desafios enfrentados na utilização de abordagens alternativas em pesquisas cardiovasculares. Conforme Donato e Donato (2019), a revisão sistemática é um método de pesquisa que propõe a síntese e análise crítica da literatura existente, proporcionando uma visão holística do estado atual do conhecimento relacionado ao tema em questão.

Dado o avanço da literatura científica relacionada aos métodos alternativos e os rápidos avanços tecnológicos neste campo, há uma evidente necessidade de revisões sistemáticas. Ao longo deste trabalho, serão explorados estudos recentes, revisões sistemáticas anteriores e relatórios de agências reguladoras sobre este tema. Por meio dessa análise, almeja-se fornecer uma visão completa e informada das alternativas ao uso experimental de animais e do seu impacto na pesquisa científica sobre avaliações cardiovasculares, facilitando a reflexão crítica e a tomada de decisões embasadas nesse campo em contínua evolução.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A pesquisa científica em animais tem uma história longa e complexa, marcada por avanços significativos e desafios éticos. Na antiguidade, o uso de animais em experimentação era limitado e muitas vezes associado a práticas religiosas e rituais. A observação e dissecação de animais eram realizadas principalmente para fins educacionais, e a pesquisa científica estava em seus estágios iniciais (Von Staden, 1989).

Já com o Renascimento e o advento da dissecação, a pesquisa em animais se expandiu. Cientistas como Andreas Vesalius desempenharam um papel fundamental na exploração da anatomia animal (Kickhöfel, 2003). No século XVII, a pesquisa experimental ganhou impulso com a obra “*An anatomical disquisition on the motion of the heart and blood in animals*” de William Harvey, que realizou experimentos com animais para compreender a circulação sanguínea (Rebollo, 2002).

Posteriormente, o século XIX presenciou um aumento significativo na experimentação animal sistemática. Claude Bernard, frequentemente chamado de "pai da fisiologia experimental", estabeleceu princípios fundamentais para a pesquisa em animais, utilizando principalmente a vivisseção (Lafollette; Shanks, 1994). A partir disso, a criação de animais de laboratório tornou-se comum.

Anos depois, o século XX testemunhou avanços notáveis na pesquisa biomédica, frequentemente envolvendo animais. Isso é comprovado pelo fato de que cerca de 90% das pesquisas do Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina envolveram experimentação animal (Andersen; Winter, 2019). No entanto, a conscientização cresceu em relação às questões éticas e ao bem-estar animal (Gonyou, 1994). Isso levou ao desenvolvimento de diretrizes para a pesquisa com animais e ao aumento da regulamentação.

Finalmente, no século XXI, há um crescente foco em métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa. Avanços em culturas de células, técnicas de modelagem computacional e órgãos em chips oferecem alternativas promissoras. Além disso, as questões éticas em torno do uso de animais na pesquisa continuam sendo debatidas e regulamentadas em muitos países (Guimarães; Freire; Menezes, 2016).

Sobre as pesquisas cardiovasculares, existem modelos alternativos que já são validados e bem consolidados na área da pesquisa clínica como amostras de tecidos humanos, células cardiovasculares derivadas de células-tronco humanas e seus derivados tridimensionais (3D). Conforme Velden *et al.* (2022), existe a tendência de os estudos em animais se tornarem cada vez mais “humanizados” e éticos, bem como possivelmente haverá a diferenciação dos sexos

dos animais nas pesquisas de acordo com a prevalência de determinada patologia entre os sexos feminino e masculino em humanos. Ainda, tecnologias avançadas *in vitro* e análises computacionais devem reduzir a necessidade de animais de laboratório.

Em suma, a pesquisa científica em animais evoluiu ao longo dos séculos, passando de práticas rudimentares no passado para métodos mais sofisticados e éticos nos tempos modernos. O desenvolvimento de alternativas ao uso de animais e a ênfase crescente no bem-estar animal continuam moldando a pesquisa científica atual. A busca por um equilíbrio entre o avanço científico e o respeito pelos direitos dos animais continua sendo um desafio fundamental na pesquisa biomédica.

2.1 Legislação internacional sobre experimentação animal

Como mencionado anteriormente, após inúmeras discussões sobre direitos animais, o uso de animais em experimentação científica começou a ser regulamentado por diversas recomendações e diretrizes internacionais visando garantir o bem-estar desses animais e assegurar a implementação de práticas éticas. Em decorrência da Segunda Guerra Mundial, surgiu o Código de Nuremberg, o qual estabelece que pesquisas em seres humanos só podem ser conduzidas após comprovação científica da eficácia e relevância do experimento, previamente testado em animais, e após uma análise rigorosa da evolução da doença (Nuremberg Code, 1949).

Dessa forma, uma das primeiras diretrizes defendidas foi o "Princípio dos 3Rs". Este princípio é um compromisso estabelecido pela comunidade científica internacional, baseado no livro "*The Principles of Humane Experimental Technique*" de WMS Russell e RL Burch. Conforme Russell e Burch (1959), os 3Rs referem-se à redução, refinamento e substituição (*replacement*). Resumidamente, esse compromisso visa diminuir o número de animais utilizados em procedimentos experimentais, aprimorar os procedimentos para reduzir o desconforto e o sofrimento animal, e substituir o uso de animais sempre que possível.

Logo então, o Conselho Internacional para Ciência de Animais de Laboratório (ICLAS) estabeleceu diretrizes com princípios e práticas para a pesquisa com animais de laboratório em nível internacional. Surgindo então a Convenção Europeia para a Proteção dos Animais Usados para Fins Científicos (Convenção ETS 123), que estabelece princípios para a proteção dos animais utilizados em experimentos científicos na Europa (União Europeia, 1986). Além disso, a União Europeia promulgou a Diretiva 2010/63/UE, que regulamenta o uso de animais

para fins científicos na União Europeia e estabelece padrões rigorosos de bem-estar animal (Parlamento Europeu, 2010).

Adicionalmente, a Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO) elaborou a Declaração Universal dos Direitos dos Animais. Anos depois, a UNESCO também formulou a Declaração Universal sobre o Genoma Humano e os Direitos Humanos, na qual reconhece a importância da pesquisa científica, incluindo a pesquisa genética, ao mesmo tempo que destaca a necessidade de proteger os direitos tanto dos seres humanos quanto dos animais (Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura, 1997).

Por fim, a Associação Médica Mundial instituiu a Declaração de Helsinki, abordando questões éticas na pesquisa clínica e recomendando a utilização de métodos alternativos sempre que possível (World Medical Association, 2008).

2.2 Legislação nacional sobre experimentação animal

Da mesma forma que a discussão e implementação de medidas visando a garantia do bem-estar animal em nível mundial, anteriormente exemplificada, no Brasil, o uso de animais na experimentação científica também é regulamentado por uma série de leis, decretos e normativas que estabelecem diretrizes e procedimentos para garantir o bem-estar dos animais utilizados em pesquisas científicas. Algumas das principais leis e normativas incluem a Lei Arouca (Lei 11.794/2008), também conhecida como Lei de Controle de Experimentação Animal, a qual estabelece normas para o uso de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica no Brasil (Brasil, 2008). Determina, ainda, a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), responsável por regulamentar e fiscalizar o uso de animais em pesquisas no país.

Em 2012, foi formulada a resolução CFMV nº 1000/2012, emitida pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), estabelecendo normas e diretrizes para a atuação do médico-veterinário em experimentação animal (Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2012). Posteriormente, em 2013, foi elaborada a normativa CONCEA nº 13/2013, que define diretrizes específicas para o cuidado e manutenção de animais utilizados em procedimentos de ensino ou pesquisa. Esta normativa aborda aspectos fundamentais como alojamento, nutrição, cuidados veterinários, entre outros (Brasil, 2013). Já em 2014, foi divulgada a normativa CONCEA nº 20/2014 estabelecendo procedimentos para o credenciamento de instituições e

profissionais que utilizam animais em atividades de ensino ou pesquisa, bem como para a avaliação ética dos projetos que envolvem animais (Brasil, 2014).

No ano de 2021, foi emitida a Resolução Normativa CONCEA nº 49/2021 que dispõe sobre a obrigatoriedade de capacitação do pessoal envolvido em atividades de ensino e pesquisa que utilizam animais (Brasil, 2021). A resolução é essencial pois visa garantir que todos os envolvidos nas pesquisas tenham o conhecimento necessário para tratar os animais de forma ética e conforme as melhores práticas, bem como contribui para o bem-estar dos animais, reduzindo o sofrimento e melhorando as suas condições de vida.

Segundo Brayner *et al.* (2022), o CONCEA reconhecia 25 métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil que eram validados e certificados pela Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama).

Tabela 1 – Resolução Normativa CONCEA nº 18, nº 31 e nº 45

Desfechos	Métodos Alternativos
I - Para avaliação do potencial de sensibilização, irritação e corrosão da pele:	<ul style="list-style-type: none"> ● Método OECD TG 430 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i>: teste de resistência elétrica transcutânea ● Método OECD TG 431 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i>: teste da epiderme humana reconstituída ● Método OECD TG 435 - Teste de barreira de membrana <i>in vitro</i> ● Método OECD TG 439 - Teste de irritação cutânea <i>in vitro</i> ● Método OECD TG 429 - Sensibilização Cutânea: ensaio do linfonodo local ● Método OECD TG 442A e 442B - Versões não radioativas do ensaio do linfonodo local ● Método OECD TG 442C - Sensibilização cutânea química: ensaio direto de reatividade do peptídeo ● Método OECD TG 442D - Ensaio de sensibilização cutânea <i>in vitro</i> que abordam o evento aop chave sobre a ativação do queratinócito
II - Para avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular:	<ul style="list-style-type: none"> ● Método OECD TG 437 - Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina ● Método OECD TG 438 - Teste de Olho Isolado de Galinha ● Método OECD TG 460 - Teste de Permeação de Fluoresceína ● Método OECD DT 491 - Método de teste <i>in vitro</i> de exposição a curto prazo ● Método OECD DT 492 - Método de teste de epitélio humano semelhante à córnea (RhCE) reconstruído

Desfechos	Métodos Alternativos
III - Para avaliação do potencial de Fototoxicidade:	<ul style="list-style-type: none"> ● Método OECD TG 432 - Teste de Fototoxicidade <i>in vitro</i> 3T3 NRU
IV - Para avaliação da absorção cutânea:	<ul style="list-style-type: none"> ● Método OECD TG 428 - Absorção Cutânea método <i>in vitro</i>
V - Para avaliação de toxicidade aguda:	<ul style="list-style-type: none"> ● Método OECD TG 129 - estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica ● Método OECD TG 420 - Toxicidade Aguda Oral - procedimento de doses fixas ● Método OECD TG 423 - Toxicidade Aguda Oral - classe tóxica aguda ● Método OECD TG 425 - Toxicidade Aguda Oral - procedimento "Up and Down"
VI - Para avaliação de genotoxicidade:	<ul style="list-style-type: none"> ● Método OECD TG 487 - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero <i>in vitro</i>
VII – Para avaliação de toxicidade reprodutiva:	<ul style="list-style-type: none"> ● Método OECD DT 421 - Teste de triagem de reprodução/desenvolvimento de toxicidade ● Método OECD DT 422 - Estudo combinado de toxicidade de dose repetida com o teste de triagem para reprodução/toxicidade no desenvolvimento
VIII – Para avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis:	<ul style="list-style-type: none"> ● Teste de Endotoxina Bacteriana (Farmacopeia Brasileira) ● Teste de Ativação de Monócitos

Fonte: Brasil (2014); Brasil (2016); Brasil (2019).

De acordo com Brasil (2022), na Resolução Normativa CONCEA nº 54 consta que os pesquisadores envolvidos em pesquisas científicas possuem o prazo legal de até 5 (cinco) anos para a adesão dos novos métodos aprovados pelo CONCEA, a contar da data de publicação da respectiva Resolução Normativa. Ainda em conformidade com Brasil (2022), foram validados 16 novos métodos alternativos através da Resolução nº 56, de 05 de outubro de 2022 (Tabela 2).

Tabela 2 – Resolução Normativa CONCEA nº 56

Desfechos	Métodos Alternativos
1 - Sensibilização	<ul style="list-style-type: none"> ● Método OECD TG 442E - Sensibilização cutânea <i>in vitro</i>:

dérmica	ensaios de sensibilização cutânea <i>in vitro</i> abordando o evento chave na ativação de células dendríticas no Caminho da Resposta Adversa (AOP) para sensibilização cutânea
2 - Avaliação de efeitos estrogênicos	<ul style="list-style-type: none"> ● Método OECD TG 455 - Teste baseado na performance para ensaios <i>in vitro</i> de transativação transfectada estável para detectar agonistas e antagonistas de receptor estrogênico ● Método OECD TG 493 - Teste baseado na performance para ensaios <i>in vitro</i> de receptor estrogênico humano recombinante (hrER) para detectar substâncias químicas com afinidade de ligação ER
3 - Efeitos endócrinos	<ul style="list-style-type: none"> ● Método OECD TG 456 - Ensaio de Esteroidogênese H295R
4 - Efeitos androgênicos	<ul style="list-style-type: none"> ● Método OECD TG 458 - Ensaio de ativação transcricional de receptores androgênicos humanos transfectados para detecção de atividade agonista e antagonista de substâncias químicas
5 - Mutagenicidade	<ul style="list-style-type: none"> ● Método OECD TG 471 - Teste de mutação bacteriana reversa ● Método OECD TG 473 - Teste <i>in vitro</i> de aberração cromossômica de mamíferos ● Método OECD TG 476 - Testes <i>in vitro</i> de mutação gênica de células de mamífero usando os gens Hprt and xpvt ● Método OECD TG 490 - Testes <i>in vitro</i> de mutação gênica em células de mamífero usando gen Timidinaquinase
6 - Irritação/corrosão ocular	<ul style="list-style-type: none"> ● Método OECD TG 494 - Vitrigel - Teste de irritação ocular para identificação de substâncias químicas que não requerem classificação e rotulagem para irritação ocular ou sério dano ocular ● Método OECD TG 496 - Teste macromolecular <i>in vitro</i> para identificação de substâncias químicas que induzem dano ocular severo e substâncias químicas que não requerem classificação para irritação ocular ou dano ocular severo
7 - Fotorreatividade	<ul style="list-style-type: none"> ● OECD TG 495 - Ensaio de fotorreatividade por Ros (Espécies oxigênio reativas).
8 - Efeitos em sistemas bióticos	<ul style="list-style-type: none"> ● Método OECD TG 212 - Peixe, teste de toxicidade a curto prazo em estágios embrionários e recém nascidos ● Método OECD TG 236 - Toxicidade aguda em embrião de peixe (FET) ● Método OECD TG 319-A - Determinação do "clearance" intrínseco "<i>in vitro</i>" usando hepatócitos criopreservados de Truta Arco-Íris (RT-HEP) ● Método OECD TG 319-B - Determinação do "clearance" intrínseco "<i>in vitro</i>" usando fração sub-celular S-9 de Truta Arco-Íris (RT-S9)

Por fim, em 02 de maio de 2023, o CONCEA emitiu uma série de resoluções normativas que regulamentam sobre as condições para a criação, manutenção e experimentação de cães e gatos (RN 59), primatas não humanos (RN 60), peixes (RN 61), anfíbios e serpentes (RN 62), pequenos ruminantes (RN 63), grandes ruminantes (RN 64), equídeos (RN 65), aves (RN 67) e suínos (RN 66) mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica (Brasil, 2023).

É importante ressaltar que o uso de animais em pesquisas deve ser feito com o máximo de cuidado e consideração ao bem-estar dos animais. Todos os projetos de pesquisa que envolvem animais devem ser submetidos a avaliações éticas e científicas, garantindo a minimização do sofrimento dos animais e o cumprimento das normas legais.

3 METODOLOGIA

A estratégia metodológica escolhida para a realização desta pesquisa foi a revisão sistemática de literatura com abordagem qualitativa. Segundo Galvão e Pereira (2014), a revisão sistemática é um tipo de estudo bastante objetivo e direcionado com o intuito de identificar, selecionar, analisar e concatenar as evidências pertinentes.

A pesquisa baseada em evidências na área da saúde é uma abordagem metodológica que busca integrar a melhor evidência disponível com a expertise do profissional e as preferências do paciente para embasar decisões clínicas. Essa metodologia enfatiza o uso de estudos clínicos bem conduzidos, revisões sistemáticas e meta-análises para fornecer uma base sólida para a prática clínica (El Dib, 2007). Ao priorizar evidências científicas robustas, a pesquisa garante que intervenções médicas sejam eficazes, seguras e com resultados sólidos, contribuindo assim para uma melhor qualidade de cuidados de saúde (Schneider.; Pereira; Ferraz, 2020).

Ao utilizar métodos científicos rigorosos para avaliar a eficácia e segurança de intervenções médicas, a pesquisa baseada em evidências credibiliza as decisões clínicas e promove o uso eficiente de recursos (Galvão; Sawada, 2003). Além disso, ao incentivar a constante revisão e atualização das práticas médicas com base em novas evidências, essa abordagem contribui para o avanço contínuo da medicina e o aprimoramento dos cuidados de saúde oferecidos à população.

Em relação a hierarquia dos graus de evidência científica, a revisão sistemática, de ensaio clínico com ou sem metanálise, localiza-se no topo. Dessa forma, sendo considerada como o tipo de estudo mais fiel e próximo da realidade. Em seguida, são os ensaios clínicos aleatórios (ECA), estudo coorte, estudo caso-controle, estudos quase-experimentais, estudos descritivos, experimental de caso único, série de casos, opinião de experts e relato de caso, respectivamente (Sampaio; Mancini, 2007). Dessa forma, é possível entender a importância de revisões sistemáticas para verificar a relevância de determinada intervenção.

De acordo com Cordeiro *et al.* (2007), as primeiras técnicas de combinação dos resultados de pesquisas distintas foram realizadas e publicadas em 1904 na Inglaterra. Já em 1955, surge a primeira revisão sistemática sobre um cenário clínico nos Estados Unidos da América. Por sua vez, a aliança entre revisão sistemática e metanálise foi consolidada ao final da década de 80 (Chalmers; Enkin; Keirse, 1989).

Na revisão sistemática, é essencial que seja formulada uma pergunta de pesquisa bem estruturada. Para realizá-la, é preciso ter o enfoque em cinco aspectos: identificação do

problema (P), intervenção (I), objeto de comparação (C), desfecho (D) e o tempo (T) decorrido para analisar o desfecho (Santos; Pimenta; Nobre, 2007). Assim, há a definição das melhores estratégias para identificar os estudos que serão incluídos e quais são os dados que precisam ser coletados dos estudos.

3.1 Tipo de estudo

Foi realizada uma revisão sistemática da literatura, seguindo as recomendações da Diretriz *Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis* (PRISMA), que orienta a aplicação de checklist com 27 itens e fluxograma de três etapas, com foco na identificação de estudos por meio de bancos de dados e registros (PAGE *et al.*, 2021).

Considerando o contexto do estudo, a questão norteadora definida para guiar esta revisão sistemática foi “quais são as atualizações recentes em métodos alternativos ao uso de animais em pesquisas cardiovasculares?”.

3.2 Coleta de dados

O levantamento dos dados foi realizado entre setembro e novembro de 2023 nas bases de dados eletrônicas: *Directory of Open Access Journals* (DOAJ), *Biomedical Literature Citations and Abstracts* (PubMed), *Web of Science* e *Springer*. Os descritores foram selecionados após consulta ao vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS).

Para a busca, foram utilizados os descritores em inglês: “Método Alternativo” (*Alternative Method*) e “Cardiovascular” (*Cardiovascular*).

3.3 Critérios de seleção

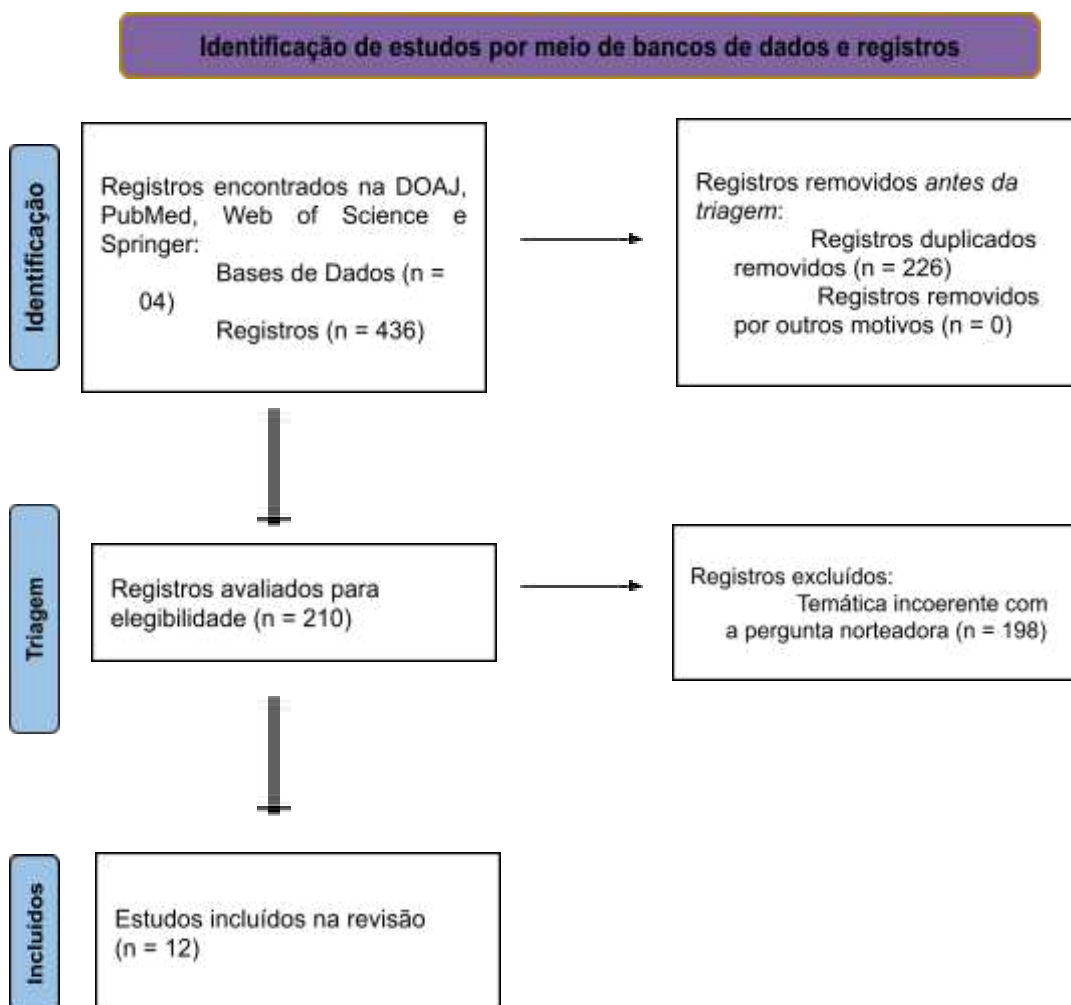
A seleção dos artigos foi realizada após leitura de títulos e resumos, análise e interpretação dos resultados. Os critérios de inclusão foram: artigos em inglês e português, datados entre os anos de 2020 e 2023, e tivessem relação com a pergunta norteadora do estudo. Foram excluídos apenas artigos pagos.

3.4 Análise e tratamento dos dados

O processo de busca resultou em 436 artigos que obedeceram todos os critérios de inclusão. Seguidamente, foram lidos todos os títulos, excluídos os artigos duplicados e selecionados os que se assemelhavam à questão norteadora, nessa etapa foram eliminados 226 artigos. *A posteriori*, os artigos restantes tiveram seus resumos avaliados quanto à temática e metodologia e foram excluídos 198 artigos. Por fim, após todas as análises, foram selecionados 12 artigos para análise detalhada.

Foram extraídas informações dos artigos que procurassem elucidar o questionamento estabelecido e objetivo do estudo, as quais mostrassem as atualizações recentes em métodos alternativos ao uso de animais em pesquisas cardiovasculares. Na Figura 1, encontra-se a descrição do processo de seleção dos estudos.

Figura 1 – Diagrama de fluxo do PRISMA 2020 para novas revisões sistemáticas que incluíram pesquisas apenas em bancos de dados e registros



Fonte: Adaptada de PAGE *et al.* (2021)

4 RESULTADOS

Os resultados deste estudo estão expostos na seguinte ordem: características dos estudos e análise dos estudos incluídos.

4.1 Características dos estudos

4.1.1 Período de publicação

Do total de 12 artigos analisados, foi verificado que houveram quatro artigos publicados no ano de 2020, correspondendo a 33,3% das publicações. O ano de 2021 contribuiu com uma publicação (8,3%) e o ano de 2022 com quatro (33,3%). Por fim, foram publicados três artigos (25%) em 2023.

Tabela 3 – Distribuição dos artigos, segundo ano de publicação. Fortaleza, 2024.

Ano	Nº	%
2020	4	33,3%
2021	1	8,3%
2022	4	33,3%
2023	3	25%
Total	12	100%

Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.2 Local e fonte de publicação

Em relação aos locais de produção dos artigos, todos foram localizados através do acesso *online*. Entre esses, a maioria foi originada na China com o total de três publicações (25%). Já a Alemanha e os Estados Unidos da América produziram quatro artigos, sendo dois (16,7%) de cada. Ademais, a Argentina, Austrália, França, Irã e Taiwan produziram um artigo (8,3%) para cada país.

Tabela 4 – Distribuição dos artigos, segundo país de publicação. Fortaleza, 2024.

País	Nº	%
Alemanha	2	16,7%
Argentina	1	8,3%
Austrália	1	8,3%
China	3	25%
Estados Unidos da América	2	16,7%
França	1	8,3%
Irã	1	8,3%
Taiwan	1	8,3%
Total	12	100%

Fonte: Elaborado pela autora.

Quanto aos periódicos onde os artigos foram publicados, a tabela abaixo evidencia que os periódicos que se relacionam principalmente à área de farmacologia, fisiologia e química concentram 49,9% de toda produção.

Tabela 5 – Distribuição dos artigos, segundo o periódico de publicação. Fortaleza, 2024.

Periódico de Publicação	Nº	%
Applied Sciences	1	8,3%
Basic Research in Cardiology	1	8,3%
Biochemical Pharmacology	1	8,3%
Biomolecules	2	16,7%
Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology	1	8,3%
Diagnostics	1	8,3%
Emergency Medicine International	1	8,3%
European Heart Journal - Quality of Care and Clinical Outcomes	1	8,3%

Periódico de Publicação	Nº	%
Frontiers in Chemistry	1	8,3%
Frontiers in Pharmacology	1	8,3%
Journal of Cardiovascular and Thoracic Research	1	8,3%
Total	12	100%

Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.3 Modelo utilizado nas publicações

Sobre os modelos utilizados nos artigos, foi apurado que a maioria das publicações utilizou o modelo de aprendizado de máquina contabilizando seis trabalhos (50%). Os métodos *in-vitro* e com zebrafish somaram quatro artigos, dois artigos para cada modelo (16,7%). Finalmente, o modelo *in-ovo* e *in silico* foram enfoque, cada um, em uma publicação (8,3%).

Tabela 6 – Distribuição dos artigos, segundo o modelo utilizado nas publicações. Fortaleza, 2024.

Modelo utilizado	Nº	%
Aprendizado de máquina	6	50%
<i>In-ovo</i>	1	8,3%
Zebrafish	2	16,7%
<i>In silico</i>	1	8,3%
<i>In vitro</i>	2	16,7%
Total	12	100%

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Análise dos estudos

Os doze estudos analisados neste trabalho estão dispostos na tabela 7 constando título, autoria e método alternativo utilizado.

Tabela 7 – Estudos analisados. Fortaleza, 2024.

	Título	Autores	Método
1	GENESIS: Gene-Specific Machine Learning Models for Variants of Uncertain Significance Found in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia and Long QT Syndrome-Associated Genes	Draelos <i>et al.</i> (2022)	Aprendizado de máquina
2	Machine-learning versus traditional approaches for atherosclerotic cardiovascular risk prognostication in primary prevention cohorts: a systematic review and meta-analysis	Liu <i>et al.</i> (2023)	Aprendizado de máquina
3	Coronary Artery Disease Detection by Machine Learning with Coronary Bifurcation Features	Chen <i>et al.</i> (2020)	Aprendizado de máquina
4	Correlation Analysis of Variables From the Atherosclerosis Risk in Communities Study	Mandal <i>et al.</i> (2022)	Aprendizado de máquina
5	Cardiac MRI: An Alternative Method to Determine the Left Ventricular Function	Michler <i>et al.</i> (2023)	Aprendizado de máquina
6	A Multimodel Fusion Method for Cardiovascular Disease Detection Using ECG	Song <i>et al.</i> (2022)	Aprendizado de máquina
7	<i>In-ovo</i> echocardiography for application in cardiovascular research	Hegemann <i>et al.</i> (2023)	<i>In-ovo</i>
8	Generation and Application of the Zebrafish <i>heg1</i> Mutant as a Cardiovascular Disease Model	Lu <i>et al.</i> (2020)	Zebrafish
9	Expression and Purification of Recombinant GHK Tripeptides Are Able to Protect against Acute Cardiotoxicity from Exposure to Waterborne-Copper in Zebrafish	Hsiao <i>et al.</i> (2020)	Zebrafish
10	Permeability Data of Organosulfur Garlic Compounds Estimated by Immobilized Artificial Membrane Chromatography: Correlation Across Several Biological Barriers	Ramirez <i>et al.</i> (2021)	<i>In silico</i>
11	A glance at the application of CRISPR/Cas9 gene-editing technology in cardiovascular diseases	Roshanravan <i>et al.</i> (2022)	<i>In vitro</i>
12	7-Ketocholesterol and 7 β -hydroxycholesterol: In vitro and animal models used to characterize their activities and to identify molecules preventing their toxicity	Vejux <i>et al.</i> (2020)	<i>In vitro</i> (<i>organ-on-a-chip</i>)

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.1 GENESIS: Gene-Specific Machine Learning Models for Variants of Uncertain Significance Found in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia and Long QT Syndrome-Associated Genes (GENESIS: Modelos de aprendizado de máquina específicos de genes para variantes de significado incerto encontradas em taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica e genes associados à síndrome do QT longo)

Em Draelos *et al.* (2022), é introduzida a experimentação de modelos de aprendizado de máquina específicos de genes para variantes de significado incerto encontradas em taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica e genes associados à síndrome do QT longo. É explicado que as canalopatias hereditárias são originadas de variantes em genes no coração que codificam canais iônicos ou suas proteínas reguladoras. Sequencialmente, o indivíduo pode apresentar o desenvolvimento de arritmias e morte súbita cardíaca.

O teste genético é o padrão para avaliar o risco de canalopatias nos humanos. O aumento da realização de testes genéticos gerou também o aumento da identificação de variantes raras em genes associados à morte súbita cardíaca. É expresso que os modelos *in silico* tem o potencial de prever a patogenicidade para cada variante analisada com base em uma série de características do gene e do produto proteico.

Esse modelo de aprendizado de máquina (AM) foi necessário devido a facilidade de interpretação das variantes de significado clínico incerto (VSCI) e possibilitar o manejo mais eficiente dos pacientes com VSCI. Dessa forma, o artigo busca desenvolver um modelo de aprendizado de máquina específico de genes para prever a patogenicidade de VSCI em genes associados à síndrome do QT longo (SQTL) e à taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC).

O GENESIS (*GENe-specific EnSemble grid Search*) é uma estrutura para descobrir modelos de aprendizado de máquina específicos de genes de alto desempenho para previsão de patogenicidade de variantes com base em um conjunto de dados de criação de modelo com curadoria de variantes patogênicas e benignas. O programa foi aplicado para a detecção dos genes RYR2, KCNQ1, KCNH2 e SCN5A. A classificação da patogenicidade leva em consideração a avaliação de informações fenotípicas, função da proteína e relações genótipo/fenótipo relacionadas. A previsão de modelos *in silico* podem variar de acordo com os genes e nem sempre conseguem replicar o ambiente biológico. Dessa forma, o método de aprendizado de máquina pode melhorar a predição *in silico*. Além disso, os melhores modelos GENESIS superaram as abordagens alternativas publicadas anteriormente. Considerando isso, foram utilizados os modelos finais específicos do gene GENESIS para obter previsões de

patogenicidade para um conjunto de dados de implantação de modelo de VSCI e, em seguida, foi realizada a avaliação funcional e correlação clínica de vários VSCI.

A base de dados para a classificação de benignidade foi construída através da coleta de genes de indivíduos aparentemente saudáveis no momento da coleta da amostra. Já os dados para malignidade, foram obtidos através de coortes baseadas na literatura. É destacado que os modelos de aprendizado de máquina são inerentemente limitados pela qualidade e quantidade das entradas de dados.

Em conclusão, os modelos de aprendizado de máquina dos genes propostos obtiveram previsão de alto desempenho e possuem potencial na análise diagnóstica dos resultados dos testes genéticos da canalopatia. Então, esses modelos podem ser usados para reclassificar a VSCI em provavelmente benigna, ainda incerta e provavelmente patogênica.

4.2.2 Machine-learning versus traditional approaches for atherosclerotic cardiovascular risk prognostication in primary prevention cohorts: a systematic review and meta-analysis (Aprendizado de máquina versus abordagens tradicionais para prognóstico de risco cardiovascular aterosclerótico em coortes de prevenção primária: uma revisão sistemática e meta-análise)

O estudo de Liu *et al.* (2023) foi realizado com o intuito de comparar o desempenho das abordagens tradicionais e o aprendizado de máquina para o prognóstico de risco cardiovascular aterosclerótico, através de uma revisão sistemática e metanálise. Em sua introdução, ele diferencia os dois métodos em que o aprendizado de máquina seria a associação do uso de inteligência artificial com o aprendizado computacional. Já as abordagens tradicionais seriam os instrumentos consolidados no ambiente clínico como a pressão arterial, perfil lipídico, histórico de tabagismo e escore de Framingham.

Os materiais para a realização dessa revisão foram colhidos nas bases de dados MEDLINE, EMBASE, CENTRAL e SCOPUS Web of Science Core, sendo o principal critério de inclusão a publicação dos estudos entre 2000 e 2021. Os principais critérios de exclusão foram: ser artigos de revisão, resumos sem texto disponíveis na íntegra e não ser escrito em inglês. Ao final, foram incluídos 16 estudos de coorte retrospectivos para a revisão sistemática e metanálise.

Como resultado, foi verificado que os algoritmos de aprendizado computacional (AC) mostraram-se superiores aos métodos tradicionais, pois os algoritmos baseados em AC conseguiram prognosticar com mais 1,4% de precisão o risco de desenvolvimento de doenças

cardiovasculares. Contudo, também é relatado que a comparação entre os métodos restou prejudicada, pois apenas 19% dos estudos obtiveram validação externa. Assim, a maioria foi considerada com alto risco de viés. Além disso, nenhum dos estudos realizou um estudo de coorte prospectivo para a validação dos modelos. Em seguida, é observado que outro ponto negativo do AC é que a divulgação sobre os pormenores desses métodos são escassos, como o código modelo e as instruções de reaplicação.

Ao final, é concluído que apesar de os resultados de aprendizado computacional terem sido superiores aos instrumentos tradicionais, a falta de transparência na realização desses estudos computacionais prejudica a aplicação desse modelo na prática clínica. Há várias questões essenciais sobre o AC que precisam ser melhor elucidadas antes de prosseguir com a implementação desse método.

4.2.3 Coronary Artery Disease Detection by Machine Learning with Coronary Bifurcation Features (Detecção de doença arterial coronariana por aprendizado de máquina com recursos de bifurcação coronariana)

De início, Chen *et al.* (2020) mostra as dificuldades da detecção precoce da doença arterial coronariana (DAC) pois a abordagem mais acurada, atualmente, é o cateterismo cardíaco. No entanto, ele consiste em um exame invasivo, arriscado, oneroso e moroso. Apesar de existirem outros métodos não invasivos como ecocardiografia e ressonância magnética, eles não detectam a doença no estágio inicial. Dessa forma, a proposta é utilizar o aprendizado de máquina para reconhecer padrões patológicos da doença arterial coronariana a fim de detectá-la em sua fase inicial.

Algumas alterações importantes causadas pela doença podem ser observadas por meio da pressão arterial, glicemia, lipídio plasmático, idade, grau de obesidade, bem como pelo eletrocardiograma (ECG) e fonocardiograma (PCG). A partir dessas evidências, o foco desse estudo é elucidar a precisão da detecção da fase inicial da doença arterial coronariana, mediante o aprendizado de máquina com recursos de bifurcação coronariana.

A fim de obter alta qualidade dos recursos usados para aprendizado de máquina, foram extraídos os recursos de bifurcação coronária das imagens de angiografia por tomografia computadorizada coronariana (CCTA) usando o método morfométrico, tanto de indivíduos diagnosticados com doença arterial coronariana, quanto em sujeitos saudáveis. Dessa forma, foi realizada a reconstrução das artérias coronárias dessas imagens em formato tridimensional. Os algoritmos classificadores de aprendizado de máquina, como regressão logística (LR),

árvore de decisão (DT), análise discriminante linear (LDA), k-vizinhos mais próximos (k-NN), rede neural artificial (ANN) e máquina de vetores de suporte (SVM) foram aplicados para estimar o desempenho usando os recursos medidos. Também foi realizada a análise de seis características morfológicas da bifurcação coronária: expoente do diâmetro da bifurcação (n), taxa de expansão de área (AER), diâmetros dos vasos-mãe (D_m), diâmetros de vasos filhos maiores (D_l), diâmetros menores dos vasos filhos (D_s) e ângulos de bifurcação (α).

É relatado que os principais diferenciais dessa pesquisa são utilização combinada de aprendizado de máquina e método de medição morfológica para detecção de DAC, desempenho de classificação superior em comparação com estudos existentes e descoberta das duas características morfológicas mais importantes para detecção de CAD.

Os resultados experimentais mostraram que em comparação com outros métodos de aprendizado de máquina, o SVM polinomial com o uso do método de otimização de busca em grade teve o melhor desempenho para a detecção de DAC e rendeu a precisão de classificação de 100,00%. Entre as seis características examinadas da bifurcação coronária, o expoente do diâmetro do vaso e a taxa de expansão de área foram duas características principais na detecção de DAC. Além disso, as combinações de (n e D_l/D_m) e (n e AER) pode diminuir substancialmente a dimensão dos recursos de entrada sem perder a precisão de detecção.

Ademais, o estudo incentiva a combinação da técnica de aprendizado de máquina e métodos de medição morfológica baseados em imagem para auxiliar os médicos a detectarem a DAC com precisão, como um método alternativo para o diagnóstico precoce não invasivo na clínica.

4.2.4 Correlation Analysis of Variables From the Atherosclerosis Risk in Communities Study (Análise de correlação de variáveis do estudo de risco de aterosclerose em comunidades)

O trabalho de Mandal *et al.* (2022) reconhece a necessidade de novos métodos alternativos (NAMs) para a testagem de produtos químicos. Ele promove as abordagens *in silico* e *in vitro* para a previsão de toxicidade devido ao baixo dano biológico, baixo custo e boa operacionalização, bem como reconhece que já existem diversos estudos em humanos que dão robustez à capacidade desses métodos de avaliar segurança química. Dessa forma, ele visa agilizar a integração de dados de coortes humanas existentes, identificando programaticamente variáveis relacionadas dentro de cada estudo.

É enfatizado que existem bancos de dados com grandes números de dados humanos que foram desenvolvidos para arquivar e facilitar o compartilhamento dessas informações. A análise de estudos de coorte propicia o agrupamento desses dados e a realização de uma metanálise confiável. Uma das vantagens elencadas é que o grande número de amostras permite uma análise cada vez mais complexa. Contudo, para isso é necessário realizar a conformidade dos dados, o que pode requerer bastante atividade laboral e tempo. Dessa forma, o texto sugere o desenvolvimento de um método automatizado para auxiliar nesse processo para evitar a fadiga dos pesquisadores, bem como para agilizar o processo da curadoria manual.

Para analisar as variáveis do estudo “Atherosclerosis Risk in Communities”, elas foram agrupadas de acordo com sua correlação dentro do estudo. Assim, foram organizadas 3.285 variáveis em 391 clusters. A qualidade dos clusters foi avaliada por meio de uma combinação de revisão manual e pelo processamento de linguagem natural (PNL) a fim de evitar o risco de viés dos revisores humanos. Em seguida, foi verificado que houve uma alta taxa de concordância entre a classificação humana e o PNL.

Embora as variáveis clusters tenham sido coesas, indicando sucesso no clustering, não foram observadas novas correlações entre os clusters. O fato de que tanto os agrupamentos originais quanto os subsequentes desses agrupamentos revelaram associações conhecidas pode ser considerado um ponto forte dessa abordagem. Ao agrupar variáveis semelhantes e, assim, facilitar o mapeamento dessas variáveis entre os estudos, esse trabalho pode permitir análises agrupadas de conjuntos de dados maiores, aumentando assim o poder de detectar novas associações de GWAS. Dessa forma, o trabalho pode impactar indiretamente novas descobertas. Para coortes que incluem um componente ômico como o RNAseq, as correlações entre as medições ômicas e agrupamentos de variáveis fenotípicas relacionadas também poderiam ser usadas para orientar os esforços de descoberta dentro de uma única coorte.

Os resultados mostraram que as variáveis foram agrupadas em clusters com temas comuns, como histórico de saúde pessoal, histórico de saúde familiar, uso de substâncias e resultados de testes clínicos. Além disso, a análise revelou relações biológicas significativas entre clusters, como a ligação entre saúde pulmonar e capacidade física. Também são identificadas algumas limitações da abordagem de correlação em relação à qualidade dos dados subjacentes e aos desafios associados à realização de uma análise uniforme de todas as variáveis de um único estudo. Já os obstáculos dos métodos da PNL são relacionados à imprecisão inerente da linguagem escrita, principalmente. As abordagens de PNL também são mais apropriadas para apoiar a harmonização de dados do que para aplicações como POAs,

onde variáveis separadas relacionadas a um evento biológico comum são consideradas conjuntamente.

Usando esses métodos, foi possível identificar relações biologicamente significativas usando os dados subjacentes. Os agrupamentos de variáveis resultantes podem então ser mapeados em sistemas baseados em conhecimento que modelam os processos biológicos subjacentes às doenças. Uma vez mapeados para potenciais mecanismos de doenças, os dados destes estudos existentes podem ser modelados de novas maneiras para criar novos insights. Nos casos em que os estudos originais contêm um componente ômico, os agrupamentos de variáveis podem ser usados para auxiliar nas análises orientadas pela descoberta dos dados ômicos. À medida que novos modelos de doenças humanas baseados em sistemas são desenvolvidos, estes agrupamentos de variáveis devem ser facilmente mapeados nesses modelos, criando uma riqueza de dados para apoiar essas análises.

Em seguida, os agrupamentos de variáveis podem ser mapeados em eventos-chave dentro dos POAs que descrevem mecanismos de toxicidade. As variáveis capturadas neste estudo corresponderiam a eventos posteriores dentro dos POA e incluiriam resultados adversos medidos diretamente em populações humanas. Ao mapear NAMs para eventos-chave iniciais dentro dos mesmos AOPs, os dados humanos poderiam ser usados para avaliar a capacidade desses NAMs de prever a toxicidade, a fim de apoiar decisões de avaliação de riscos para a saúde humana. Os dados tradicionais de toxicidade de animais de laboratório podem ser incorporados no mesmo modelo baseado em AOP e ajudar a informar as previsões de toxicidade, mas os dados de animais neste cenário não se destinam a substituir os resultados adversos do mundo real que são o alvo da avaliação de risco.

Concluindo, foi apresentado um novo fluxo de trabalho para extrair variáveis-chave de um grande estudo clínico e resumir essas variáveis para permitir a reutilização. Este fluxo de trabalho poderia ser incorporado nos esforços de harmonização de dados para reduzir o esforço humano necessário para o mapeamento inicial das variáveis e fornecer informações quantitativas importantes para auxiliar na própria harmonização. Também pode ser incorporado em projetos focados na organização do conhecimento sobre doenças humanas e nos modelos de biologia de sistemas construídos sobre essas bases de conhecimento. Os modelos de sistemas baseados em AOP podem, por sua vez, ser usados para avaliar o valor preditivo de NAMs individuais e para desenvolver modelos integrados que incorporem dados de múltiplos NAMs, bem como estudos tradicionais em animais para melhorar as previsões de toxicidade.

4.2.5 Cardiac MRI: An Alternative Method to Determine the Left Ventricular Function (RM cardíaca: um método alternativo para determinar a função ventricular esquerda)

Michler *et al.* (2023) traz que a medição dos parâmetros da função cardíaca, como volume diastólico final (VDF) e volume sistólico final (VSF), é superior quando feita através de ressonância magnética. Sequencialmente, as áreas delimitadas pelo endocárdio em cada plano de corte adquirido são determinadas durante a diástole final e a sístole final e multiplicadas pela espessura do corte. A soma desses volumes de fatia produz o VDF e o VSF. Secundariamente, o volume sistólico (VS) e a fração de ejeção (FE) podem ser calculados a partir deles.

Por definição, os músculos papilares fazem parte das áreas determinadas e, portanto, incluídos no volume sanguíneo calculado, o que significa que o volume sanguíneo é incorretamente exagerado na diástole final e na sístole final. Este erro sistemático não tem influência no volume sistólico, mas a FE é calculada incorretamente por ser muito pequena. Nos casos em que a fração de ejeção é critério de decisão terapêutica, como na troca valvar aórtica ou na indicação de implante de marca-passo intracardiaco (CDI), é indicado um método preciso para determinação da FE.

O contraste da imagem na sequência cine-SSFP entre o sangue e o miocárdio é suficiente para tomar uma decisão baseada em sinal sobre se um voxel de sangue ou de músculo miocárdico/papilar está sendo exibido. Assim, é possível obter informações mais precisas sobre o volume (EDV e ESV) dado um volume de voxel conhecido.

A abordagem foi implementada em combinação com um reconhecimento automático da forma do contorno do coração em cortes de eixo curto. O estudo objetivou comparar uma avaliação baseada em pixels dos parâmetros da função cardíaca com o método clássico de fatia em relação à diferença devido à exclusão do volume do músculo papilar.

A metodologia utilizada foi através da avaliação dos exames de ressonância magnética cardíaca de pacientes com 18 anos ou mais entre 1º de janeiro de 2016 e 11 de janeiro de 2016 foram incluídos através do Sistema de Informação Radiológica (RIS) de um determinado hospital para coleta retrospectiva de dados. Foram excluídos pacientes com cardiopatias congênitas ou anomalias cardíacas. Desses pacientes, 245 foram selecionados aleatoriamente em ordem alfabética pelo primeiro nome, e a qualidade da imagem foi avaliada na pilha cine de eixo curto. Todos os pacientes com contornos cardíacos bem definidos na pilha de imagens de eixo curto foram incluídos no estudo. Os conjuntos de dados foram analisados com syngo.via, versão 20A (Siemens Healthineers GmbH, Erlangen, Alemanha), por ser um

software que reconhece automaticamente o ápice cardíaco e a base cardíaca com base nos cortes do eixo longo.

Os resultados mostraram que os dois métodos produziram valores estatisticamente equivalentes para os parâmetros de volume e fração de ejeção do ventrículo esquerdo. A diferença entre os dois métodos é o volume dos músculos papilares. De acordo com a fórmula de cálculo do volume, o volume foi em média de 14,2 mL. A segmentação automática dos músculos papilares resultou em um valor de 5,1 mL diastólico final e 6,0 mL sistólico final e é claramente menor do que o determinado pelo método baseado em pixels. A razão para isso é que o programa cvi42 segmenta apenas o músculo papilar localizado no lúmen, mas não a parte diretamente adjacente ao miocárdio. Isto também explica a diferença entre os volumes sistólico e diastólico do músculo papilar determinado automaticamente. Isso resulta em uma proporção maior do volume do músculo papilar para volumes menores do ventrículo esquerdo. Como esperado, o método de avaliação baseado em pixels (PbM) resulta em volumes diastólicos e sistólicos finais mais baixos em comparação com o método convencional de superfície de contorno (KfM). Consecutivamente, a fração de ejeção torna-se maior com o PbM. A medida do volume diastólico final e sistólico final com inclusão dos músculos papilares deve, portanto, ser questionada.

O método baseado em pixels resolve o “problema do músculo papilar” de uma forma tecnicamente simples, através da detecção automática de sinal dentro de limites predefinidos em combinação com a detecção de contorno. Apesar de utilizar uma versão de desenvolvimento do software sem algoritmos de automação, o volume cardíaco do ventrículo esquerdo pôde ser determinado em cerca de 2 min.

Ainda, o estudo refere que futuramente a inteligência artificial (IA) será utilizada cada vez mais na vida cotidiana, incluindo aplicações médicas. Já foi comparada a fração de ejeção do ventrículo esquerdo ecocardiograficamente usando um ultrassonografista versus inteligência artificial. Foi mostrado que a IA não é inferior à medição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo com ecocardiografia em comparação com um ultrassonografista. As aplicações futuras poderiam, portanto, incluir sistemas de IA para auxiliar os examinadores em problemas de imagem.

Uma limitação do estudo é o volume sistólico real desconhecido. Com uma medição de fluxo desencadeada por ECG na aorta ascendente, isso poderia ter sido determinado, pois a medição de fluxo fornece resultados mais reprodutíveis do que a volumetria. Outra limitação é que o volume de estruturas anatômicas com morfologia bizarra, como os músculos papilares, só pode ser determinado com estimativas baseadas em diversas suposições. Uma

solução seriam medições diretas em doadores de corpos e comparação com ressonância magnética *post-mortem*.

Antes de estabelecer-lo como padrão, outra limitação é a exclusão de pacientes com qualidade de imagem moderada e, conseqüentemente, contornos cardíacos insuficientemente identificáveis. Isso parece ocorrer na maioria dos casos com fibrilação atrial, embora detectasse uma frequência cardíaca mais elevada durante a avaliação.

O método baseado em pixels mostra-se uma alternativa viável e mais fácil de implementar para avaliar a função ventricular esquerda. O PbM é fácil e rápido de realizar para a determinação da função cardíaca ventricular esquerda. Em termos de volume sistólico, fornece resultados comparáveis ao método estabelecido de área de disco/contorno e mede a função cardíaca ventricular esquerda real, deixando de fora os músculos papilares. Isso resulta em uma fração de ejeção média 6% maior, o que pode ter uma influência significativa nas decisões terapêuticas.

4.2.6 A Multimodel Fusion Method for Cardiovascular Disease Detection Using ECG (Um método de fusão multimodelo para detecção de doenças cardiovasculares usando ECG)

Conforme Song *et al.* (2022), diversas anormalidades cardíacas podem ser detectadas através do eletrocardiograma (ECG). Todavia, devido à complexidade e variabilidade dos sinais do ECG, é necessário um longo tempo de estudo e treinamento para um cardiologista interpretá-los. Dessa forma, o estudo visa investigar a acurácia de um método computacional para identificar desvios no ECG a fim de agilizar o diagnóstico médico, diminuir os diagnósticos errados e agilizar o tratamento.

O estudo reúne cerca de 140 mil registros do banco de dados chinês de doenças cardiovasculares, rotulados como normais ou anormais em relação a pelo menos um tipo de doença. Os dados foram renomeados como normais (0) ou anormais (1) para classificação binária com base nos rótulos originais. Um filtro Butterworth (Bfilter) foi usado para remover ruídos como o desvio da linha de base. Os sinais brutos de ECG de 12 canais são alimentados no filtro Butterworth e o sinal de ECG sem ruído é emitido.

Foi pesquisado métodos para detecção de registros de sinais de ECG normais/anormais, que é o primeiro passo essencial no diagnóstico de ECG. Devido à presença de vários tipos de ruído nos dados do ECG, foi proposto um método de filtragem de registros para remover registros gravemente afetados pelo ruído. Em seguida, foi desenvolvido um método de fusão de características que poderia extrair características locais

e globais de diferentes derivações para construir uma representação do registro de ECG. árvore de decisão, MLP e RESNET modificado foram implementados para fornecer linhas de base de classificação. Os métodos de conjunto foram desenvolvidos fundindo árvore de decisão com MLP e RESNET, respectivamente. Experimentos foram realizados para investigar melhor a influência da convolução multiescala e da convolução separável. Os melhores resultados foram alcançados quando a árvore de decisão foi fundida com o RESNET modificado, com três escalas e convolução separável. Os resultados da classificação dos métodos foram comparados com aqueles obtidos com vários métodos do estado da arte na mesma base de dados; o modelo do estudo de conjunto usando árvore de decisão e RESNET modificado obteve os melhores resultados de classificação.

4.2.7 In-ovo echocardiography for application in cardiovascular research (Ecocardiografia in-ovo para aplicação em pesquisa cardiovascular)

Em Hegemann *et al.* (2023), é abordado o quanto a ecocardiografia avançou bastante ao longo dos anos e, atualmente, tornou-se essencial para o estudo cardiovascular pré-clínico *in vivo*, devido ao seu fácil manuseio e disponibilidade. Além disso, os ovos incubados de galinha estão demonstrando ser um excelente método alternativo aos modelos animais, principalmente, na pesquisa oncológica.

O coração é o primeiro órgão a funcionar no embrião de galinha, em apenas 33 horas após a incubação, e após 8 dias, o órgão está completamente formado. Dessa forma, é relatado que o estudo *in-ovo* mostra-se efetivo devido ao rápido desenvolvimento, boa acessibilidade ao sistema cardiovascular e oportunidade de análise fidedigna. Além disso, a nocicepção das aves é parecida com a dos mamíferos, bem como a percepção de dor não é sentida pelo embrião.

O objetivo do estudo foi avaliar a viabilidade da ecocardiografia *in-ovo* em ovos incubados de galinha. A metodologia utilizada foi a avaliação ecocardiográfica morfológica e funcional do coração entre os dias embrionários 8 e 13 e posteriormente, foi avaliado os efeitos cardíacos da inibição do tônus simpático da exposição à hipóxia subcrônica para avaliar a sensibilidade do modelo e detectar alterações na estrutura e função cardíaca. Não obstante, foram realizadas análises interobservadores para avaliar a reprodutibilidade da análise de dados entre um ecocardiografista especialista, avançado e novato. O modelo utilizado para a pesquisa foram ovos fertilizados, livre de patógenos, de galinha *eghorn* branca (*Gallus gallus*), armazenados a 14°C.

Os resultados apresentados são de que a ecocardiografia *in-ovo* é eficaz para a avaliação de características fisiológicas e fisiopatologia da estrutura e função cardíaca em embriões de galinha, bem como apresenta alta sensibilidade por reproduzir respostas cardíacas características a intervenções simpatométricas e hipóxicas. Foi apresentado um protocolo para garantir a reprodutibilidade assertiva e evitar viés dos observadores. O estudo evidencia a viabilidade metodológica, sensibilidade e adequação translacional da ecocardiografia *in-ovo*. Em conclusão, esse método foi considerado uma ótima alternativa para refinar, reduzir e substituir o número de animais na pesquisa cardiovascular.

4.2.8 Generation and Application of the Zebrafish *heg1* Mutant as a Cardiovascular Disease Model (Geração e aplicação do mutante Zebrafish *heg1* como modelo de doença cardiovascular)

Lu *et al.* (2020) retrata a boa aplicabilidade do zebrafish em pesquisas de patologias humanas, principalmente cardiovasculares. É explicado que o primórdio do coração do zebrafish pode ser visto já no período de blástula, aproximadamente 5 horas após a fertilização. Esse coração embrionário tem duas câmaras, átrio e ventrículo. A formação cardíaca desse modelo é semelhante ao dos primeiros mamíferos. Assim, 48 horas após fertilização do zebrafish é equivalente em morfologia e fisiologia ao coração de um roedor de 12 dias ou embrião humano de 35 dias.

Além disso, uma das vantagens referida sobre o zebrafish é sobre a proximidade dos valores de referência. A frequência cardíaca desse peixe é de 120 a 140 batimentos por minutos e a do ser humano é de 60 a 100 batimentos por minutos. Enquanto isso, a frequência dos camundongos é de 300 a 600 batimentos por minutos. Outra vantagem relatada é que o oxigênio deles é obtido através de difusão, então os embriões com defeitos cardiovasculares continuam o seu desenvolvimento até a supressão completa de oxigênio. Já em mamíferos, esses defeitos poderiam acarretar em uma letalidade embrionária precoce. Consecutivamente, é possível realizar uma avaliação fenotípica maior das mutações cardiológicas.

Ainda, os trombócitos do zebrafish são análogos às plaquetas dos mamíferos. Assim, ele pode ser utilizado para estudos de hemostasia e trombose. Ademais, a transparência dos embriões facilita a rápida observação de alterações fenotípicas. Dessa forma, esse peixe torna-se um bom sistema de triagem de medicamentos cardiovasculares por sua simplicidade e adequado custo-benefício.

O modelo utilizado para esse estudo foi uma linha de zebrafish *knockout* específica para *heg1* usando tecnologia CRISPR/Cas9. Todas as experiências foram repetidas três vezes, no mínimo. A análise estatística foi realizada no SPSS *Statistical Package*.

Nos resultados, é evidenciado que o zebrafish mutante *heg1* mimetiza características de doenças cardiovasculares humana. O mutante demonstrou malformações cardiovasculares graves, incluindo aumento do ventrículo atrial, diminuição da frequência cardíaca, trombose venosa e fluxo sanguíneo lento, que eram semelhantes à insuficiência cardíaca humana e ao fenótipo de trombose.

No estudo, é destacado que esse animal, por ser um vertebrado de complexidade inferior, possui limitações como modelo de pesquisa para cardiomiopatia dilatada ou trombose venosa. Tendo em vista que esse peixe possui apenas um átrio e um ventrículo e assim, sendo diferente da estrutura cardíaca humana. Dessa forma, esse modelo pode não ser preciso quando comparado ao fenótipo de doenças cardiovasculares humanas. Contudo, como modelo de nocaute genético, o mutante *heg1* pode ser sensível às vias de sinalização e genes reguladores relacionados ao *heg1*. Assim, ele pode ajudar no estudo das vias regulatórias que impulsionam esse fenótipos e no rastreamento de medicamentos relevantes direcionados a genes.

Por fim, apesar da limitação, é relatado que o zebrafish mutante *heg1* pode ser usado como um modelo eficaz para o estudo de insuficiência cardíaca e trombose venosa causada por modelo de cardiomiopatia dilatada humana. De modo geral, esse modelo é considerado um excelente método alternativo devido a facilidade de produzir muitos embriões e permitir a rápida avaliação dos efeitos do tratamento terapêutico de doenças cardiovasculares.

4.2.9 Expression and Purification of Recombinant GHK Tripeptides Are Able to Protect against Acute Cardiotoxicity from Exposure to Waterborne-Copper in Zebrafish (Expressão e purificação de tripeptídeos GHK recombinantes são capazes de proteger contra cardiotoxicidade aguda causada pela exposição ao cobre transmitido pela água em zebrafish)

Hsiao *et al.* (2020) investiga o potencial efeito protetor dos complexos de peptídeo de cobre na cardiotoxicidade em embriões de zebrafish produzidos pela exposição ao cobre transmitido pela água. Os modelos da pesquisa foram embriões de zebrafish com 24 horas após fertilização. A pesquisa foi realizada avaliando diferentes concentrações de dosagem, períodos de tempo e condições ambientais. Após a coleta de um peptídeo GHK, os embriões

foram incubados apenas com cobre e cobre à base de água em um complexo com o peptídeo GHK. Assim, a cardiotoxicidade foi avaliada por meio do desequilíbrio de cobre.

O estudo utiliza a clonagem de um tripéptido GHK recombinante e a superexpressão em *E. coli* como uma proteína de fusão com marcadores duplos histidina/glutathione-S-transferase (GST) e locais de clivagem de vírus da *etch* do tabaco (TEV). Esse sistema de expressão recombinante foi utilizado como uma alternativa à síntese de peptídeos em fase sólida para reduzir o uso de produtos químicos perigosos. Assim, é possível reduzir os impactos negativos dos processos químicos na saúde humana e no meio ambiente.

Foram medidos seis parâmetros cardiofisiológicos (frequência cardíaca, intervalo de tempo nos ventrículos, volume sistólico, débito cardíaco, fração de ejeção e fração de encurtamento) em larvas de zebrafish para elucidar se a cardiotoxicidade aumentada pelos íons cobre pode ser restaurada pela administração do tripéptido GHK como resultado de sua alta afinidade para se ligar ao cobre. Foi observado uma diminuição considerável na frequência cardíaca e um aumento no intervalo de batimentos cardíacos em embriões de zebrafish após incubação com 10 nM de CuSO₄. Contudo, esta cardiotoxicidade aguda foi recuperada pela administração de tripéptido GHK, mesmo na concentração mais baixa de 1 nM, onde se demonstrou que o complexo GHK-Cu minimiza os efeitos da toxicidade de CuSO₄ numa proporção GHK:Cu de 1:10.

O estudo mostrou que um peptídeo GHK poderia resgatar a cardiotoxicidade induzida pelo cobre. Nos demais parâmetros de função cardiovascular, apenas o débito cardíaco apresentou aumento significativo após exposição com 1 nM do peptídeo GHK. Embora tenha havido uma redução aparente nas frações de encurtamento e ejeção após incubação das larvas com CuSO₄ 10 nM isoladamente e em co-tratamento com peptídeo GHK 10 e 100 nM, isso não foi estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle. Resultado semelhante também foi observado para o volume sistólico. Finalmente, a administração de tripeptídeos GHK poderia restaurar a irregularidade dos batimentos cardíacos desencadeada pela exposição ao íon cobre.

Além disso, é mostrado que o intervalo de tempo entre o relaxamento muscular dos átrios e dos ventrículos também pode ser interpretado como tempo de pré-carga. Se o tempo de pré-carga diminuísse, isso afetaria a quantidade de tempo que a câmara ventricular leva para carregar sangue suficiente para bombear para todas as partes do corpo. Nesse estudo, a incubação do zebrafish no tripéptido GHK e suas combinações aumentou significativamente o intervalo de tempo átrio-ventrículo. É dito que em estudos anteriores sobre o GHK

demonstraram que ele pode suprimir o fibrinogênio, que desempenha um papel no aumento da viscosidade do sangue, estimulando a formação de coágulos sanguíneos. Esta supressão resulta numa diminuição da viscosidade do sangue, o que, portanto, diminui a resistência do sangue que entra na câmara cardíaca e aumenta o fluxo sanguíneo para o coração, o que pode ser um possível mecanismo de como o GHK poderia diminuir o tempo necessário para o coração pré-carregar o sangue. na câmara.

Em conclusão, os resultados recolhidos no estudo demonstram que o tratamento com cobre pode induzir irregularidade na frequência cardíaca em embriões de zebrafish, e este efeito adverso pode ser bem recuperado pela administração do tripéptido GHK recombinante. Para a cardiofisiologia, o cobre e o GHK-Cu só poderiam alterar a frequência e a regularidade dos batimentos cardíacos no zebrafish, sem alterar a dimensão da câmara cardíaca. Evidencia-se que dados coletados no estudo sobre o zebrafish podem promover novos testes sobre o tripéptido GHK como um agente potente para desintoxicação ou cardioproteção em roedores e outros testes pré-clínicos em animais vertebrados.

4.2.10 Permeability Data of Organosulfur Garlic Compounds Estimated by Immobilized Artificial Membrane Chromatography: Correlation Across Several Biological Barriers (Dados de permeabilidade de compostos organossulfurados de alho estimados por cromatografia de membrana artificial imobilizada: correlação entre várias barreiras biológicas)

O trabalho de Ramirez *et al.* (2021) inicia destacando o papel de dietas ricas em frutas e vegetais como um fator promotor da saúde e redução do risco de doenças crônicas. Entre esses alimentos, destaca-se o gênero *Allium*. É ressaltado que a literatura relata diversos benefícios do alho e de seus bioativos como a proteção cardiovascular, melhora do estresse oxidativo, inflamação, efeitos obesogênicos e disfunção mitocondrial.

O texto refere que a fim de garantir a eficácia do fitoterápico é essencial que ele consiga atingir os locais alvo do tratamento, assim é preciso avaliar *in vivo* a absorção, distribuição, metabolismo e excreção desses compostos. A permeabilidade celular dos compostos bioativos é um dos principais parâmetros físico-químicos para considerar na seleção de terapias. Para estimar a permeabilidade celular foram propostos diversos modelos de absorção a exemplo de modelos baseados em células e modelos baseados em tecidos. É relatado que embora esse modelos sejam úteis em termos de previsão de permeabilidade, eles

apresentam diversas desvantagens, incluindo procedimentos experimentais complexos e de alto custo, bem como questões éticas associadas a ensaios baseados em animais.

Alternativamente, abordagens *in silico* servem para fornecer informações primárias sobre os mecanismos de biodisponibilidade dos medicamentos. Nesse contexto, métodos alternativos, como os cromatográficos, que empregam colunas cromatográficas de membrana artificial imobilizada (MAI), têm sido amplamente reconhecidos como uma ferramenta valiosa para modelar processos na biofase, uma vez que os componentes dos sistemas cromatográficos e biológicos são comparáveis.

Dessa forma, o estudo procurou identificar os dados de permeabilidade de compostos organossulfurados de alho estimados por cromatografia de membrana artificial imobilizada (MAI). Os principais objetivos do estudo foram construir diferentes modelos de relações quantitativas entre estrutura e retenção (QSRR) para obter alguns insights sobre o mecanismo de retenção de MAI para os 28 fitoquímicos com grupos contendo enxofre em estudo. Bem como, teve como objetivo estabelecer se, e em que medida, as medidas cromatográficas MAI para os compostos organossulfurados (OSC) alvo servem para avaliar os parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). Para garantir a confiabilidade dos dados *in silico* sobre absorção gastrointestinal humana, barreira hematoencefálica e K_{pskin} calculados a partir das plataformas web SwissADME e PreADMET, o espaço preditor de cada plataforma foi analisado. Análise de regressão múltipla (MLR) e projeções de mínimos quadrados parciais (PLS) foram os métodos selecionados para construir diferentes modelos estatísticos entre os parâmetros cromatográficos do MAI e os descritores estruturais. A determinação do número significativo de componentes do PLS foi feita por validação cruzada. A análise da MLR foi realizada usando o MINITAB® Release 17, enquanto a análise do PLS foi realizada usando o software SIMCA-P 7.01.

Por fim, para garantir a bioeficácia das OSC, uma primeira avaliação deve ser realizada em termos do potencial farmacocinético dos referidos agentes fitoquímicos. Os resultados do estudo provaram que uma modelagem de relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR) baseada *in silico* era uma abordagem conveniente para avaliar diferentes parâmetros de permeabilidade OSC. Toda essa informação dá uma ideia dos mecanismos implicados durante a interação OSC-membrana. Em resumo, as evidências no estudo apresentadas sugerem que, em linhas gerais, os compostos organossulfurados com grupos sulfeto apresentaram maior retenção cromatográfica utilizando a coluna MAI e, conseqüentemente, maior capacidade de permeação, que foi principalmente associada a interações lipofílicas/polares. Pelo contrário, os OSCs ionizáveis mostraram uma menor

capacidade de permeação como resultado de diferentes interações membrana-analito. Portanto, pode-se concluir que as propriedades do ADME em estudo são fortemente dependentes de fatores hidrofóbicos expressos pelo $\log k'$ (MAI), o que evidencia o grande potencial das fases do MAI no desenvolvimento de modelos QSAR.

4.2.11 A glance at the application of CRISPR/Cas9 gene-editing technology in cardiovascular diseases (Um olhar sobre a aplicação da tecnologia de edição genética CRISPR/Cas9 em doenças cardiovasculares)

Inicialmente, Roshanravan *et al.* (2022) trata sobre a importância do estudo dos mecanismos moleculares para explicar o surgimento de casos de doenças cardiovasculares que não estão diretamente relacionados aos principais fatores de risco amplamente divulgados, pois já foi cientificamente comprovado a importância da predisposição genética nesses casos. É relatado que a investigação de novos genes relacionados a doenças cardíacas pode promover novas abordagens terapêuticas. Dessa forma, esse estudo foca na estratégia de edição de genoma para corrigir mutações que desencadeiam alterações cardiovasculares.

O sistema de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter espaçadas associada à proteína Cas9 (CRISPR/Cas9) foi desenvolvido como a terceira geração de tecnologia de edição de genes e tornou-se amplamente usada por ser uma ferramenta de edição de genoma em biologia molecular com ótimos benefícios, como simplicidade, especificidade, boa repetibilidade, ciclo curto, conveniência e bom custo-benefício.

Existem diversos métodos de edição genética, como edição da nuclease de “dedo de zinco”, nucleases dos efetores semelhantes a ativadores de transcrição (TALENs) e CRISPR/Cas9. A edição da nuclease de “dedo de zinco” possui o intuito de encontrar uma sequência específica da fita de DNA alvo, liga-se à mesma e a porção nuclease é responsável pela clivagem do DNA. Já a edição genética do tipo TALENs utiliza o reconhecimento da região do DNA realizado pelas proteínas efetoras semelhantes a ativadores de transcrição. Essa técnica é capaz de reconhecer qualquer sequência de DNA, independentemente do seu tamanho. Assim, dependendo do tipo de aminoácido da composição, ela pode tornar-se específica para diferentes DNA alvos. Por fim, o CRISPR/Cas9 contém dois elementos: o RNA guia (gRNA) e a enzima Cas9. O gRNA encaixa-se em uma estrutura maior de RNA, localizada no DNA alvo, e coloca a enzima cas9 na posição desejada no DNA. Logo após, o corte é realizado a partir do ponto alvo do DNA.

O CRISPR/Cas9 aplicado em modelos *in vitro* mostrou ótimos resultados para

aplicações em estudos *in vivo* e em humanos. São citados estudos em que o CRISPR/Cas9 auxiliou na descoberta de alternativas para tratamento de doenças cardiovasculares, por exemplo: KCNQ1-SupRep por CRISPR-Cas9 em cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) para correção completa da síndrome do QT longo e dupla nickase em iPSCs humanas para gerar modelos *in vitro* de nocaute específicos para alelos da síndrome do QT longo da canalopatia.

O CRISPR/Cas9 em modelos *in vivo* revelou-se promissor para alterar a função de genes ligados às doenças cardiovasculares. Ele foi aplicado em animais de diferentes portes, como zebrafish, camundongos e porcos. Algumas mutações causadoras de cardiomiopatias, incluindo síndrome de Barth, síndrome do QT longo, cardiomiopatia hipertrófica e distrofia muscular de Duchenne, foram corrigidas pela edição do genoma em cardiomiócitos derivados de iPSC específicos do animal.

É relatado que em um modelo animal, os pesquisadores indicaram que o uso do sistema Cas9 baseada no sorotipo 9 do vírus adeno-associado (VAA) pode editar eficientemente cardiomiócitos através do direcionamento específico do alelo causador da doença. Já outro modelo *in vivo* indicou que a correção do gene *Ldlr* mediada por AAV-CRISPR/Cas9 pode melhorar os fenótipos de aterosclerose e ser uma estratégia de tratamento potente para pacientes com hipercolesterolemia familiar.

Finalmente, é dito que a investigação com este método limita-se aos modelos *in vitro* e animais, pois os experimentos em humanos foram limitados devido a questões sociais e éticas.

4.2.12 7-Ketocholesterol and 7 β -hydroxycholesterol: In vitro and animal models used to characterize their activities and to identify molecules preventing their toxicity (7-Cetocolesterol e 7 β -hidroxicolesterol: Modelos in vitro e animais utilizados para caracterizar suas atividades e identificar moléculas que previnem sua toxicidade)

Vejux *et al.* (2020) afirma que atualmente existem várias linhas de evidência em numerosas linhagens celulares de diferentes espécies de que o 7-cetocolesterol (7KC) e o 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OHC) induzem efeitos colaterais citotóxicos, incluindo ruptura da homeostase RedOx, inflamação e morte celular definida como oxiaoptofagia (estresse OXIdativo + APOPTose + autoFAGIA). Isso deve-se a modificações importantes do perfil lipídico e à disfunção de organelas (mitocôndrias, lisossomos, peroxissoma). Assim como

níveis aumentados de 7KC e 7 β -OHC estão associados a doenças importantes, como doenças cardiovasculares, crônicas e neurodegeneração.

É retratado que precisa-se compreender melhor as atividades biológicas destas moléculas *in vitro* e *in vivo*, a fim de identificar alvos farmacológicos e compostos naturais e sintéticos capazes de neutralizar os efeitos colaterais induzidos por 7KC e 7 β -OHC. Além de desenvolver estratégias terapêuticas inovadoras para superar os défices em modelos animais cujos resultados são difíceis de transferir para humanos.

O estudo discutiu a biogênese e o catabolismo de 7KC e 7 β -OHC; as atividades biológicas destes oxisteróis; suas vias de sinalização associadas ao estresse oxidativo, disfunção de organelas, morte celular e inflamação; e os compostos naturais e sintéticos capazes de prevenir ou atenuar os seus efeitos citotóxicos. Foram apresentados os modelos *in vitro* e *in vivo* utilizados para demonstrar estes efeitos. Métodos alternativos potencialmente adequados aos modelos animais, como organóides, que permitam estudar as atividades biológicas de 7KC e 7 β -OHC e identificar moléculas capazes de modular as suas atividades biológicas também foram discutidos.

Sobre os modelos *in vitro*, a toxicidade de certos oxisteróis, como 7KC e 7 β -OHC, e a suspeita de mutagenicidade de alguns deles, como os 5,6-epóxidos, levaram ao estudo das propriedades tóxicas e mutagênicas dessas moléculas em diferentes modelos celulares. Utilizando o teste de Ames, não foi encontrada atividade mutagênica de 7KC, 7 β -OHC e 5,6-epóxidos, enquanto no colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) foi ligeiramente mutagênico. No entanto, os 5,6-epóxidos foram mutagênicos em elevada concentração em fibroblastos pulmonares de hamster chinês V79 e induziram a transformação de células embrionárias murinas. Além disso, nenhuma genotoxicidade foi observada quando células fibroblásticas CHO e Indian Muntjac foram expostas a 5,6-epóxidos. Com base nestes diferentes estudos, considera-se improvável que os 5,6-epóxidos sejam diretamente cancerígenos. Sendo a aterosclerose a primeira patologia em que suspeita-se a contribuição de oxisteróis, principalmente 7KC e 7 β -OHC.

Posteriormente, modelos *in vitro* foram aplicados ao estudo de doenças cardiovasculares e identificação de compostos citoprotetores nesta área. A aterosclerose é um processo degenerativo multifatorial lento que envolve processos inflamatórios, oxidativos e citotóxicos. Como citado anteriormente, os níveis elevados de 7KC e ao 7 β -OHC no plasma possuem papéis importantes no desenvolvimento da aterosclerose. Para determinar as atividades biológicas destas moléculas, vários modelos celulares têm sido utilizados, especialmente células endoteliais, células musculares lisas e células monocíticas.

No que diz respeito aos modelos celulares que contribuem para a estrutura dos vasos, foram utilizadas células endoteliais como as células endoteliais vasculares umbilicais humanas e algumas linhas celulares endoteliais: a) células endoteliais humanas Eahy926, b) células endoteliais aórticas humanas; c) linha celular endotelial humana ISO-HAS, d) células endoteliais de rato, e) células endoteliais arteriais carótidas de rato. O modelo *in vitro* de relaxamento arterial dos anéis aórticos também foi utilizado para estudar o impacto dos 7-hidroxicolesteróis (7KC, 7 β -OHC) nas funções endoteliais. Também foram utilizadas células endoteliais derivadas de uma cultura primária de aorta de rato. Células de músculo liso A7r5 de rato e células aórticas de músculo liso vascular aórtico humano foram utilizadas para avaliar os efeitos citotóxicos de 7-KC e/ou 7- β OHC. Células musculares lisas também podem ser extraídas do tecido aórtico de pacientes. Dados obtidos em culturas primárias de camundongos (células musculares lisas arteriais coronárias de camundongos ou coelhos) também foram relatados.

Para células inflamatórias, os modelos *in vitro* mais comumente utilizados são células monocíticas/macrófagos THP-1, U937, J774, mas também RAW 264.7 e macrófagos pré-carregados (linhagem celular P388D1). Os monócitos também foram cultivados a partir de células mononucleares do sangue periférico humano ou colhidos do fluido peritoneal de camundongo ou da aorta de camundongo. Os cardiomiócitos foram estudados utilizando células cardíacas de camundongos isoladas de camundongos HL1-NB. Estes diferentes modelos celulares foram utilizados não só para estudar o impacto do 7KC e do 7 β -OHC nas células da parede vascular, mas também para identificar moléculas naturais e sintéticas capazes de prevenir a citotoxicidade do 7-KC e do 7- β OHC. Nestes modelos celulares, foram relatados os seguintes dados: A vitamina E (α -tocoferol) inibe o estresse oxidativo induzido por 7KC e a apoptose; o butirato, que pertence a uma família de metabólitos microbianos intestinais, bem como os ácidos graxos de cadeia curta diminuem a formação e a ativação do inflamassoma Nlrp3 induzido por 7KC; a epigallocatequina 3-galato (EGCG) inibe a adesão de monócitos-células endoteliais induzida por 7KC; a indicaxantina, um pigmento bioativo da fruta cacto, inibe a apoptose de células THP-1 induzida por 7KC; o extrato de folha de soja tem efeitos ateroprotetores por meio da modulação do fator 2 semelhante a Krüppel e moléculas de adesão em células endoteliais vasculares umbilicais humanas tratadas com 7KC; modulador do receptor retinóide X α (RXR α), K-80003, um medicamento antiinflamatório não esteróide, inibe a translocação citoplasmática de RXR α induzida por 7-KC; ácido tercúlico, ácido graxo ciclopropeno, antagoniza a inflamação mediada por 7KC; azelnidipina, um bloqueador dos canais de cálcio, inibe a expressão dependente de ROS da molécula de

adesão celular vascular 1 (VCAM-1) induzida por 7KC Aronox, um extrato rico em antocianinas de *Aronia melanocarpa* E, inibe a apoptose, a geração de ROS e a queda do potencial mitocondrial transmembrana induzido por 7β -OHC; o dimetilsulfóxido também previne a permeabilização da membrana lisossomal e mitocondrial e a superprodução de ROS induzida por 7β -OHC.

Existem evidências de que é difícil prever as atividades biológicas de compostos naturais ou sintéticos em humanos. Assim sendo, existe a necessidade de desenvolver novos modelos que incluam diversos parâmetros e mimetizem a complexidade de um órgão ou de todo o organismo. Estas abordagens constituem um desafio biotecnológico para prevenir e curar doenças graves, às quais não têm tratamentos eficientes disponíveis. Essas novas tecnologias de cultura de células incluem organóides, bem como modelos de sistemas microfisiológicos de órgãos em um chip e de múltiplos órgãos, também chamados de corpo em um chip, baseados em uma tecnologia microfluídica.

O *organ-on-a-chip* que imita o sistema respiratório, intestino ou cérebro pode ser produzido a partir de várias fontes, como células primárias, células-tronco pluripotentes, células-tronco embrionárias ou adultas e células-tronco pluripotentes induzidas derivadas de pacientes. As estratégias de *organ-on-a-chip* são baseadas em sistemas celulares microfluídicos para modelar funções fisiológicas de tecidos ou órgãos. Para este fim podem ser utilizados diferentes tipos de células estaminais. Atualmente, o foco não é reconstruir um órgão vivo inteiro, mas sim imitar unidades funcionais mínimas que recapitem as funções dos tecidos e dos órgãos. O controle preciso da diferenciação de células-tronco no microambiente microfluídico torna a engenharia de tecidos e o desenvolvimento de órgãos em um chip altamente promissor.

Atualmente, foram descritos vários sistemas de prova de conceito, *organ-on-a-chip*, usando células diferenciadas de células-tronco. Células-tronco pluripotentes induzidas derivadas de pacientes e geneticamente modificadas com engenharia de tecidos para elucidar a fisiopatologia subjacente às doenças cardiovasculares foram combinadas através de 'chip de coração' para modelar a cardiopatia mitocondrial da síndrome de Barth. Esses modelos microfluídicos de órgão em um chip podem recapitular importantes funções em nível de órgão, microarquitetura multicelular e dinâmica ambiental.

Diante disso, os novos sistemas de coração e vasculatura em um chip poderiam fortalecer o desenvolvimento de plataformas adequadas de alto rendimento para o desenvolvimento de medicamentos e modelagem de doenças das principais doenças cardiovasculares. Além disso, as plataformas *organ-on-a-chip* também têm potencial para

impactar fortemente e melhorar o processo de triagem de medicamentos para doenças neurodegenerativas. Neurônios derivados de pacientes de diferentes regiões do cérebro podem ser diretamente cultivados e diferenciados em um dispositivo cérebro em um chip, onde o desenvolvimento, a progressão e os tratamentos farmacológicos da doença podem ser estudados e monitorados em tempo real para as doenças de Alzheimer e Parkinson.

Modelos personalizados de sistemas microfisiológicos de múltiplos órgãos, corpo em um chip, baseados em iPSCs derivadas de pacientes representam também uma abordagem promissora para elucidar fisiopatologia e terapias. A tecnologia de múltiplos órgãos pode imitar processos biológicos complexos envolvendo interação órgão-órgão, homeostase do sistema e farmacocinética.

Finalmente, o texto destaca que os organóides e modelos em chips baseados em tecnologias microfluídicas podem ser úteis para estudar atividades biológicas induzidas por 7KC e 7 β -OHC em diferentes órgãos e para identificar novas moléculas e novas estratégias capazes de prevenir seus efeitos colaterais. As implicações potenciais de 7KC e 7 β -OHC em muitas doenças comuns e incapacitantes estão bem documentadas. Contudo, a demonstração do envolvimento direto ou indireto destas moléculas nestas doenças ainda requer trabalhos significativos em células, modelos animais e/ou alternativas aos modelos animais. Estas diferentes abordagens permitirão compreender melhor as atividades biológicas do 7KC e do 7 β -OHC, e identificar moléculas naturais ou sintéticas, ou misturas de moléculas, capazes de prevenir os seus efeitos deletérios em doenças fatais e/ou fortemente debilitantes, com importantes impactos sociais.

5 DISCUSSÃO

A utilização de tecnologia e inovação tornam-se cada vez mais essenciais e presentes no dia a dia. De acordo com Rocha *et al.* (2023), a tecnologia e a inovação desempenham um papel fundamental no avanço da saúde, proporcionando benefícios significativos que vão desde diagnósticos mais precisos até tratamentos mais eficazes e acessíveis (Roque *et al.*, 2023).

A tecnologia facilita o acesso a diversos conjuntos de dados médicos, permitindo que pesquisadores compartilhem informações e colaborem em escala mundial. Isso acelera o ritmo das descobertas científicas e permite que os profissionais de saúde tenham uma compreensão mais abrangente das doenças e de seus potenciais tratamentos (De Negri, 2018). Ainda, novas tecnologias têm o potencial de reduzir os custos de assistência médica e aumentar a eficiência dos sistemas de saúde (De Almeida *et al.*, 2024).

Além disso, as tecnologias avançadas, como inteligência artificial (IA) e aprendizado de máquina, têm revolucionado a capacidade de diagnosticar doenças precocemente e monitorar a progressão de condições patológicas (Maia *et al.*, 2019). Por exemplo, algoritmos de inteligência artificial podem analisar grandes conjuntos de dados médicos para identificar padrões que os médicos humanos poderiam não notar, auxiliando assim em diagnósticos mais rápidos e precisos. Através disso, de acordo com Souza *et al.* (2023), novas tecnologias também podem permitir a criação de terapias personalizadas com base no perfil genético, nas características individuais e sociais do paciente. Isso inclui avanços na medicina de precisão, onde os tratamentos são adaptados às necessidades específicas e condições socioeconômicas de cada pessoa, resultando em melhores resultados clínicos e menor incidência de efeitos colaterais indesejados (Galvão *et al.*, 2024).

Em suma, a tecnologia e a inovação são fontes essenciais para o progresso das pesquisas na área da saúde, capacitando os profissionais a oferecer cuidados mais eficazes, personalizados e acessíveis (Do Nascimento *et al.*, 2024). É evidente que o aumento da gama de métodos de pesquisa tem o poder de impulsionar significativamente o número de estudos em diversas áreas. Consequentemente, ao continuar investindo em tecnologia e incentivando a inovação, pode ser possível enfrentar os desafios de saúde do século XXI e melhorar os resultados para pacientes em todo o mundo (Brasil, 2013).

Com base nos resultados apresentados previamente, os principais métodos alternativos ao uso de animais estudados serão discutidos a seguir:

5.1 Método com aprendizado de máquina

O aprendizado de máquina, do inglês "machine learning" (ML), é uma segmentação da inteligência artificial que se baseia na proposta de que sistemas podem aprender com dados, identificar padrões e fazer previsões ou tomar decisões com o mínimo de intervenção humana (Paixão *et al.*, 2022). Isso é alcançado por meio do desenvolvimento de algoritmos e modelos que permitem que as máquinas aprendam a partir dos dados, melhorando sua performance ao longo do tempo (Obermeyer; Emanuel, 2016).

Na área da saúde, o aprendizado de máquina está sendo amplamente utilizado em diversas frentes de pesquisa (Yu; Yan, 2022). Por exemplo, em diagnóstico médico, os algoritmos de ML podem analisar grandes conjuntos de dados clínicos, imagens de exames e resultados de testes laboratoriais para auxiliar os médicos na identificação precoce de doenças, como câncer e doenças cardíacas (Willeminck *et al.*, 2020). Além disso, em pesquisa clínica, o ML é empregado para identificar padrões em ensaios clínicos, prever resultados de tratamentos e personalizar terapias para pacientes com base em seu perfil genético e histórico médico (Hunt *et al.*, 2022).

No presente estudo, foram analisados seis artigos que relataram experiências com o uso de aprendizado de máquina: *GENESIS: Gene-Specific Machine Learning Models for Variants of Uncertain Significance Found in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia and Long QT Syndrome-Associated Genes* (4.2.1); *Machine-learning versus traditional approaches for atherosclerotic cardiovascular risk prognostication in primary prevention cohorts: a systematic review and meta-analysis* (4.2.2); *Coronary Artery Disease Detection by Machine Learning with Coronary Bifurcation Features* (4.2.3); *Correlation Analysis of Variables From the Atherosclerosis Risk in Communities Study* (4.2.4); *Cardiac MRI: An Alternative Method to Determine the Left Ventricular Function* (4.2.5) e *A Multimodel Fusion Method for Cardiovascular Disease Detection Using ECG* (4.2.6).

Para começar, o artigo 4.2.1 relata que o modelo *in silico* possui o potencial de prever a patogenicidade para cada variante analisada. Dessa forma, foi escolhido o modelo de aprendizado de máquina para facilitar a interpretação das variantes de significado clínico incerto. O GENESIS foi um programa desenvolvido para prever a patogenicidade de genes associados à síndrome do QT longo e à taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica. Após a concatenação de um conjunto de informações fenotípicas, função da proteína e relações genótipo/fenótipo, foi possível concluir que o método foi bem-sucedido

ao superar as abordagens divulgadas anteriormente. Apesar disso, é destacado que esse modelo ainda permanece limitado à quantidade e qualidade dos dados inseridos nele.

A seguir, o estudo 4.2.2 realiza a comparação entre os métodos tradicionais e o aprendizado de máquina para o prognóstico de risco cardiovascular aterosclerótico. Ao fazer uso da inteligência artificial com aprendizado de máquina, é evidenciado que os algoritmos do aprendizado computacional foram melhores em 1,4% quando comparados às abordagens convencionais. No entanto, é relatado que o referido método apresenta grande risco de viés, pois poucos tiveram validação externa e as instruções de reaplicação foram omitidas na maioria das vezes, além de não haver estudos prospectivos que validem os resultados obtidos por esse mecanismo.

Posteriormente, o estudo 4.2.3 utiliza o aprendizado de máquina para identificar precocemente os padrões patológicos da doença arterial coronariana. Para obter uma resposta acurada, o banco de dados foi alimentado com recursos de bifurcação coronária de imagens de angiografia por tomografia computadorizada coronariana de indivíduos doentes e saudáveis. Assim, o estudo apresenta que em comparação com os outros métodos, o aprendizado de máquina teve o melhor desempenho para a detecção de DAC e obteve precisão de 100%.

Logo após, o estudo 4.2.4 aponta a necessidade de novos métodos baratos e com baixo dano biológico para a testagem de produtos químicos. Para tal, ele utiliza o método de aprendizagem de máquina. É destacado que esse método conta com um grande banco de dados que facilita o desenvolvimento de estudos cada vez mais complexos, porém é preciso que haja um controle humano para realizar a conformidade dos dados. Assim, é criado um processo automatizado para o agrupamento de variáveis correlacionadas, e depois há uma curadoria manual.

Consecutivamente, é mostrado que houve uma alta taxa de concordância entre o processo computacional e a lógica humana. Destaca-se que os principais imbróglis enfrentados com o método foi devido a imprecisão da escrita e os principais benefícios foram a redução do trabalho manual e bom valor preditivo dos resultados.

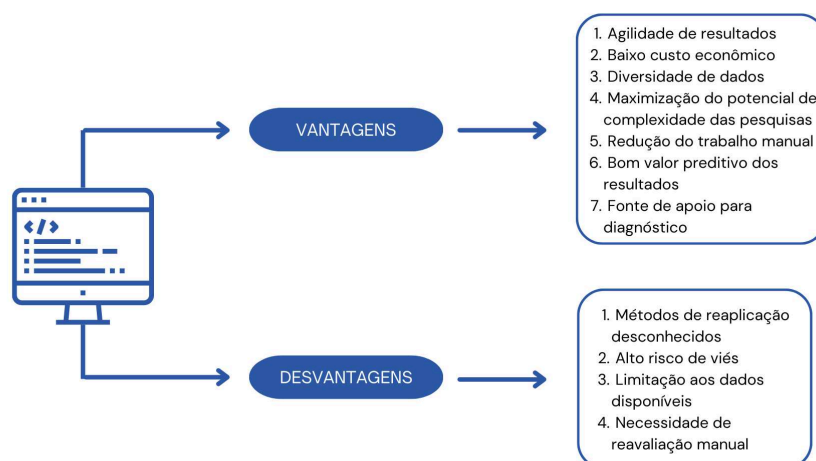
Seguidamente, o estudo 4.2.5 opera através do reconhecimento automático da forma do contorno do coração para comparar uma avaliação baseada em pixel em relação à diferença devido à exclusão do volume do músculo papilar. O texto esclarece que ambos os métodos produziram valores estatisticamente equivalentes. A diferença existente é sobre o valor de proporção que é menor no método em pixels, assim a fração de ejeção torna-se cerca de 6% maior. A principal implicação dessa diferença está na influência significativa nas decisões terapêuticas. O estudo ainda relata que a inteligência artificial pode auxiliar os

examinadores em problemas de imagem. Alguns pontos negativos exibidos são o desconhecimento do volume sistólico real e limitação em relação ao volume de estruturas anatômicas com morfologia exótica, no qual a solução seria medição direta *post-mortem*. Já entre os principais pontos positivos está na facilidade e agilidade de realizar a determinação da função cardíaca ventricular esquerda.

Por fim, o estudo 4.2.6 mostra que a interpretação do ECG demanda muito tempo de estudo e de prática. Dessa forma, é estudada a aplicação do método de aprendizado de máquina para identificar desvios no ECG para agilizar o diagnóstico médico e o tratamento, assim como diminuir os diagnósticos errados. O estudo faz uso de um banco de dados com cerca de 140 mil registros e classifica-os de forma binária (normal ou anormal). O estudo implementou 3 métodos de aprendizagem computacional para linhas de base de classificação: árvore de decisão, MLP e RESNET modificado. Os resultados da classificação dos métodos foram comparados com aqueles obtidos com vários métodos do estado da arte na mesma base de dados; o modelo do estudo de conjunto usando árvore de decisão e RESNET modificado obteve os melhores resultados de classificação.

Em suma, os artigos elucidados acima mostram que o método de aprendizado de máquina possui diversos pontos positivos como agilidade, baixo custo, grande variedade de dados, maximização do potencial das pesquisas, bom valor preditivo dos dados, fonte de apoio para diagnóstico e mostra-se superior aos métodos tradicionais. Todavia, são expostos pontos negativos como métodos de reaplicação desconhecidos, risco de viés, limitação aos dados disponíveis e necessidade de reavaliação manual.

Figura 2 – Esquema de vantagens e desvantagens do método com aprendizado de máquina baseado nos artigos



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Método *in-ovo*

O método *in-ovo* é uma técnica bastante utilizada em pesquisas na área da saúde, que envolve a manipulação e estudo de embriões de aves, mais comumente galinhas, dentro do ovo fecundado (Tainika; Bayraktar, 2021). Este método permite investigar uma variedade de processos biológicos, desde o desenvolvimento embrionário até a resposta a drogas e toxinas, devido à facilidade de acesso aos embriões e à sua viabilidade experimental. Além disso, o ambiente *in-ovo* oferece condições controladas e facilmente manipuláveis, tornando-o uma ferramenta poderosa para compreender mecanismos fisiológicos e patológicos (Spurlin III; Lwigale, 2013).

Na área da saúde, o método *in-ovo* é aplicado em diversas linhas de pesquisa, incluindo o estudo de doenças humanas, desenvolvimento de fármacos e terapias regenerativas (Miebach; Berner; Bekeschus, 2022). Atualmente, tem-se utilizado embriões de galinha para investigar os efeitos de substâncias químicas e compostos bioativos no desenvolvimento de órgãos, como o coração e o sistema nervoso central (Samak *et al.*, 2020). Assim, fornecendo *insights* sobre potenciais tratamentos para condições cardíacas congênitas e distúrbios neurológicos. Além disso, a avaliação da toxicidade de compostos farmacêuticos em embriões *in-ovo* permite uma triagem inicial eficiente e ética de possíveis medicamentos, antes de ensaios em modelos animais mais complexos e, eventualmente, em humanos (Bjørnstad *et al.*, 2015).

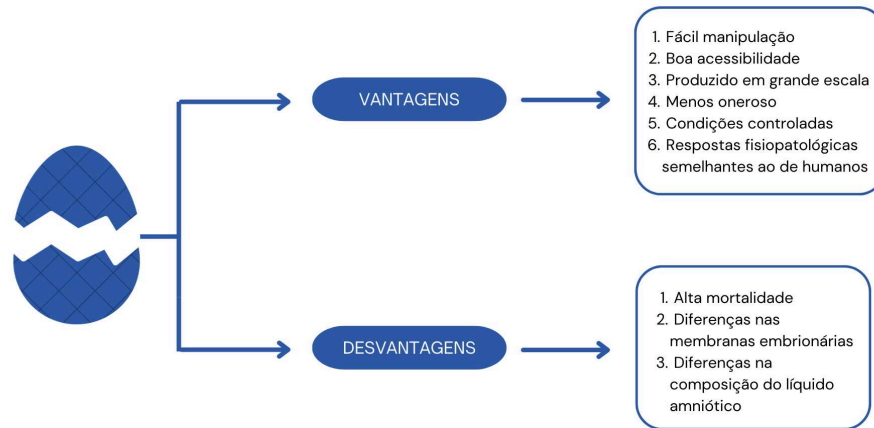
Neste estudo, foi analisado um artigo que apresentou a prática com o método *in-ovo*: *In-ovo echocardiography for application in cardiovascular research* (4.2.7).

Como relatado anteriormente, o referido estudo apresenta que a metodologia *in-ovo* é satisfatória para avaliar a função cardíaca, estruturas cardiovasculares e seus processos fisiopatológicos. Do mesmo modo, é um método que reproduz reações cardíacas características a intervenções simpatomolíticas e hipóxicas. Assim, sendo considerado como uma alternativa excelente para a redução e substituição de animais em pesquisas cardiovasculares.

Além de seus benefícios de fácil manipulação, boa acessibilidade e respostas fisiopatológicas semelhantes ao de humanos, ainda pode-se destacar que é um método que pode ser reproduzido em grande escala e é bem menos oneroso do que as pesquisas *in vivo* (Santos *et al.*, 2023). Apesar disso, as principais desvantagens da técnica *in-ovo* incluem alta mortalidade, diferenças observadas nas membranas embrionárias e diferenças na composição do líquido amniótico (Gandara; Araújo; Motta, 2008).

Em suma, diante do exposto, o método *in-ovo* mostra-se um método alternativo relevante e de qualidade à redução de pesquisas *in vivo*.

Figura 3 – Esquema de vantagens e desvantagens do método *in-ovo* baseado nos artigos



Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 Método com zebrafish

O zebrafish (*Danio rerio*) é uma espécie de peixe tropical originária do sul da Ásia. Ele é conhecido por sua rápida reprodução, transparência embrionária, sequenciamento genético completo, manutenção fácil e de baixo custo. Por essas razões, ele tornou-se um modelo de estudo popular em diversas áreas científicas, incluindo a biologia do desenvolvimento e a medicina (Canedo *et al.*, 2022). As principais características que o tornam atrativo para pesquisa são sua capacidade de regeneração de tecidos, semelhanças genéticas com os humanos em mais de 70% dos genes conhecidos e a possibilidade de manipulação genética. Além disso, sua estrutura óssea e órgãos internos são semelhantes aos dos mamíferos, facilitando estudos sobre doenças humanas (Ribeiro *et al.*, 2024).

Na área da saúde, o zebrafish está sendo amplamente utilizado em pesquisas para compreender diversas doenças humanas, como câncer, doenças cardíacas, distúrbios neurológicos e distúrbios genéticos (Stern; Zon, 2003). Esses estudos exploram a capacidade do zebrafish de gerar descendentes rapidamente, o que permite análises de gerações sucessivas para entender melhor os mecanismos subjacentes a diferentes condições patológicas. Além disso, a transparência de seus embriões possibilita a observação direta de processos biológicos complexos, como a formação de vasos sanguíneos e o desenvolvimento de órgãos, em tempo real e em todo o organismo (Chávez *et al.*, 2016). Ainda, diversos

estudos descrevem as vantagens da utilização de zebrafish em detrimento de roedores em pesquisas clínicas, como poucas restrições éticas, espaço de alojamento menor e facilidade de visualização do desenvolvimento embrionário (Adhish; Manjubala, 2023).

Na presente revisão, foram explorados dois estudos que investigaram a pesquisa com zebrafish: *Generation and Application of the Zebrafish *heg1* Mutant as a Cardiovascular Disease Model* (4.2.8) e *Expression and Purification of Recombinant GHK Tripeptides Are Able to Protect against Acute Cardiotoxicity from Exposure to Waterborne-Copper in Zebrafish* (4.2.9).

Primeiramente, o artigo 4.2.8 utiliza-se de uma espécie de zebrafish geneticamente modificado para estudar doenças cardiovasculares. Nesse estudo, foi relatado que o modelo reproduziu as mesmas características de patologias cardiovasculares de humanos. O peixe mostrou malformações cardiovasculares severas que eram parecidas com insuficiência cardíaca e trombose.

Contudo, é evidenciado que o modelo mostra-se limitado quando utilizado para investigar profundamente a cardiomiopatia dilatada ou trombose venosa por ser um animal de baixa complexidade anatômica. Assim, é dito que o peixe não pode ser acurado quando comparado ao fenótipo humano de doenças cardiovasculares. Já o modelo geneticamente modificado *knockout* específico para *heg1*, pode ajudar nas pesquisas das vias regulatórias que impulsionam esse fenótipo e das terapias medicamentosas voltadas aos genes.

Em conclusão, esse artigo salienta que o zebrafish é um modelo conveniente para estudar a insuficiência cardíaca. Sendo considerado um método alternativo satisfatório por sua facilidade de reprodução, bem como possibilidade de rápida avaliação das intervenções terapêuticas.

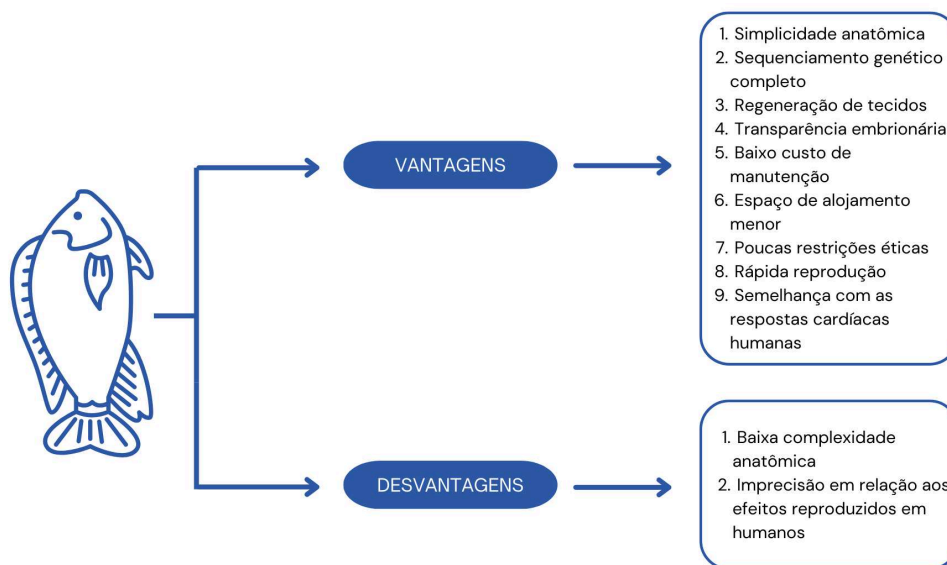
Em seguida, o artigo 4.2.9 emprega os embriões de zebrafish para estudar o potencial efeito protetor dos complexos glicil-histidil-lisina (GHK)/cobre (Cu) na cardiotoxicidade produzida pela exposição ao cobre transmitido pela água. O modelo foi escolhido por possuir uma homologia semelhante à dos humanos. É relatado que o peixe foi um excelente modelo por suas qualidades de transparência no estágio embrionário, alta fecundidade, tamanho pequeno, custo-benefício e rápido processo de desenvolvimento. Assim, mostrou-se eficaz para avaliar intervenções em nível cardiovascular.

Tendo em mente os artigos supracitados, é possível afirmar que o zebrafish possui inúmeros benefícios como um método alternativo para pesquisas. Algumas vantagens relatadas nesses artigos são a sua simplicidade anatômica, sua transparência que promove boa

visualização de alterações fenotípicas e avaliação de intervenções, seu baixo custo para manutenção, sua rápida reprodução e semelhança das respostas cardíacas humanas.

Todavia, também são mencionadas algumas desvantagens. O principal ponto negativo é sua baixa complexidade anatômica que pode ser um fator de imprecisão em relação aos efeitos reproduzidos em humanos. De maneira geral, o uso do zebrafish é um método alternativo adequado para a redução de testes em animais em pesquisas cardiovasculares.

Figura 4 – Esquema de vantagens e desvantagens do método com zebrafish baseado nos artigos



Fonte: Elaborado pela autora.

5.4 Método *in silico*

Conforme Travassos e Barros (2003), o método *in silico*, derivado do termo latino que significa "em silicone", é uma abordagem computacional utilizada na pesquisa científica para simular e prever fenômenos biológicos, químicos ou físicos. Ele envolve a utilização de modelos matemáticos e simulações por computador para analisar e prever o comportamento de sistemas complexos, como proteínas, moléculas e processos biológicos.

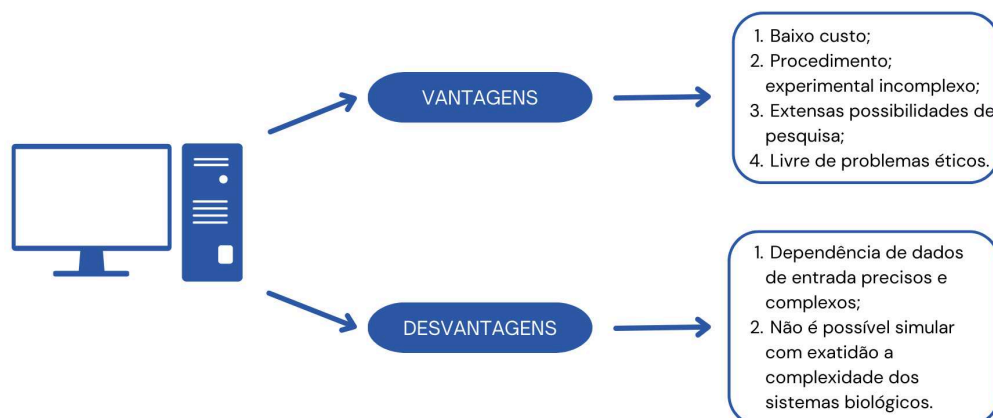
Na presente revisão, foi analisado um artigo que investigou o uso de uma membrana artificial imobilizada: *Permeability Data of Organosulfur Garlic Compounds Estimated by Immobilized Artificial Membrane Chromatography: Correlation Across Several Biological Barriers* (4.2.10).

No artigo 4.2.10, é exposto que os sistemas cromatográficos e biológicos são comparáveis. Dessa forma, o estudo utiliza a cromatografia de membrana imobilizada como método de estudo. Ainda, é descrito como o método *in silico* foi testado para garantir a exatidão dos dados emitidos por ele. Os resultados do estudo provaram que uma modelagem de QSAR baseada *in silico* era uma abordagem conveniente para avaliar diferentes parâmetros de permeabilidade dos compostos organossulfurados.

Apesar de o estudo não ter apontado pontos negativos sobre esse método, algumas literaturas relatam que ele possui dependência de dados de entrada precisos e complexos, o que poderia resultar em dados com viés ou não condizentes com a realidade. Além de não ser possível simular com exatidão a complexidade dos sistemas biológicos (Graham *et al.*, 2021).

Por fim, é possível perceber que o método *in silico* possui vantagens importantes para os estudos cardiovasculares como baixo custo, procedimento experimental incompleto, extensas possibilidades de pesquisa e livre de problemas éticos.

Figura 5 – Esquema de vantagens e desvantagens do método *in silico* baseado nos artigos



Fonte: Elaborado pela autora.

5.5 Método *in vitro*

O método *in vitro* é uma técnica utilizada em pesquisa científica que ocorre fora do organismo vivo, geralmente em ambiente laboratorial. Ele envolve a manipulação de células, tecidos ou órgãos em condições controladas para estudar processos biológicos. Esse método permite que cientistas realizem experimentos em um ambiente controlado, sem interferências de fatores externos (Estrela, 2018).

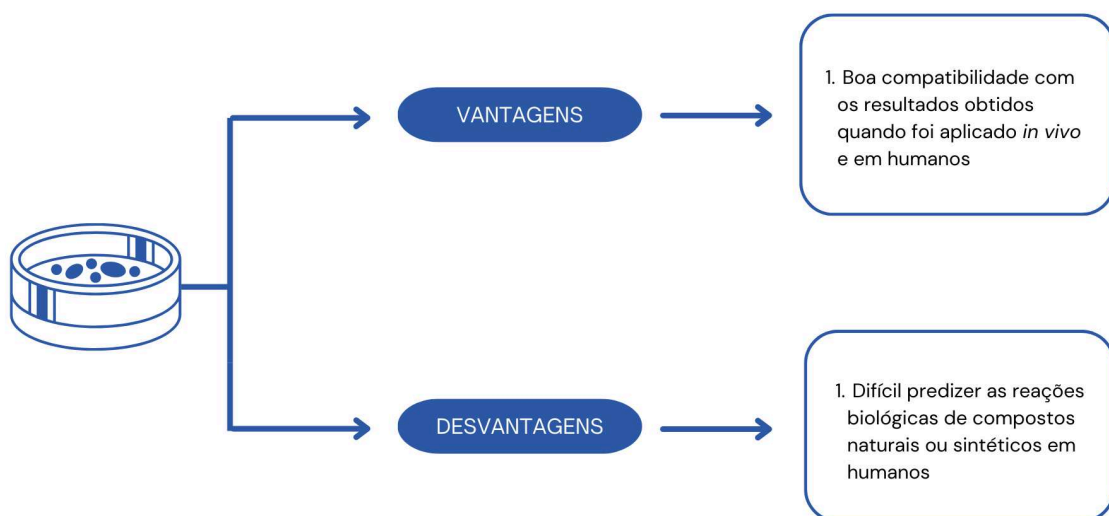
Nesta revisão, foram verificados dois artigos que estudaram o uso do método *in vitro*: *A glance at the application of CRISPR/Cas9 gene-editing technology in cardiovascular diseases* (4.2.11) e *7-Ketocholesterol and 7 β -hydroxycholesterol: In vitro and animal models used to characterize their activities and to identify molecules preventing their toxicity* (4.2.12).

Inicialmente, o artigo 4.2.11 relata sobre o procedimento de edição de genoma para corrigir mutações que provocam alterações cardiovasculares. No caso, ele mostra o uso do sistema de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter espaçadas associada à proteína Cas9. Esse sistema aplicado no modelo *in vitro* mostrou boa compatibilidade com os resultados obtidos quando foi aplicado *in vivo* e em humanos.

Seguidamente, o estudo 4.2.12 evidencia o uso do método *in vitro* para identificar linhagens celulares, através de *organ-on-a-chip*, que possuem associação com doenças cardíacas e neurológicas, bem como as que são potencialmente cancerígenas. Sendo visto que a aterosclerose é a primeira patologia em que suspeita-se a contribuição de oxisteróis. Ainda, os modelos *in vitro* foram utilizados para reconhecer compostos citoprotetores do coração.

Logo após, o texto revela que é difícil prever as reações biológicas de compostos naturais ou sintéticos em humanos. Consequentemente, é preciso desenvolver novos modelos que incluam múltiplos parâmetros e retratem a complexidade de um órgão ou de todo o organismo.

Figura 6 – Esquema de vantagens e desvantagens do método *in vitro* baseado nos artigos



Fonte: Elaborado pela autora.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Primeiramente, sobre o método com aprendizado de máquina, os artigos supracitados mostram que o referido método conta com muitas vantagens como agilidade de resultados, baixo custo econômico, grande diversidade de dados, maximização do potencial de complexidade das pesquisas, redução do trabalho manual, bom valor preditivo dos resultados, fonte de apoio para diagnóstico e mostra-se superior aos métodos tradicionais. No entanto, essa técnica também possui pontos ruins como métodos de reaplicação desconhecidos, alto risco de viés, limitação aos dados disponíveis e necessidade de reavaliação manual.

Frente ao método *in-ovo*, esse processo ostenta benefícios relevantes para a pesquisa cardiovascular como a fácil manipulação, condições controladas, boa acessibilidade e respostas fisiopatológicas semelhantes ao de humanos. Bem como, destaca-se que é um método que pode ser reproduzido em grande escala e é bem menos oneroso do que as pesquisas *in vivo*. Apesar disso, as principais desvantagens da técnica *in-ovo* incluem alta mortalidade, diferenças observadas nas membranas embrionárias e diferenças na composição do líquido amniótico. Ademais, o método *in-ovo* mostra-se um método alternativo relevante e de alta qualidade à redução de pesquisas em animais.

Referente ao método com zebrafish, ele já é amplamente utilizado na área científica e possui diversos benefícios como um método alternativo ao uso de animais. Suas principais vantagens relatadas anteriormente na análise dos artigos são a simplicidade anatômica, sequenciamento genético completo, regeneração de tecidos, transparência embrionária que promove boa visualização de alterações fenotípicas e avaliação de intervenções, baixo custo de manutenção, espaço de alojamento menor, poucas restrições éticas, rápida reprodução e semelhança com as respostas cardíacas humanas.

Não obstante, ele mostra desvantagens como sua baixa complexidade anatômica que pode ser um fator de imprecisão em relação aos efeitos reproduzidos em humanos. Apesar desses pontos, o uso do zebrafish é um método alternativo excelente para a redução de testes em animais e refinamento nas pesquisas cardiovasculares.

Sobre o método *in silico*, não é exposto diretamente pontos negativos sobre esse método no artigo estudado, porém algumas literaturas relatam que ele possui dependência de dados de entrada precisos e complexos, o que poderia resultar em dados com viés ou não condizentes com a realidade. Assim como não é possível simular com exatidão a complexidade dos sistemas biológicos. Todavia, é possível afirmar que o método *in silico* possui vantagens importantes para os estudos cardiovasculares como baixo custo,

procedimento experimental incompleto, extensas possibilidades de pesquisa e livre de problemas éticos.

Por fim, sobre o método *in vitro*, os artigos mostraram boa compatibilidade entre esse método e os modelos *in vivo* e em humanos. No entanto, é dito também que é difícil prever as reações biológicas de compostos naturais ou sintéticos em humanos. Consequentemente, é preciso desenvolver novos modelos que incluam múltiplos parâmetros e retratem a complexidade de um órgão ou de todo o organismo.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se, após a discussão de diversos artigos que utilizaram métodos alternativos ao uso de animais de laboratório em pesquisas cardiovasculares, que o método alternativo de escolha dependerá do objetivo da pesquisa. Assim como nas pesquisas *in vivo*, os métodos estudados apresentaram suas vantagens e desvantagens, como limitações técnicas e necessidade de validação. No entanto, é possível perceber que os resultados obtidos nos estudos com métodos alternativos mostram-se satisfatórios e, muitas vezes, superiores quando comparados aos estudos em animais devido aos seus potenciais de agilidade de resultados, baixo custo econômico, grande diversidade de dados e maximização do potencial de complexidade das pesquisas.

REFERÊNCIAS

ADHISH, M.; MANJUBALA, I. Effectiveness of zebrafish models in understanding human diseases—A review of models. **Heliyon**, 2023.

ANDERSEN, M. L.; WINTER, L. M. F. Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. e20170238, 2019.

BALCOMBE, J. P. *Animals in Higher Education: Problems, Alternatives and Recommendations*. **Humane Society Press**, Washington, D.C. 2000.

BJØRNSTAD, S. *et al.* Cracking the egg: potential of the developing chicken as a model system for nonclinical safety studies of pharmaceuticals. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 355, n. 3, p. 386-396, 2015.

BRASIL. **Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa 13/2013**. Diretrizes da Prática de Eutanásia. Disponível em: http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-13-de-20.09.2013-D.O.U.-de-26.09.2012-Secao-I-Pag.-5.pdf.

BRASIL. **Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa 20/2014**. Instalação e o funcionamento das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs). Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/migracao/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_20_de_30122014.html.

BRASIL. **Diretrizes metodológicas: elaboração de estudos para avaliação de equipamentos médico-assistenciais**, 2013.

BRASIL. **Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008**. Brasília, DF: Presidência da República, 2008. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm. Acesso em: 16 set. 2023.

BRASIL. **Resolução Normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014**. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, p. 09, 25 set. 2014.

BRASIL. **Resolução Normativa nº 31, de 18 de agosto de 2016**. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, p. 04, 19 ago. 2016.

BRASIL. **Resolução nº 45, de 22 de outubro de 2019**. Reconhece método alternativo ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 208, p. 14, 25 out. 2019.

BRASIL. **Resolução Normativa nº 49, de 07 de maio de 2021.** Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de ensino e pesquisa científica e dá outras providências. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 89, p. 5, 10 mai. 2021.

BRASIL. **Resolução Normativa nº 54, de 10 de janeiro de 2022.** Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 11, p. 18, 17 jan. 2022.

BRASIL. **Resolução Normativa nº 56, de 05 de outubro de 2022.** Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 192, p. 15, 07 out. 2022.

BRASIL. **Resolução CONCEA nº 59, de 02 de maio de 2023.** Dispõe sobre as condições que deverão ser observadas para a criação, a manutenção e a experimentação de cães e gatos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 84, p. 11, 04 mai. 2023.

BRASIL. **Resolução CONCEA nº 60, de 02 de maio de 2023.** Dispõe sobre as condições que deverão ser observadas para a criação, a manutenção e a experimentação de primatas não humanos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 84, p. 11, 04 mai. 2023.

BRASIL. **Resolução CONCEA nº 61, de 02 de maio de 2023.** Dispõe sobre as condições que deverão ser observadas para a criação, a manutenção e a experimentação com peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 84, p. 12, 04 mai. 2023.

BRASIL. **Resolução CONCEA nº 62, de 02 de maio de 2023.** Dispõe sobre as condições que deverão ser observadas para a criação, a manutenção e a experimentação com anfíbios e serpentes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 84, p. 13, 04 mai. 2023.

BRASIL. **Resolução CONCEA nº 63, de 02 de maio de 2023.** Dispõe sobre as condições que deverão ser observadas para a criação, a manutenção e a experimentação de pequenos ruminantes mantidos em instalações de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 84, p. 13, 04 mai. 2023.

BRASIL. **Resolução CONCEA nº 64, de 02 de maio de 2023.** Dispõe sobre as condições que deverão ser observadas para a criação, a manutenção e a experimentação de grandes ruminantes mantidos em instalações de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 84, p. 14, 04 mai. 2023.

BRASIL. **Resolução CONCEA nº 65, de 02 de maio de 2023.** Dispõe sobre as condições que deverão ser observadas para a criação, a manutenção e a experimentação de equídeos mantidos em instalações de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 84, p. 15, 04 mai. 2023.

BRASIL. **Resolução CONCEA nº 66, de 02 de maio de 2023.** Dispõe sobre as condições que deverão ser observadas para a criação, a manutenção e a experimentação de suínos

mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 84, p. 16, 04 mai. 2023.

BRASIL. **Resolução CONCEA nº 67, de 02 de maio de 2023**. Dispõe sobre as condições que deverão ser observadas para a criação, a manutenção e a experimentação de aves mantidas em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 84, p. 16, 04 mai. 2023.

BRAYNER, M. M. B. *et al.* (ed.). Ética em pesquisa no Brasil com animais de laboratório. **Modelos Animais: da Legislação A Experimentação Científica**, Fortaleza, v. 1, n. 1, p. 19-58, 2022. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/69630/1/2022_liv_msvasconcelos.pdf. Acesso em: 30 maio 2024

CANEDO, A. *et al.* O zebrafish (*Danio rerio*) encontra a bioética: os princípios éticos dos 10Rs na pesquisa. **Ciência Animal Brasileira**, v. 23, p. e-70884, 2022.

CASTRO, M.C. *et al.* Brazil's Unified Health System: The First 30 Years and Prospects for the Future. **Lancet**. 2019;394(10195):345-56. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31243-7.

CHALMERS, I.; ENKIN, M.; KEIRSE, M.J.N.C. Effective care in pregnancy and childbirth. Oxford: **Oxford University Press**; 1989.

CHÁVEZ, M. N. *et al.* Zebrafish as an emerging model organism to study angiogenesis in development and regeneration. **Frontiers in physiology**, v. 7, p. 170281, 2016.

CHEN, X. *et al.* Coronary artery disease detection by machine learning with coronary bifurcation features. **Applied Sciences**, v. 10, n. 21, p. 7656, 2020.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012**. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. Manual de legislação do sistema CFMV/ CRMVs, Brasília, DF, 11 maio 2012. P. 1-9.

CORDEIRO, A. M. *et al.* Revisão Sistemática: uma revisão narrativa. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 6, dez. 2007.

DA SILVEIRA, T. R.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 4-5, Jun 2012. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252012000200002&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 05 nov. 2023. <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252012000200002>.

DE ALMEIDA, H. F. A. *et al.* Gestão de Saúde e Segurança no Trabalho e suas Novas Tecnologias. **Revista Tópicos**, v. 2, n. 6, p. 1-12, 2024.

DE NEGRI, F. As tecnologias da informação podem revolucionar o cuidado com a saúde? **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea)**. 2018. Disponível em: <http://repositorio.ipea.gov.br/handle/11058/8614> Acesso em 30 abr. 2024

DE OLIVEIRA, G. M. M. *et al.* Estatística Cardiovascular – Brasil 2021. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 118, n. 1, p. 115-373, jan. 2022.

DE SOUZA, R. T. V. *et al.* Organoides de cérebro como modelos de doenças de Alzheimer e Parkinson: uma revisão narrativa sobre as perspectivas para medicina regenerativa e personalizada. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 56, n. 2, ago de 2023. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/203797>. Acesso em: 30 abr 2024.

DONATO, H.; DONATO, M. Etapas na Condução de uma Revisão Sistemática. **Acta Médica Portuguesa**, [S.L.], v. 32, n. 3, p. 227-235, 29 mar. 2019. Ordem dos Médicos. <http://dx.doi.org/10.20344/amp.11923>.

DO NASCIMENTO, C. T. *et al.* Integração da Telemedicina na Prática da Cirurgia Geral: Desafios e Perspectivas. **Boletim de Conjuntura (BOCA)**, v. 17, n. 51, p. 01-16, 2024.

DRAELOS, R. L. *et al.* GENESIS: gene-specific machine learning models for variants of uncertain significance found in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia and long QT syndrome-associated genes. **Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology**, v. 15, n. 4, p. e010326, 2022.

EL DIB, R. P. Como praticar a medicina baseada em evidências. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 6, n. 1, p. 1–4, mar. 2007.

ESTRELA, C. Metodologia científica: ciência, ensino, pesquisa. **Artes médicas**, 2018.

EUROPEAN UNION. **Council Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes**. Official Journal of the European Communities, L358/1, 1986.

GANDARA, C.A.T.; ARAÚJO, E.S.; MOTTA, U.Í. C. Embrião de galinha como modelo experimental para estudo de gastrosquise. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 3, pág. 247–252, maio de 2008.

GALVÃO, A. A. C. B. *et al.* O potencial da inteligência artificial no diagnóstico precoce e tratamento personalizado: Avanços e desafios na medicina moderna. **Research, Society and Development**, v. 13, n. 4, p. e0813445367, 2024.

GALVÃO, C. M.; SAWADA, N. O. Prática baseada em evidências: estratégias para sua implementação na enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 56, n. 1, p. 57–60, jan. 2003.

GALVAO, T. F.; PEREIRA, M. G. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 183-184, mar. 2014.

GRAHAM, J. C. *et al.* The performance, reliability and potential application of in silico models for predicting the acute oral toxicity of pharmaceutical compounds. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 119, n. 104816. 2021.

GONYOU, H.W. Why the study of animal behavior is associated with the animal welfare issue. **Journal of Animal Science**. v. 72, p. 2171-2177, 1994.

GREIF, S. Alternativas ao uso de animais vivos na educação: pela ciência responsável. São Paulo : **Instituto Nina Rosa**, 2003.

GUIMARÃES, M. V.; FREIRE, J. E. DA C.; DE MENEZES, L. M. B. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. **Revista Bioética**, v. 24, n. 2, p. 217–224, maio 2016.

HEGEMANN, N. *et al.* In-ovo echocardiography for application in cardiovascular research. **Basic Research in Cardiology**, v. 118, n. 1, p. 19, 2023.

HSIAO, C. D. *et al.* Expression and purification of recombinant ghk tripeptides are able to protect against acute cardiotoxicity from exposure to waterborne-copper in zebrafish. **Biomolecules**, v. 10, n. 9, p. 1202, 2020.

HUNT, C. *et al.* Recent progress of machine learning in gene therapy. **Current Gene Therapy**, v. 22, n. 2, p. 132-143, 2022.

KICKHÖFEL, E. H. P. A lição de anatomia de Andreas Vesalius e a ciência moderna. **Scientiae Studia**, v. 1, n. 3, p. 389–404, jul. 2003.

KREUTZER, F. P. *et al.* Alternative strategies in cardiac preclinical research and new clinical trial formats. **Cardiovascular Research**, [S.L.], v. 118, n. 3, p. 746-762, 8 mar. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvab075>.

LAFOLLETTE, H.; SHANKS, N. Animal experimentation: the legacy of Claude Bernard. **International Studies In The Philosophy Of Science**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 195-210, jan. 1994. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/02698599408573495>.

LIU, W. *et al.* Machine-learning versus traditional approaches for atherosclerotic cardiovascular risk prognostication in primary prevention cohorts: a systematic review and meta-analysis. **European Heart Journal-Quality of Care and Clinical Outcomes**, v. 9, n. 4, p. 310-322, 2023.

LU, S. *et al.* Generation and application of the zebrafish *heg1* mutant as a cardiovascular disease model. **Biomolecules**, v. 10, n. 11, p. 1542, 2020.

MACHADO, L. C. M. **Os limites éticos e legais da utilização de animais na indústria de cosméticos no Brasil**. 2023. 60 f. Monografia (Graduação em Direito) - Escola de Direito, Turismo e Museologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2023.

MANDAL, M. *et al.* Correlation analysis of variables from the Atherosclerosis Risk in Communities Study. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 883433, 2022.

MAIA, M. C. *et al.* Inteligência artificial para o apoio ao diagnóstico da doença de Alzheimer utilizando imagens de ressonância magnética. **Anais do III Simpósio de Inovação em Engenharia Biomédica-SABIO 2019**, p. 47, 2019.

MCALÉER, C. *et al.* On the potential of in vitro organ-chip models to define temporal pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, 3 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-45656-4>.

MICHLER, K. *et al.* Cardiac MRI: An Alternative Method to Determine the Left Ventricular Function. **Diagnostics**, v. 13, n. 8, p. 1437, 2023.

MIEBACH, L.; BERNER, J.; BEKESCHUS, S. In ovo model in cancer research and tumor immunology. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 1006064, 2022.

NICACIO, E. M. O processo de avaliação ética de pesquisas em Ciências Humanas e Sociais: considerações sobre uma peculiaridade brasileira. **Práxis Educativa**, v. 18, 2023.

NUREMBERG CODE. **Trials of war criminals before the Nuremberg Military Tribunals under Control Council Law No. 10 (2)**. Washington, DC: Government Printing Office; 1949.

OBERMEYER, Z.; EMANUEL, E.J. Predicting the Future - Big Data, Machine Learning, and Clinical Medicine. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 13, p. 1216-1219, 2016. doi: 10.1056/NEJMp1606181.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA. **Declaração universal dos direitos dos animais**. Bruxelas, 27 maio 1978.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA. **Declaração universal sobre o genoma humano e os direitos humanos**. 1997.

PAIXÃO, G. M. DE M. *et al.* Machine Learning na Medicina: Revisão e Aplicabilidade. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 118, n. 1, p. 95–102, jan. 2022.

PAGE, M. J. *et al.* The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **Bmj**, [S.L.], p. 71-71, 29 mar. 2021. BMJ.
<http://dx.doi.org/10.1136/bmj.n71>.

PARLAMENTO EUROPEO. **Directiva 2010/63 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010**. Relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Diario Oficial de la Unión Europea. Disponível em:
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:es:PDF>

RAMIREZ, D. A. *et al.* Permeability data of organosulfur garlic compounds estimated by immobilized artificial membrane chromatography: correlation across several biological barriers. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 690707, 2021.

REBOLLO, R. A. A difusão da doutrina da circulação do sangue: a correspondência entre William Harvey e Caspar Hofmann em maio de 1636. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 9, n. 3, p. 479–513, set. 2002.

RIBEIRO, O. M. *et al.* Embriões de zebrafish (Danio rerio). **Revista de Ciência Elementar**, v. 12, n. 1, 2024.

ROCHA, M. E. de S. B. *et al.* Desafios Contemporâneos na Gestão de Doenças Cardiovasculares: uma perspectiva de Saúde Coletiva. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 5776–5794, 2023. DOI: 10.36557/2674-8169.2023v5n5p5776-5794. Disponível em: <https://bjih.emnuvens.com.br/bjih/article/view/1108>. Acesso em: 1 maio. 2024.

ROSHANRAVAN, N. *et al.* A glance at the application of CRISPR/Cas9 gene-editing technology in cardiovascular diseases. **Journal of Cardiovascular and Thoracic Research**, v. 14, n. 2, p. 77, 2022.

ROQUE, C. *et al.* A Inteligência Artificial-Novas Tecnologias Na Saúde. **Caderno Discente**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 66-72, 2023.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. **Methuen & Company**, Londres, 1959.

SAMAK, D. H. *et al.* Developmental toxicity of carbon nanoparticles during embryogenesis in chicken. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 19058-19072, 2020.

SAMPAIO, R. F.; MANCINI, M. C. Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 7, n. 1, p. 83-89. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbfis/v11n1/12.pdf>. Acesso em 09 dez. 2023.

SANTOS, C. M. DA C.; PIMENTA, C. A. DE M.; NOBRE, M. R. C.. The PICO strategy for the research question construction and evidence search. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 15, n. 3, p. 508–511, jun. 2007.

SANTOS, S. M. B. *et al.* Allantoic Fluid-Based qPCR for Early Onset In Ovo Sexing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2023.

SCHNEIDER, L. R.; PEREIRA, R. P. G.; FERRAZ, L. Prática Baseada em Evidências e a análise sociocultural na Atenção Primária. *Physis*: **Revista de Saúde Coletiva**, v. 30, n. 2, p. e300232, 2020.

SONG, G. *et al.* [Retracted] A Multimodel Fusion Method for Cardiovascular Disease Detection Using ECG. **Emergency Medicine International**, v. 2022, n. 1, p. 3561147, 2022.

SPURLIN III, J.; LWIGALE, P. A technique to increase accessibility to late-stage chick embryos for in ovo manipulations. **Developmental Dynamics**, v. 242, n. 2, p. 148-154, 2013.

STERN, H. M.; ZON, L. I. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 7, p. 533-539, 2003.

TAINIKA, B.; BAYRAKTAR, Ö. H. In ovo feeding technology: embryonic development, hatchability and hatching quality of broiler chicks. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 45, n. 5, p. 781-795, 2021.

TRAVASSOS, G. H.; BARROS, M. O. Contributions of in vitro and in silico experiments for the future of empirical studies in software engineering. In: **2nd Workshop on empirical**

software engineering the future of empirical studies in software engineering. 2003. p. 117-130.

VEJUX, A. *et al.* 7-Ketocholesterol and 7 β -hydroxycholesterol: In vitro and animal models used to characterize their activities and to identify molecules preventing their toxicity.

Biochemical pharmacology, v. 173, p. 113648, 2020.

VELDEN, J. V. D. *et al.* Animal models and animal-free innovations for cardiovascular research: current status and routes to be explored. consensus document of the esc working group on myocardial function and the esc working group on cellular biology of the heart.

Cardiovascular Research, [S.L.], v. 118, n. 15, p. 3016-3051, 6 jan. 2022. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvab370>

VON STADEN, H. Herophilus: the art of medicine in early Alexandria. Cambridge: **Cambridge University Press**, 1989.

WANG, H. *et al.* 3D cell culture models: drug pharmacokinetics, safety assessment, and regulatory consideration. **Clinical And Translational Science**, [S.L.], v. 14, n. 5, p.

1659-1680, 16 jun. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cts.13066>.

WILLEMINK, M. J. *et al.* Preparing medical imaging data for machine learning. **Radiology**, vol. 295, n. 1, p. 4-15, 2020.

WORLD MEDICAL ASSOCIATION. **Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects.** 2008. Disponível em:

<https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>. Acesso em: 27 ago. 2023.

YU, D.; YAN, Z.. Combining machine learning and main path analysis to identify research front: from the perspective of science-technology linkage. **Scientometrics**, v. 127, n. 7, p. 4251-4274, 2022.

ANEXO A - MÉTODO PRISMA 2020

Seção e tópico	Item	Item da lista de checagem
Título		
Título	1	Identifique a publicação como uma revisão sistemática.
Resumo		
Resumo	2	Veja a lista de checagem PRISMA 2020 para Resumos.
Introdução		
Justificativa	3	Descreva a justificativa da revisão no contexto do que já é conhecido.
Objetivos	4	Apresente uma afirmação explícita dos objetivos ou questões abordadas pela revisão.
Métodos		
Crerios de elegibilidade	5	Especifique critérios de inclusão e exclusão da revisão e como os estudos foram agrupados nas sumarizações.
Fontes de informação	6	Especifique todas as bases de dados, repositórios de registros, sites, organizações, listas de referências e outras fontes pesquisadas ou consultadas para identificar estudos. Especifique a data em que cada fonte foi pesquisada ou consultada pela última vez.
Estratégia de busca	7	Apresente as estratégias de busca completas para todas as bases de dados, repositórios de registros e sites, incluindo filtros ou limites usados.
Processo de seleção	8	Especifique os métodos usados para decidir se um estudo atendeu aos critérios de inclusão da revisão, incluindo quantos revisores selecionaram cada registro e publicação recuperados, se trabalharam de forma independente e, se aplicável, detalhes de ferramentas de automação utilizadas no processo.

Processo de coleta de dados	9	Especifique os métodos usados para coletar dados das publicações, incluindo quantos revisores coletaram dados de cada publicação, se eles trabalharam de forma independente, quaisquer processos para obter ou confirmar dados com os autores do estudo e, se aplicável, detalhes de ferramentas de automação utilizadas no processo.
Lista de dados	10a	Liste e defina todos os desfechos cujos dados foram coletados. Especifique se foram coletados de cada estudo todos os resultados compatíveis com cada domínio de desfecho, e se não, quais os métodos usados para decidir quais resultados coletar.
	10b	Liste e defina todas as outras variáveis cujos dados foram coletados. Descreva pressupostos adotados para casos de informações faltantes ou pouco claras.
Avaliação do risco de viés dos estudos	11	Especifique os métodos usados para avaliar o risco de viés nos estudos incluídos, incluindo detalhes da(s) ferramenta(s) usada(s), quantos revisores avaliaram cada estudo e se trabalharam de forma independente e, se aplicável, detalhes de ferramentas de automação usadas no processo.
Medidas de efeito	12	Especifique para cada desfecho as medidas de efeito usadas na sumarização ou apresentação dos resultados.
Métodos de síntese	13a	Descreva os processos usados para decidir quais estudos foram elegíveis para cada síntese.
	13b	Descreva métodos demandados para preparar os dados para apresentação ou síntese, como manejo de dados faltantes nas estatísticas de sumarização ou conversões de dados.
	13c	Descreva métodos usados para tabular ou ilustrar visualmente os resultados de estudos individuais e sínteses.
	13d	Descreva métodos usados para sumarizar os resultados e apresente justificativa para a(s) escolha(s). Se uma meta-análise foi realizada, descreva o(s) modelo(s), método(s) para identificar a presença e extensão da heterogeneidade estatística e o(s) pacote(s) de software utilizado(s).
	13e	Descreva métodos usados para explorar as possíveis causas de heterogeneidade entre os resultados dos estudos.

	13f	Descreva análises de sensibilidade conduzidas para avaliar a robustez dos resultados sumarizados.
Avaliação de vieses de publicação	14	Descreva métodos usados para avaliar o risco de viés devido a resultados faltantes em uma sumarização (decorrente de vieses de publicação).
Avaliação da certeza	15	Descreva métodos usados para avaliar a certeza (ou confiança) no corpo de evidências de um desfecho.
Resultados		
Seleção dos estudos	16a	Descreva os resultados do processo de busca e seleção, desde o número de registros identificados na busca até o número de estudos incluídos na revisão, idealmente por meio de um fluxograma.
	16b	Cite estudos que parecem cumprir os critérios de inclusão, mas que foram excluídos e explique por que foram excluídos.
Características dos estudos	17	Cite cada estudo incluído e apresente suas características.
Risco de viés nos estudos	18	Apresente as avaliações do risco de viés de cada estudo incluído.
Resultados de estudos individuais	19	Para todos os desfechos, apresente para cada estudo: (a) estatística sumária para cada grupo (quando apropriado) e (b) estimativa de efeito e sua precisão, idealmente utilizando tabelas estruturadas ou gráficos.
Resultados das sínteses	20a	Para cada síntese, resuma brevemente as características e o risco de viés entre os estudos contribuintes.
	20b	Apresente os resultados de todas as sumarizações estatísticas realizadas. Se meta-análises foram feitas, apresente para cada uma a estimativa resumida e sua precisão (por exemplo, intervalo de confiança/credibilidade) e medidas de heterogeneidade estatística. Se estiver comparando grupos, descreva a direção do efeito.
	20c	Apresente os resultados de todas as investigações das possíveis causas de heterogeneidade entre os resultados do estudo.
	20d	Apresente os resultados de todas as análises de sensibilidade conduzidas para avaliar a robustez dos resultados sumarizados.

Vieses de publicação	21	Apresente avaliações de risco de viés devido a resultados faltantes (decorrentes de vieses de publicação) para cada sumarização avaliada.
Certeza da evidência	22	Apresente avaliações da certeza (ou confiança) no corpo de evidências para cada desfecho avaliado.
Discussão		
Discussão	23a	Forneça uma interpretação geral dos resultados no contexto de outras evidências.
	23b	Discuta limitações das evidências incluídas na revisão.
	23c	Discuta limitações dos processos empregados na revisão.
	23d	Discuta as implicações dos resultados para a prática, política e pesquisas futuras.
Outras informações		
Registro e protocolo	24a	Forneça informações de registro da revisão, incluindo o nome do repositório e o número de registro, ou declare que a revisão não foi registrada.
	24b	Indique onde o protocolo de revisão pode ser acessado ou indique se o protocolo não foi preparado.
	24c	Descreva e explique quaisquer alterações nas informações fornecidas no registro ou no protocolo.
Apoio revisão.	25	Descreva as fontes de apoio financeiro ou não financeiro para a revisão e o papel dos financiadores ou patrocinadores na revisão.
Conflito de interesses	26	Declare quaisquer conflitos de interesse dos autores da revisão.
Disponibilidade de dados, código e outros materiais	27	Relate quais dos itens a seguir estão disponíveis publicamente e onde podem ser encontrados: modelos de formulários para coleta de dados; dados extraídos dos estudos incluídos; dados usados para todas as análises; comando analítico; outros materiais usados na revisão.

Fonte: PAGE *et al.* (2021)