

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EDIR REZENDE JÚNIOR**

**UMA ANÁLISE CRÍTICA SOBRE A CONFIABILIDADE,  
RASTREABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DOS ESTUDOS  
NÃO CLÍNICOS DESENVOLVIDOS NO BRASIL NAS ÁREAS  
BIOMÉDICAS E PUBLICADOS EM REVISTAS CIENTÍFICAS  
NACIONAIS E INTERNACIONAIS**

Dissertação submetida ao Programa de Mestrado Profissional em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto.

Coorientador: Dr. Rodrigo Marcon.

Florianópolis/SC  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Júnior, Edir Rezende

Uma análise crítica sobre a confiabilidade, Rastreabilidade e reprodutibilidade dos estudos não clínicos desenvolvidos no Brasil nas áreas biomédicas e publicados em revistas científicas nacionais e internacionais / Edir Rezende Júnior ; orientador, João Batista Calixto ; coorientador, Rodrigo Marcon 2018.

141 p.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Ciências Biomédicas. 3. Reprodutibilidade Científica. 4. Ensaios não Clínicos. 5. Animais de Experimentação. I. Calixto, João Batista. II. Marcon, Rodrigo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

## Termo de aprovação



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me ensinado a grandeza da paciência e da perseverança frente aos meus inúmeros momentos de dificuldade. A minha família, em especial aos meus pais Rosângela e Edir, que souberam me passar a importância da educação em um ambiente totalmente inapropriado para se educar alguém. Aos meus avós, Nícia, Nadir e Mauro, por ter compartilhado comigo momentos inesquecíveis de carinho e amor. Ao meu tio Elias, uma das pessoas mais admiráveis que já conheci, o qual em muitos momentos foi também pai e irmão. Além disso, foi quem me abriu as portas para uma jornada de muito aprendizado, luta, conquistas e valores. Ao Vilson, Ana e João, família que me adotou em Florianópolis, com a qual aprendi o verdadeiro significado de simplicidade, humildade, simpatia, honestidade e amor. Ao professor João Batista Calixto, por acreditar e investir através do curso Vitae no potencial de jovens talentos para ciência. Pois foi através do Vitae, que eu iniciei minha trajetória profissional e científica. Além disso, agradeço ao professor Calixto, pela oportunidade de fazer parte da equipe científica do CIEnP e pelas orientações valiosas no desenvolvimento desta dissertação. Ao admirável amigo, mestre e pai Jamil Assreuy, pela transformadora oportunidade de vida, pela paciência, carinho e ensinamentos ao longo dos dez anos que me aturou em seu laboratório. Aos eternos amigos NOLAB, que contribuíram significativamente para o meu crescimento pessoal e científico, em especial ao Daniel Fernandes, Regina de Sordi, Adriane Madeira, Gustavo Ramos, Silvia Dal Bó, Muryel Carvalho e Ronald Paiva, pela extrema paciência, carinho e por acreditar em um potencial que nem eu mesmo sabia que tinha. Ao Rodrigo Marcon, amigo e coorientador, serei eternamente grato pela paciência, pelas valiosas contribuições científicas, pelas cansativas correções deste trabalho, e por ter acreditado e me incentivado sempre. A todos os amigos do CIEnP, que contribuíram diretamente ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho. Ao Jarbas Siqueira, Solange Quevedo, Luciléia Quevedo, Gracieti Caminha, Victor Pires, Caie Fernandes, Franciele Silveira, Janine Pfeiffer, Cristina Setim, Maria Lúica, Camila Moreira, Vanessa Quevedo, Melina Heller, Evelyn Santos, Patricia Benedet, Patricia Vianna, Sergio Donizet, Pedro Souza, Fernanda Cruz, Jeniffer, Gabriela Segat, Daniela Leite, Gustavo Ciarallo e em especial, a Edineia Lemos e a Carol Machado, pela amizade, carinho, incentivo, gargalhadas e pelos vários momentos em que me cederam sua atenção. Ao Alisson Bento e a Raquel Schwanke, pelos importantes momentos de reflexão e pelas

instigantes viagens por vários lugares do mundo via sala de cirurgia. A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFSC, por todos os ensinamentos e pela contribuição em minha formação acadêmica e científica. A todos meus amigos fora do meio científico, em especial ao Natanael Texeira, Luiz Fernando e Fabiano Gallas pela parceria, incentivo e paciência. A todos os professores e alunos de pós-graduação do país que contribuíram respondendo ao questionário.

**“Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo. Mas qualquer um de nós pode recomeçar e fazer um novo fim”.**

**(Chico Xavier)**



## RESUMO

Todos os anos, um grande número de artigos científicos na área biomédica é publicado por pesquisadores brasileiros em revistas científicas nacionais e internacionais. A maior parte destes estudos são realizados através de experimentos envolvendo o uso de animais, seja na academia ou em instituições de pesquisa. No entanto, a forma com que muitos destes trabalhos estão sendo descritos, não fornece informações suficientes para garantir sua compreensão e reprodutibilidade. Além disso, problemas no planejamento e na condução do estudo, como, por exemplo, a falta de critérios de escolha de modelos experimentais, a ausência de randomização dos grupos experimentais, a utilização errônea e/ou equivocada da análise estatística, a falta de informações quanto a qualidade sanitária dos animais, dentre outros fatores, têm levado à baixa taxa de reprodução dos estudos científicos. Este fenômeno tem como consequência a utilização irracional de animais, o desperdício de recursos humanos e financeiros. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar através de questionários e do levantamento da literatura, sobre alguns dos fatores que têm levado à crise de reprodutibilidade de trabalhos científicos envolvendo animais de experimentação. Neste contexto, foi avaliado a utilização e a importância de seguir as diretrizes *ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments)*, para o desenvolvimento e a condução de ensaios não clínicos que utilizam animais. Para isso, foi desenvolvido um questionário destinado a estudantes de pós-graduação (mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos), na área de ciências biológicas no Brasil, com perguntas que buscaram verificar seus conhecimentos acerca das diretrizes preconizadas pelo *ARRIVE*, as quais estabelecem aspectos importantes para permitir a confiabilidade e reprodutibilidade dos trabalhos científicos utilizando animais de experimentação. Além disso, foi realizado um levantamento bibliográfico de estudos não clínicos que utilizaram animais, na área de Ciências Biológicas do país, publicados pelas mesmas universidades e instituições que participaram desta pesquisa, visando comparar os resultados obtidos nos questionários com os artigos científicos publicados por tais instituições. De maneira geral, os resultados obtidos demonstraram grande disparidade entre os dados obtidos com o questionário e os trabalhos publicados pelas universidades e instituições participantes deste estudo. De fato, foi observado que 54% dos estudantes que responderam ao questionário afirmaram conhecer as

diretrizes *ARRIVE*, no entanto, apenas 4% dos trabalhos científicos analisados indicaram a utilização destas diretrizes. Em 39% dos questionários foi mencionado a realização dos ensaios de forma cega, no entanto, esse fato foi apenas descrito em 12% dos trabalhos publicados. Além disso, cerca de 93% dos estudantes informaram através do questionário, realizar a randomização dos grupos experimentais, enquanto que, apenas 18% dos trabalhos publicados descreveram tal procedimento. A realização do cálculo do tamanho da amostra foi informada em 82% dos questionários respondidos, porém, nos trabalhos analisados, foi descrita em apenas 1%. Diante do exposto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem algumas das principais causas da crise de reprodutibilidade de estudos não clínicos envolvendo animais de experimentação, realizados em universidades e instituições de pesquisa brasileiras. Com isso, este trabalho poderá fornecer uma visão bastante clara a respeito do planejamento e da condução de estudos não clínicos realizados no Brasil, além de fornecer uma estrutura comum para o planejamento e coordenação de estudos visando a obtenção de resultados mais replicáveis e reprodutíveis, que como consequência, está diretamente relacionado à redução no uso de animais, dos recursos financeiros e humanos. Sendo assim, a falta de informação e conhecimento acerca da correta condução dos estudos não clínicos em animais sugere ser um fator determinante na qualidade e na reprodutibilidade dos trabalhos científicos publicados.

**Palavras-Chave:** Ciências Biomédicas, Reprodutibilidade Científica, Ensaios não Clínicos, Animais de Experimentação.

## ABSTRACT

Every year, a large number of scientific articles in the biomedical area is published by Brazilian researchers in national and international scientific journals. Most of these studies are conducted through experiments involving the use of animals, whether in the academy and in research institutions. However, the way by which many of these works are being described do not provide enough information to guarantee their comprehension and reproducibility. In addition, problems in planning and conducting the study, such as lack of criteria for choosing experimental models, lack of randomization of experimental groups, misuse and/or misuse of statistical analysis, lack of information as well as the sanitary quality of the animals, among other factors, have led to the low rate of reproduction of scientific studies. This phenomenon has as a consequence the irrational use of animals and the waste of human and financial resources. Thus, the objective of this study was to evaluate, through questionnaires and the literature review, some of the factors that have led to the crisis of reproducibility of scientific studies involving experimental animals. In this context, the use and relevance of following the ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guidelines for the development and conduction of non-clinical trials using animals was evaluated. For that, a questionnaire was developed and sent to for postgraduate students (masters, doctoral students and postdoctoral students) in the field of biological sciences in Brazil, with questions that sought to verify their knowledge about the guidelines recommended by ARRIVE, which establish aspects important to allow the reliability and reproducibility of scientific works using experimental animals. In addition, a bibliographic survey of non-clinical studies using animals in the Biological Sciences area of the country, published by the same universities and institutions that participated in this research was carried out, aiming at comparing the results obtained in the questionnaires with the scientific articles published by these institutions. In general, the results obtained showed a great disparity between the data obtained with the questionnaire and the works published by the universities and institutions participating in this study. In fact, it was observed that 54% of the students who answered the questionnaire stated that they knew the ARRIVE guidelines, however, only 4% of the scientific papers analyzed described the use of these guidelines. In 39% of the questionnaires, the blind trials were mentioned, however, it was only described in 12% of the published studies. In addition, about 93% of the students reported

using the questionnaire to perform randomization of the experimental groups, while only 18% of the published studies described such a procedure. The calculation of the sample size was reported in 82% of the questionnaires answered, but in the analyzed papers it was described in only 1%. In view of the above, the results obtained in this study evidenced some of the main causes of the reproducibility crisis of non-clinical studies involving experimental animals, carried out in Brazilian universities and research institutions. In Brazil, this work may provide new insight about the planning and perform of non-clinical studies conducted in Brazil, as well as providing a common framework for planning and coordinating studies, aiming at obtaining more replicable and reproducible results, which consequence, impact in the reduction in the use of animals, financial and human resources. The lack of information and knowledge about the guidelines to conduct of non-clinical animal studies has proved to be a determining factor in the quality and reproducibility of published scientific papers.

**Keywords:** Biomedical Sciences, Scientific Reproducibility, Non-Clinical Trials, Experimental Animals.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativa de gastos em pesquisa não clínica anual nos EUA e fatores que contribuem para a irreprodutibilidade de estudos não clínicos.....	35
Figura 2. Prevalência de Irreprodutibilidade de Estudos não Clínicos Publicados.....	36
Figura 3. Distribuição dos participantes do questionário por regiões do país.....	59
Figura 4. Número de questionários respondidos por estados brasileiros.....	61
Figura 5. Distribuição dos questionários respondidos por universidades e instituições de pesquisa.....	62
Figura 6. Distribuição dos questionários respondidos por departamento de pesquisa.....	63
Figura 7. Perfil de resposta do questionário, descrito em porcentagem, quando perguntado sobre a conduta do pesquisador quando os dados do estudo não foram estatisticamente significantes.....	65
Figura 8. Perfil de resposta do questionário, descrito em porcentagem, quando perguntado sobre a estimativa do tamanho da amostra experimental.....	66
Figura 9. Análise de alguns parâmetros obtidos apenas através dos trabalhos publicados.....	70
Figura 10. Comparação de questões relacionadas aos animais, entre o questionário e os trabalhos publicados pelas universidades e instituições que participaram desta pesquisa.....	73
Figura 11. Comparação de questões relacionadas aos cuidados com os animais, entre o questionário e os trabalhos publicados pelas universidades e instituições que participaram desta pesquisa.....	75
Figura 12. Comparação de alguns parâmetros obtidos através do questionário e dos trabalhos publicados pelas universidades e instituições que participaram desta pesquisa.....	78
Figura 13. Comparação entre os resultados obtidos neste estudo com dados da literatura.....	80
Figura 14. Avaliação das colaborações internacionais dos trabalhos científicos brasileiros selecionados para este estudo.....	82
Figura 15. Avaliação do fator de impacto das revistas científicas as quais foram publicados os trabalhos selecionados para este estudo.....	83



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Filtros utilizados para a coleta dos trabalhos publicados.....	55
Tabela 2. Números de trabalhos publicados obtidos a partir de filtros de pesquisa.....	68



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARRIVE	Animal Research: Reporting of <i>In Vivo</i> Experimentos
AVE	Acidente Vascular Encefálico
BJP	British Journal of Pharmacology
BPL	Boas Práticas de Laboratório
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUMA	Centro Universitário do Maranhão
CIEnP	Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CONSORT	Consolidated Standards of Reporting Trials
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GSPC	Gold Standard Publication Checklist
HC-RS	Hospital das Clínicas do Rio Grande do Sul
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IB	Instituto Butantã
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
NC3Rs	National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research
NIH	National Institutes of Health
NPG	Nature Publishing Group
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
PNAS	Proceedings of the National Academy of Sciences
PUC-RS	Universidade Pontifícia do Rio Grande do
RP-USP	Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto
SPF	Specific Pathogen Free
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

UFSCAR	Universidade Federal de São Carlos
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
UNESP	Universidade do Estado de São Paulo
UNIFRAN	Universidade de Franca
USP	Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1. Estudos não clínicos com animais de experimentação.....	23
1.1.1. Histórico e legislações.....	23
1.1.2. Importância dos estudos não clínicos com animais de experimentação.....	26
1.2. Reprodutibilidade científica.....	29
1.2.1. Limitações.....	29
1.3. Irreprodutibilidade de estudos não clínicos com animais de experimentação.....	31
1.4. Os custos financeiros de pesquisas não clínicas irreprodutíveis nos Estados Unidos da América.....	33
1.5. Descrições/informações para o delineamento experimental de estudo não clínico envolvendo animais de experimentação.....	36
1.5.1. Informações sobre os animais utilizados no estudo.....	36
1.6. Possíveis soluções para reduzir a incidência de irreprodutibilidade em pesquisa não clínica.....	40
1.7. Diretrizes internacionais para estudos não clínicos com animais de experimentação.....	42
<b>2. HIPÓTESE.....</b>	<b>45</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>47</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
4.1. Objetivos gerais.....	49
4.1.1. Objetivos específicos.....	49
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
5.1. Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CESPH).....	51
5.2. Elaboração do Questionário.....	51
5.2.1. Distribuição do questionário.....	52
5.2.2. Coleta de dados.....	54
5.2.3. Análise dos dados.....	54

5.3. Pesquisa das universidades e instituições participantes do estudo.....	54
5.3.1. Coleta dos trabalhos publicados.....	55
5.3.2. Distribuição aleatória do número total de trabalhos publicados.....	56
5.3.3. Análise dos trabalhos selecionados.....	57
5.3.4. Análise dos dados encontrados pelos avaliadores.....	57
5.4. Avaliações dos resultados obtidos através do questionário enviado aos estudantes de pós-graduação, dos trabalhos publicados pelas universidades e instituições participantes e dos resultados obtidos da literatura.....	58
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
6.1. Resultados referente a participação dos pós-graduandos através do questionário.....	59
6.1.2. Dados sobre a distribuição dos participantes por regiões do Brasil.....	59
6.1.3. Dados sobre a distribuição dos participantes da pesquisa por estados brasileiros.....	60
6.1.4. Dados sobre a participação das universidades e instituições de pesquisa.....	61
6.1.5. Dados sobre a participação dos departamentos de pós-graduação.....	63
6.2. Resultados obtidos através do questionário enviado aos estudantes de pós-graduação.....	64
6.2.1. Avaliações sobre a conduta do pesquisador quando os dados obtidos no estudo não foram estatisticamente significantes entre grupos experimentais.....	64
6.2.2. Avaliações sobre a maneira com a qual é realizado o cálculo do tamanho da amostra experimental.....	65
6.3. Levantamento bibliográficos de trabalhos não clínicos <i>in vivo</i> publicados pelas mesmas universidades e instituições participantes da pesquisa.....	67
6.3.1. Seleção de trabalhos publicados a partir de critérios de inclusão.....	67

6.4. Avaliações dos resultados obtidos através dos trabalhos publicados pelas universidades e instituições participantes da pesquisa.....	69
6.4.1. Questões relacionadas ao planejamento experimental, analisadas apenas nos resultados obtidos através dos trabalhos publicados.....	69
6.5. Resultados obtidos através do questionário enviado aos estudantes de pós-graduação e comparados com trabalhos publicados pelas universidades e instituições participantes.....	71
6.5.1. Avaliações do conhecimento dos pesquisadores a respeito dos animais utilizados no estudo, e uma correlação dos mesmos parâmetros em trabalhos publicados.....	71
6.5.2. Avaliações do conhecimento dos pesquisadores a respeito dos cuidados com os animais utilizados no estudo, e uma correlação dos mesmos parâmetros em trabalhos publicados.....	73
6.5.3. Questões relacionadas ao planejamento experimental, analisadas tanto nos resultados obtidos através dos questionários, quanto nos trabalhos publicados.....	75
6.6. Avaliações dos resultados obtidos através do questionário enviado aos estudantes de pós-graduação, dos trabalhos publicados pelas universidades e instituições participantes e dos resultados obtidos da literatura.....	79
6.6.1. Questões relacionadas ao planejamento experimental.....	79
6.7. Avaliações de parcerias científicas entre instituições de pesquisa brasileiras e internacionais, bem como a influência do fator de impacto das revistas científicas nas descrições dos trabalhos publicados.....	81
6.7.1. Questões relacionadas as colaborações científicas realizadas entre universidades e instituições brasileiras com centros de pesquisas internacionais.....	81
6.8. Questões relacionadas ao fator de impacto das revistas científicas onde foram publicados os trabalhos selecionados das universidades e instituições de pesquisa participantes deste estudo..	82
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>107</b>

<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>109</b>
<b>10.</b>	<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>123</b>
<b>11.</b>	<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>131</b>
<b>12.</b>	<b>APÊNDICE C.....</b>	<b>133</b>
<b>13.</b>	<b>ANEXO.....</b>	<b>137</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Estudos não clínicos com animais de experimentação

#### 1.1.1. Histórico e legislações

Os estudos não clínicos envolvendo animais de experimentação são realizados desde a época de Hipócrates, o pai da medicina ocidental, há cerca de 450 a.C. Nesta época, Hipócrates já estudava a correlação entre doenças desenvolvidas em seres humanos com as que acometiam os animais. Além das pesquisas desenvolvidas por Hipócrates, outros pensadores, como os anatomistas Alcmeão de Crotona (500 a.C.), Diocles de Caristo (séc. V a.C.), Herophilus da Calcedônia (330-250 a.C.) e Erasistratus de Quios (305-240 a.C.) realizavam estudos em animais com o objetivo de identificar estruturas anatômicas e suas atividades fisiológicas. Alguns anos mais tarde, o médico e filósofo Cláudio Galeno (129-210 d.C.) praticava suas pesquisas provocando intencionalmente alterações nos sistemas biológicos dos animais, para posteriormente testar alternativas de reparo ao dano biológico induzido. Além disso, muito do que se sabe atualmente sobre o sistema cardiovascular, foi obtido das inúmeras pesquisas realizadas em diversas espécies animais, e publicadas em 1638 no livro "*Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus*", pelo cientista William Harvey (GREIF; TRÉZ, 2000).

O filósofo René Descartes acreditava que os animais eram seres sem alma, que não sentiam nenhum tipo de dor ou desconforto. No entanto, com a teoria da evolução das espécies proposta por Charles Darwin, a comunidade científica da época e diversas religiões ficaram perplexos quando Darwin demonstrou que o homem é um animal. Logo, as preocupações quanto aos princípios morais com o homem, deveriam ser estendidas também aos animais. Desta forma, as preocupações éticas com a utilização de animais em experimentação científica despertaram abruptamente (ANDERSEN et al., 2004). Mais do que isso, naquela época o sentimentalismo por parte de muitos indivíduos pelos animais, aflorou de tal forma que pintores como Edwin Landseer, pintaram diversas obras com animais veleando os corpos de seus donos. Com isso, iniciaram as mudanças em relação aos conceitos sobre os animais em geral, especialmente os utilizados em ensaios experimentais sem o mínimo de princípios éticos necessários. Desta forma, surgiram na Inglaterra os movimentos contra as atitudes antiéticas dos pesquisadores da época, assim como a legislação que regulamentava o uso de animais

em pesquisa, a qual ficou conhecida como *British Cruelty to Animals Act*, no ano de 1876. Esta lei regulamentava que os pesquisadores da época deveriam realizar os experimentos com os animais de uma forma mais humanitária, sem expor os mesmos a agressões, dor ou desconforto. Porém, caso houvesse a necessidade dos animais passarem por experimentos dolorosos, os pesquisadores deveriam fazer previamente a realização dos experimentos, uma petição por escrito ao secretário do estado do *Homo Office*, a casa civil do governo inglês, explicando detalhadamente a relevância científica dos estudos (ANDERSEN et al., 2004; SCHNAIDER, T. B; SOUZA, 2003)

Em 1986, após mais de dez anos de discussão com a sociedade, a Inglaterra implantou uma nova lei, *Animal (Scientific Procedures) Act*, muito mais exigente e rigorosa. Tal lei estabelecia duras punições aos pesquisadores que realizassem condutas antiéticas em experimentação envolvendo animais, como multas e até prisões. Além disso, eram realizadas frequentemente fiscalizações por médicos veterinários treinados aos laboratórios de pesquisa. Estes fiscais analisavam as condições ambientais dos biotérios e a experiência dos pesquisadores e demais profissionais quanto a manipulação dos animais utilizados nas pesquisas, assim como exigiam dos pesquisadores a manutenção de um sistema de registro de dados estatísticos sobre o tamanho da amostra utilizada e o número de ensaios realizados (ANDERSEN et al., 2004; SCHNAIDER, T. B; SOUZA, 2003).

O exemplo da Inglaterra foi seguido por diversos outros países que aderiram as leis de proteção aos animais utilizados em pesquisa científica. Entre eles, a Polônia em 1928, a qual foi o segundo país a implantar tais leis. Em sequência, a Suécia em 1944; a França em 1968; a Holanda em 1977 e a Noruega em 1984 (ANDERSEN et al., 2004).

Além dos países da Europa, os Estados Unidos da América (EUA) criaram em 1963 um guia para o uso de animais em pesquisas científicas, com o título de *Guide for Laboratory Animal Facilities and Care*, implementados pelo NIH (do Inglês, *National Institute of Health*), e revisado vários anos mais tarde. E em 1996 foi realizado uma nova edição, com o título de *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Este guia foi descrito para permitir “uma melhor compressão por parte dos pesquisadores sobre os animais utilizados nos estudos, assim como a importância da qualidade do ambiente onde são alojados”. Além dos EUA, o Canadá também desenvolveu um programa de controle voluntário em experimentação científica com animais, de extrema eficácia, o qual tinha como foco principal a condução de estudos em animais de forma mais qualitativa, humanitária e

transparente. Desta forma, houve a criação do CCAC (do inglês, *Canadian Council on Animal Care*) (ANDERSEN et al., 2004).

Em 2008, foi promulgada a lei 11.794 no Brasil, mais conhecida como Lei Arouca, que regulamenta a utilização de animais em pesquisa e ensino, garantindo a segurança e o controle nos experimentos. Segundo esta lei, é proibido a realização de pesquisa com submissão de animais a agressões físicas, estresse imprevisível, a privações de alimentos ou a qualquer tipo de sofrimento. Além disso, os mesmos devem ser adequadamente anestesiados antes de qualquer procedimento cirúrgico (CONCEA, 2015).

Além da necessidade de seguir as legislações referentes ao uso de animais, o planejamento e a condução de pesquisas não clínicas *in vivo* é um grande desafio para quem a realiza. Os responsáveis pelo desenvolvimento dos estudos necessitam, além do conhecimento técnico-científico, um alto rigor ético, sem o qual os danos poderão ser irreparáveis. Cabe ao pesquisador responsável pela condução dos estudos compreender sobre a biologia da espécie animal utilizada nos ensaios, sobre os modelos experimentais que mimetizaram as doenças que serão estudadas, ter a consciência da importância de seus trabalhos e suas conclusões, pois as mesmas poderão ser lidas por outros pesquisadores, e assim beneficiar ou prejudicar inúmeras pessoas. Desta forma, fica evidente a importância de seguir corretamente as normas relacionadas ao planejamento e a condução dos trabalhos (PRESCOTT; LIDSTER, 2017).

A incompatibilidade ética referente a utilização de animais em pesquisa surge do conflito entre a justificativa para o uso de animais em benefício a sociedade e o ato de não causar dor ou sofrimento aos mesmos. São considerados estudos éticos aqueles que beneficiam de alguma forma tanto a saúde humana quanto a animal, ou que contribuam significativamente para a melhor compreensão sobre a fisiologia e o comportamento dos seres vivo (SOUTHWARK, B. P. et al., 2005).

Neste sentido, nos últimos anos se tornou frequente o debate sobre a utilização de animais em pesquisa científica e sua importância para evolução da humanidade. Entretanto, não deve ser esquecido que a utilização de animais em pesquisa científica é um privilégio, o qual deve ser mantido, de forma a beneficiar aos homens e aos próprios animais, através do melhor entendimento de doenças que acometem a sociedade e aos próprios animais, e partir desses conhecimentos desenvolver vacinas e medicamentos. Desta forma, fechar os olhos para o sofrimento de homens e animais perante diversas doenças, seria uma atitude antiética. Mesmo porque, os inúmeros avanços médico-científicos do século

XVIII somente foram possíveis através de pesquisas realizadas com animais de experimentação (SOUTHWARK, B. P. et al., 2005).

Neste contexto, os ensaios não clínicos em animais, são em muitos casos, além de uma necessidade, uma obrigatoriedade. Segundo o Código de Nuremberg, implantado após a Segunda Guerra Mundial, por consequência de incontáveis atrocidades cometidas por nazistas, foi determinado que todo e qualquer experimento realizado em humanos “deve ser planejado e baseado em resultados obtidos com experimentação animal” (SCHRAMM, 2004). Foi confirmado naquela época que as pesquisas eram realizadas diretamente em prisioneiros de guerra, normalmente mantidos em compôs de concentração. Após a aprovação do Código de Nuremberg, foi implantado em 1964 a Declaração de Helsinki, adotada pela Assembleia Médica Mundial, revisado dez anos mais tarde, a qual também deixava claro que as pesquisas em seres humanos somente poderiam ser realizadas após o embasamento científico desenvolvido em experimentos prévios com animais (DE CASTILHO; KALIL, 2005).

No decorrer da história, ocorreram muitos conflitos entre os que defendem o veto ao uso de animais em pesquisa científica e aqueles que acreditam que sua utilização é crucial para o avanço da ciência e da própria humanidade. A comunidade protetora dos animais, embora muitas vezes radicais em suas reivindicações, defende a implantação de entidades a favor do uso adequado e humanitário de animais em pesquisa. Além disso, colabora na criação de legislações e normas específicas, bem como nas comissões de ética para correta utilização de animais em experimentação científica (JOSÉ et al., 2011). Com isso, a partir destas normas e legislações específicas, os princípios ético-científicos no desenvolvimento de ensaios não clínicos se tornaram cada vez mais exigentes, priorizando a realização de pesquisas de forma humanitária, robusta e transparente (CASTRO, 2013; CONCEA, 2015).

### **1.1.2. Importância dos estudos não clínicos com animais de experimentação**

A realização de pesquisa não clínica com animais de experimentação não é apenas desenvolvida em laboratórios de universidades. As indústrias farmacêuticas também realizam pesquisa científica, com o intuito de investigar substâncias candidatas a medicamentos, parâmetros como: o perfil farmacocinético, avaliações de eficácia, a farmacológica de segurança, a toxicologia, dentre outros, cruciais para o desenvolvimento de novos medicamentos ou vacinas

(ANDRADE et al., 2016). Neste sentido, por mais que ainda exista muitos grupos protetores contrários a utilização animais, tais estudos são ainda de grande importância para a sociedade, pois os mesmos permitem a avaliação da eficácia e segurança das novas substâncias candidatas a medicamentos, antes de serem oferecidas a seres humanos (OECD, 2014).

Diante das intensas discussões e pressões por parte dos grupos a favor do veto a utilização de animais em pesquisa, houve a necessidade de criar métodos alternativos ao uso de animais na experimentação científica. Neste contexto, os estudos *in vitro* começaram a ganhar espaço, através de modelos computadorizados, cultura de células, entre outros (CASTRO, 2013). Tais modelos são importantes para o embasamento científico de determinadas experiências e para a redução do uso de animais em pesquisa; no entanto, são métodos insuficientes para avaliar sistemas complexos que requerem a utilização de organismo vivo para posteriormente estudar em doenças humanas. Assim, apesar do progresso obtido com a introdução de inúmeros métodos alternativos ao uso de animais em experimentação científica, até o momento eles não permitem substituir inteiramente as interações complexas que ocorrem entre células, tecidos e órgãos de seres humanos e animais em condições fisiológicas e patológicas. De fato, é fundamental que os cientistas compreendam adequadamente estas interações em animais antes de realizar estudos em seres humanos (MARQUES et al., 2005; MORALES, 2008).

Por mais que os experimentos realizados em modelos animais tenham inúmeras limitações, ainda são as melhores opções para analisar as condições que ocorrem em seres humanos hígidos e doentes. Ainda que os modelos animais não sejam idênticos às condições humanas, os mesmos podem e devem ser utilizados para estudar procedimentos específicos. Como por exemplo, a fibrose cística em camundongos pode não ser análoga à que acomete os humanos; no entanto, este modelo fornece meios para desenvolver novas terapias satisfatórias, com o objetivo de melhorar a condição de pacientes diagnosticados com aquela doença (JOSÉ et al., 2011).

Neste sentido, a utilização de animais em pesquisa biomédica é justificável por meio de inúmeros relatos e fatos, em que os ensaios *in vivo* contribuíram e ainda continuam contribuindo para a melhor compreensão do organismo humano e animal, assim como para o entendimento de diversas síndromes e doenças. Como por exemplo, a descoberta da vacina para difteria maligna e poliomielite, os avanços em transplantes de órgãos, assim como o desenvolvimento de diversas

classes de medicamentos, os quais melhoraram a qualidade de vida de pacientes acometidos por doenças como a hipertensão, diabetes e o câncer. Além disso, a honraria concedida aos trabalhos dos 82 cientistas laureados com o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina entre 1901 a 1982, foram em sua grande parte, destinados a estudos que envolviam animais de experimentação (JOSÉ et al., 2011). Fatos como estes, mostram o quão importante é a utilização de animais em pesquisa, além de comprovar que uma pesquisa bem fundamentada, planejada e conduzida eticamente, traz muitos benefícios a ciência e, consequentemente, a sociedade como um todo (MIZIARA et al., 2012).

Alguns episódios lamentáveis com o desenvolvimento de novos medicamentos ocorridos no século XX em muitos países, poderiam ter sido evitados caso esses medicamentos tivessem sido previamente ou adequadamente testados em animais de experimentação. O caso da talidomida, sedativo largamente consumido por gestantes na década de 60, é um exemplo claro, a qual provocou efeitos teratogênicos em fetos, desenvolvendo má-formação em milhares de crianças (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017). Além da talidomida, os estudos “Tuskegee”, como ficou conhecido, foi um ensaio clínico que provocou a morte de centenas de trabalhadores, a fim de avaliar a evolução clínica da Sífilis, sem qualquer tipo de tratamento ou informações aos participantes da pesquisa (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017). Outro episódio marcante, descrito na história da pesquisa clínica, foram estudos realizados na África com gestantes infectada com HIV (Vírus de Imunodeficiência Humana), sem nenhum tipo de informação ou condutas éticas por parte dos responsáveis (MASSUD FILHO, 2016).

Os avanços científicos ocorridos na área da saúde são atribuídos, em sua maior parte aos avanços das pesquisas com modelos animais. Os resultados destes experimentos têm importância fundamental na identificação e no desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas, que permitiram tratar inúmeras doenças, dispositivos médicos, procedimentos cirúrgicos e transplantes de órgãos que não seriam possíveis sem o emprego de pesquisas com uso de animais (MIZIARA et al., 2012).

No entanto, para que os avanços científicos continuem sendo alcançados através de estudos não clínicos com animais de experimentação, são necessários por parte dos experimentadores, uma vasta experiência técnico-científica e condutas éticas com relação a utilização de animais em pesquisas. Além disso, é fundamental que os trabalhos sejam cuidadosamente planejados e conduzidos, assim como

há a necessidade de serem robustos, rastreáveis, transparentes e reprodutíveis por outros pesquisadores independentes (EVERITT, 2015).

## **1.2. Reprodutibilidade científica**

### **1.2.1. Limitações**

A reprodutibilidade de um estudo científico tem maior probabilidade de ocorrer quando as informações contidas em um trabalho são suficientemente adequadas e claras, para que pesquisadores independentes consigam conduzir os ensaios de forma semelhante ao estudo original, e apresentem resultados semelhantes (IOANNIDIS, 2016). Embora um estudo reproduzido deva ser semelhante ao estudo original, não necessariamente o mesmo deverá ser idêntico em relação aos métodos utilizados no estudo original. De fato, a reprodutibilidade não significa uma cópia perfeita do trabalho, pois uma réplica pode não ser viável e nem desejável. O objetivo principal da reprodutibilidade de estudos científicos, é que pesquisadores independentes consigam obter os resultados originais a partir de análises e métodos similares, chegando a conclusões semelhantes (JARVIS; WILLIAMS, 2016).

No entanto, muitos dos trabalhos envolvendo animais de experimentação realizados nos últimos anos em instituições de pesquisa, tanto privadas quanto públicas, vêm demonstrando baixa taxa de reprodutibilidade (ROSENBLATT et al., 2016). Um dos motivos para explicar esse fato é a falta de compreensão por parte dos pesquisadores a respeito das características fisiopatológicas das doenças, as quais são estudadas em modelos animais (CRESSEY, 2016). No entanto, na grande maioria das vezes, os modelos animais são pouco representativos em relação à realidade observada em seres humanos (KOL et al., 2015; PEREL et al., 2007), e tal fato se deve a alguns fatores como por exemplo, a falta de compressão por parte dos pesquisadores sobre as características biológicas dos animais, assim como pouco entendimento sobre a importância de informações a respeito da qualidade sanitária dos mesmos (BEGLEY; IOANNIDIS, 2015).

Em pesquisas não clínicas que utilizam animais tem sido observado que os resultados obtidos muitas vezes são oriundos da premissa do pesquisador, o qual tende a depositar sua expectativa sobre determinado desfecho (EISEN; GANLEY; MACCALLUM, 2014). De fato, inúmeros trabalhos científicos têm seus resultados supra ou superestimados, o que muitas vezes pode levar a resultados falsos que

resultam na retratação do estudo e/ou indiciamento por fraude dos responsáveis. Sendo assim, trabalhos que não são reprodutíveis e tampouco confiáveis seguem na contramão do avanço científico (BEGLEY; IOANNIDIS, 2015).

Nesse sentido, vem sendo observado nos últimos anos, uma grande preocupação com relação a publicação de estudos não clínicos da área biomédica em revistas científicas de alto conceito internacional, cujos estudos não são reprodutíveis, nem por seus próprios autores, tampouco por laboratórios independentes (BEGLEY; IOANNIDIS, 2015). Interessantemente, um grupo de pesquisadores das indústrias farmacêuticas publicaram resultados importantes relatando a dificuldade em reproduzir trabalhos acadêmicos na área da pesquisa biomédica, especialmente aqueles que envolvem animais de experimentação. Estes cientistas demonstraram que apenas um quarto ou menos dos ensaios não clínicos publicados em revistas de alto impacto, puderam ser reprodutíveis (BEGLEY; ELLIS, 2012; PRINZ; SCHLANGE; ASADULLAH, 2011).

De forma geral, a principal diferença entre pesquisa não clínica desenvolvida em instituições acadêmicas e pesquisas realizadas em indústrias privadas (como por exemplo, as indústrias farmacêuticas), é que as pesquisas acadêmicas procuram explorar a biologia humana na busca por alvos terapêuticos moduláveis, enquanto que as empresas farmacêuticas desenvolvem suas pesquisas na procura por moléculas promissoras candidatas ao desenvolvimento de medicamentos, as quais possam modular os alvos terapêuticos descobertos inicialmente pelos estudos acadêmicos (ROSENBLATT et al., 2016). Desta forma, existe uma certa dependência das indústrias farmacêuticas pelos estudos científicos desenvolvidos na academia. Entretanto, a grande maioria dos ensaios não clínicos realizados em centros acadêmicos, apresentam em geral, baixo grau de robustez e de reprodutibilidade (FRYE et al., 2015).

Existem muitos fatores que contribuem para a crise de reprodutibilidade dos estudos não clínicos realizados com animais, que vão desde do desenho do projeto de pesquisa (falta de randomização de grupos experimentais, a não realização de experimentos de forma cega, problemas na análise estatística, etc.), até à má conduta científica (fabricação ou falsificação de dados) (IOANNIDIS, 2016). No entanto, a forma como as pesquisas acadêmicas e das industriais são incentivadas pode ser um dos pontos centrais para a crise de reprodutibilidade científica (EDWARDS; ROY, 2016). Os objetivos centrais dos pesquisadores acadêmicos são normalmente, o financiamento para seus

projetos de pesquisa, assim como a publicação de seus trabalhos em revistas internacionais de elevado prestígio, pois sem essas publicações as pesquisas acadêmicas perecem. Já as indústrias só sobrevivem se suas descobertas apresentarem relevância clínica, pois os custos financeiros de uma pesquisa clínica, com uma molécula promissora candidata a medicamento, são “astronômicos” (FRYE et al., 2015).

Dessa forma, a falta de reprodutibilidade de trabalhos não clínicos envolvendo animais de experimentação compromete substancialmente uma sequência de eventos importantes com relação ao desenvolvimento de medicamentos inovadores, além de desperdiçar bilhões de dólares com animais, recursos humanos, tempo, e, principalmente, a chance de contribuir para o bem estar de pacientes enfermos (EVERITT, 2015; FREEDMAN; COCKBURN; SIMCOE, 2015).

### **1.3. Irreprodutibilidade de estudos não clínicos com animais de experimentação**

Os estudos não clínicos *in vivo* requerem atenção especial por parte do pesquisador, pois os animais utilizados em laboratório apresentam algumas variações de difícil controle. Desta forma, o registro de informações completas do estudo deve ser bem descritas no método do trabalho, deixando o estudo mais reprodutível (GLASZIOU et al., 2014). A falta de informações necessárias em um trabalho científico além de dificultar a sua reprodutibilidade, apresenta potenciais implicações tanto científicas quanto éticas (FREEDMAN, 2015; KILKENNY et al., 2010). A irreprodutibilidade de pesquisas não clínicas é cada vez mais presente na área biomédica, especialmente em ensaios envolvendo modelos experimentais *in vivo*. Esta é uma realidade que envolve diversos fatores, como por exemplo: qualidade sanitária dos animais, utilização de linhagens distintas, alojamento de animais com diferentes controles ambientais (por ex. temperatura, luminosidade e umidade), incompatibilidade de protocolos experimentais, ausência de randomização, falta de controles positivos e negativos adequados, problemas na análise e interpretação dos resultados, conclusões de resultados precipitadas para obter significância estatística, além de viés de publicação, entre outros (BEGLEY, 2013; COLLINS; TABAK, 2014).

A qualidade dos trabalhos pode ser afetada diretamente por fatores como: a falta de randomização dos grupos experimentais, a não realização de experimentos de forma cega, a falta de informações em

trabalhos publicados com relação às características dos animais utilizados no estudo (peso, idade, sexo, espécie, linhagem, etc.), esclarecimentos pobres sobre a qualidade sanitária dos animais, a aplicação inadequada de critérios de inclusão e exclusão de dados, a escolha inapropriada de testes estatísticos, modelos experimentais inadequados, falta de registros dos procedimentos, a não validação de reagentes biológicos, exposição seletiva de resultados positivos, análise estatística inapropriada, falsificação e até mesmo a invenção de dados (ALQURAIISHI; SORGER, 2016; PUSZTAI; HATZIS; ANDRE, 2013). Neste contexto, para muitos cientistas da área biomédica, os incentivos e financiamentos destinados às suas pesquisas precisam ser revertidos em resultados positivos, como se não houvesse a possibilidade de encontrar resultados negativos (PUSZTAI; HATZIS; ANDRE, 2013). Os resultados considerados negativos são pouco explorados e divulgados pelos autores dos trabalhos não clínicos (SEINSTRAS, 2017). Além disso, as revistas científicas não estimulam estes autores a divulgarem os dados considerados negativos. No entanto, os resultados negativos são de grande relevância para o avanço científico (HAYES, 2015), pois a divulgação dos mesmos pode evitar que outros pesquisadores realizem estudos desnecessários, envolvendo desperdício de animais de experimentação, reagentes, recursos financeiros, recursos humanos e tempo dedicado em pesquisa (BAKER, 2016). Esta realidade compromete o verdadeiro valor do estudo e a integridade científica do pesquisador (PUSZTAI; HATZIS; ANDRE, 2013).

Lamentavelmente, estas são algumas da realidade de uma literatura inconfiável que está em pleno desenvolvimento, levando à modesta reprodutibilidade dos trabalhos científicos com animais de experimentação. Além disso, a falta de reprodutibilidade de estudos não clínicos compromete a confiança de financiadores e instituições de pesquisa, mancha a reputação da pesquisa científica, compromete a oportunidade de contribuição para o tratamento de muitas doenças, além de gerar desperdício de recursos financeiros, uso não ético de animais em pesquisa, gastos com recursos humanos e tempo desperdiçado em estudos que não são reprodutíveis (IOANNIDIS, 2005; WARE, 2016).

Outro aspecto relevante neste cenário do desenvolvimento de pesquisa não clínica, é que muitas revistas científicas da área biomédica não fornecem aos pesquisadores orientações necessárias que devam ser incluídas em estudos envolvendo animais de experimentação. Além disso, e mais grave, restringem o espaço da sessão de métodos da revista, limitando desta forma a descrição de informações importantes.

As revistas científicas assim como os patrocinadores da pesquisa, devem estimular os pesquisadores a fornecerem o máximo de informações possíveis, claras e precisas, para que os trabalhos publicados possam ser confiáveis, rastreáveis e reprodutíveis (COLLINS; TABAK, 2014; KILKENNY et al., 2009).

O *NC3Rs* (do Inglês, *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research*) é uma organização científica patrocinada pelo governo do Reino Unido, criada há mais de cinquenta anos, incorporada à legislação nacional e internacional com o objetivo de regulamentar o uso de animais em pesquisa científica. O *NC3Rs* realizou uma pesquisa recentemente, a qual constatou que apenas 59% dos 271 artigos escolhidos aleatoriamente para avaliação, relatavam a hipótese ou o objetivo do estudo, assim como descrevia informações essenciais sobre as características dos animais utilizados, como a qualidade sanitária dos mesmos, espécie, linhagem, peso, sexo e idade. Este levantamento realizado pelo *NC3Rs* ainda informou que a grande maioria dos trabalhos selecionados não especificava, no delineamento experimental, quais foram os critérios utilizados para o cálculo do tamanho da amostra e quais foram os métodos estatísticos utilizados. Outro fator importante que não foi utilizado ou mencionado no desenvolvimento destes estudos, foi a falta de randomização dos grupos experimentais, não registrado em 87% dos trabalhos, assim como não houve realização dos experimentos de forma cega em 86% dos estudos (KILKENNY et al., 2010).

#### **1.4. Os custos financeiros de pesquisas não clínicas irreprodutíveis nos Estados Unidos da América**

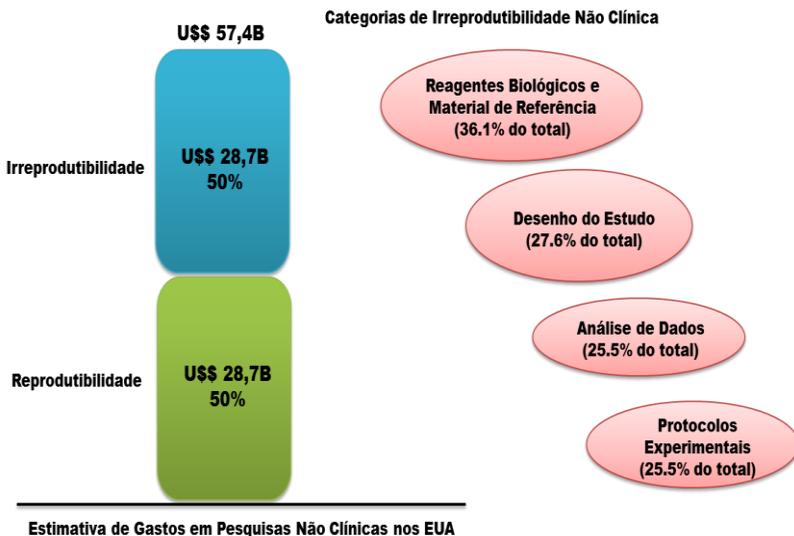
Os trabalhos científicos promissores gerados em instituições de ensino, tanto públicas quanto privadas, frequentemente atraem o interesse de investidores, dentre eles, as indústrias farmacêuticas. O objetivo inicial da indústria é reproduzir os estudos, com base nas informações divulgadas pelos autores de pesquisa básica. Caso o estudo seja rastreável, ou seja, contenha todas as informações necessárias para que seja reproduzido, e se de fato for reproduzido, tal trabalho pode vir a ser candidato a passar por estudos não clínicos regulados, e dependendo dos resultados, ser candidato a testes clínicos em humanos (HUGHES et al., 2011).

Neste contexto, o objetivo geral das indústrias farmacêuticas é reconhecer as moléculas inovadoras, que podem ser candidatas ao desenvolvimento de medicamentos. Estes ensaios compreendem a

análise do perfil farmacocinético da substância, assim como sua eficácia, farmacologia de segurança, toxicologia, genotoxicidade, carcinogenicidade e toxicologia reprodutiva. Uma vez que a substância seja segura e eficaz, poderá vir a ser utilizada em estudos clínicos (EVERITT, 2015).

Estima-se que um trabalho não clínico promissor, desenvolvido inicialmente em instituições acadêmicas, necessite de 3 a 24 meses para ser reproduzido pela indústria, gerando um custo de 500 mil a 2 milhões de dólares (FREEDMAN; COCKBURN; SIMCOE, 2015). A partir de um levantamento realizado nos Estados Unidos da América (EUA), foi concluído que são investidos cerca de 114,8 bilhões de dólares em projetos de pesquisas por ano nas áreas biomédicas pelos norte-americanos (CHAKMA et al., 2014). Sendo que, os principais financiadores deste montante são as indústrias farmacêuticas, que representam 61,8% dos investimentos, seguidas por instituições governamentais, com 31,5%, algumas organizações sem fins lucrativos, com 3,8% e instituições acadêmicas, com 3,0% (LUBELL, 2013). De modo que, aproximadamente metade (57,4 bilhões) do investimento total de 114,8 bilhões, são destinados a pesquisas não clínicas *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, sendo que o governo federal dos EUA, mais especificamente o *NIH* (do Inglês *National Institutes of Health*), contribui com grande parte deste investimento, o qual gira em torno de 30 bilhões de dólares por ano (FREEDMAN; COCKBURN; SIMCOE, 2015). No entanto, é estimado que as pesquisas não clínicas realizadas no Estados Unidos atingem uma taxa de irreprodutibilidade superior a 50%. Assim, a metade do investimento de 57,4 bilhões de dólares em estudos não clínicos, investidos anualmente nos EUA em pesquisas, não se reproduzem (CAMPBELL, 2014; STERN et al., 2014). A Figura 1 resume alguns dos motivos que contribuem para a irreprodutibilidade destes trabalhos não clínicos, como: a falta de validação de reagentes biológicos, delineamentos experimentais com informações escassas, análise estatística inapropriada e protocolos experimentais falhos (FREEDMAN; COCKBURN; SIMCOE, 2015).

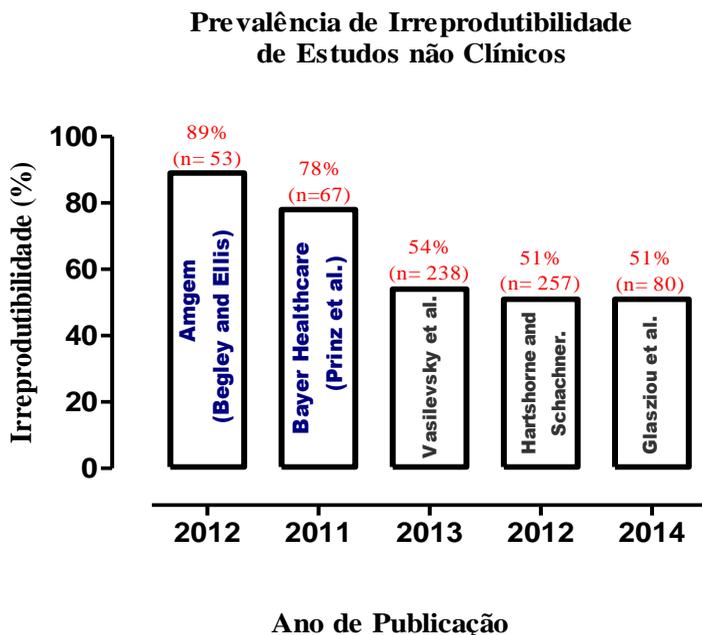
Figura 1. Estimativa de gastos em pesquisa não clínica anual nos EUA e fatores que contribuem para a irreprodutibilidade de estudos não clínicos.



Fonte: Adaptado de (FREEDMAN; COCKBURN; SIMCOE, 2015).

Conforme observado na Figura 2, em uma pesquisa realizada pela Bio-Farmacêutica Norte Americana Amgem, foi observado que dos 53 estudos não clínicos publicados e selecionados aleatoriamente para confirmação de resultados com modelos de câncer em animais de experimentação, apenas 6 (11%) foram reproduzidos (BEGLEY; ELLIS, 2012). Em outro levantamento realizado pela indústria farmacêutica Alemã, a Bayer, dos 67 estudos não clínicos (47 no campo da oncologia e os outros 20 divididos entre pesquisas com saúde da mulher e cardiovascular), publicados e selecionados por esta empresa para confirmação de rastreabilidade e reprodutibilidade dos resultados, apenas 25% destes trabalhos foi reproduzido (PRINZ; SCHLANGE; ASADULLAH, 2011). Além das indústrias farmacêuticas, alguns pesquisadores acadêmicos da área de Ciências Biológicas, ao analisar alguns estudos não clínicos selecionados aleatoriamente da literatura internacional, também concluíram que 50% dos trabalhos selecionados, eram irreprodutíveis (FREEDMAN; COCKBURN; SIMCOE, 2015) (FREEDMAN; COCKBURN; SIMCOE, 2015; VASILEVSKY et al., 2013).

Figura 2. Prevalência de Irreprodutibilidade de Estudos não Clínicos Publicados.



Fonte: Adaptado de (FREEDMAN; COCKBURN; SIMCOE, 2015).

## 1.5. Descrições/informações para o delineamento experimental de estudo não clínico envolvendo animais de experimentação

### 1.5.1. Informações sobre os animais utilizados no estudo

A qualidade dos animais passa por critérios que compreendem seu ambiente de manutenção ao longo da vida. Segundo as diretrizes *ARRIVE* (do inglês, *Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments*), é fundamental relatar o tipo de gaiola, o material de nidificação, o número de animais por gaiola, condições de manutenção, higienização periódica das gaiolas, ciclos de luz claro e escuro, temperatura, umidade, qualidade de água, acesso a água e comida, qualidade da maravalha, enriquecimento ambiental, dentre outros (KILKENNY et al., 2010). O controle destes parâmetros e a descrição dos mesmos em trabalhos científicos é de extrema importância para minimizar as possíveis variações biológicas e reduzir a alta incidência

de irreprodutibilidade de estudos não clínicos *in vivo* (REARDON, 2016).

Logo, informações quanto as características e qualidade sanitária dos animais utilizados no estudo, assim como informações sobre o cálculo do tamanho da amostra experimental, randomização, realização dos ensaios de forma cega, análise estatística, conduta com os resultados obtidos no estudo, qualidade dos reagentes utilizados nos ensaios e os grupos controles utilizados nos estudos, são indispensáveis em um trabalho científico robusto, rastreável e confiável. Neste sentido, segue abaixo alguns exemplos de descrições essenciais que devem conter em um delineamento experimental.

**Informações sobre os animais, as condições sanitárias, as caixas utilizadas para armazenamento dos animais e o biotério:**

- ✓ Descrição de todo o histórico do animal, como a origem da matriz, a espécie, linhagem, peso, sexo, idade, além das condições das instalações para manutenção e criação. Poderão também ser descritas características sobre a patogenicidade dos animais, se os mesmos são livres de patógenos específicos *SPF* (do inglês, *Specific Pathogen Free*). Além disso, informações sobre o habitat, a constituição dos materiais das caixas, o tamanho das caixas, se as mesmas são vedadas e armazenadas em estantes ventiladas, o tipo de maravalha utilizada para nidificação, a quantidade de animais colocados em cada caixa, a rotina de limpeza das gaiolas, a utilização de enriquecimento ambiental nas caixas para interatividade. Descrever sobre a procedência e as características da água e da ração que os animais consomem, se a água é filtrada, se a ração é esterilizada, se camundongos e ratos são alojados na mesma sala ou em salas distintas, se há o controle de temperatura, umidade e luminosidade das salas, quais os critérios de acasalamento, etc (SERVICK, 2016).
- ✓ **Cálculo do tamanho da amostra:** o tamanho da amostra ou seja, o número de animais em cada grupo deverá ser calculado para que os resultados gerados no experimento apresentem validade estatística (MOGIL; MACLEOD, 2017). Além disso, é necessário que o número de animais por grupo não seja maior do que o necessário, pois números amostrais excessivos vão em desconformidade aos princípios de substituição, refinamento e redução de animais em pesquisa. No planejamento do estudo,

quando não se conhece a variação experimental baseada na média e no desvio padrão, é necessário que seja realizado um experimento piloto para definir o tamanho da amostra (FESTING; ALTMAN, 2002).

- ✓ **Randomização e distribuição aleatória dos animais em grupos experimentais:** antes de iniciar um estudo com animais, onde haja necessidade de dividir estes animais em grupos experimentais para fins comparativos, é primordial que os grupos experimentais sejam divididos aleatoriamente, evitando possibilidades de variações conhecidas e desconhecidas que possam enviesar os resultados do estudo. Este procedimento deverá estabelecer previamente o número de animais que constituirá cada grupo. Além disso, os grupos experimentais deverão ser manipulados de maneira idêntica no decorrer de toda a pesquisa, as análises dos experimentos também deverão ser realizadas nos mesmos horários, os animais de grupos distintos de tratamento não poderão ser alojados de forma diferentes, ou seja, cada grupo experimental deverá ser alojado sob as mesmas condições ambientais. Existem alguns programas computacionais (software) próprios para realizar a randomização, porém alternativamente, a randomização dos animais pode ser realizada manualmente em uma folha de papel, com todas as especificações (peso, número de animais por grupo, grupos de tratamento) previamente descritas (FESTING; ALTMAN, 2002).
- ✓ **Experimentos cegos:** a realização de um experimento de forma cega ocorre quando um pesquisador, no momento da administração de determinadas substâncias nos animais, consegue distinguir o que está sendo inoculado em cada animal, apenas por numerações ou símbolos marcados nos frascos e seringas, porém, não pelas diferenças de características das substâncias que as identificam, como coloração, viscosidade e odor. Em sequência, um segundo pesquisador realiza a coleta dos dados sem conhecer o que cada grupo experimental recebeu, evitando assim possíveis vieses tanto no momento da administração das substâncias, quanto durante a análise dos resultados. Quando o experimento não é realizado de forma cega, as chances de o pesquisador obter resultados esperados são maiores quando comparados com experimentos que não foram realizados de forma cega (BEBARTA; LUYTEN; HEARD, 2003).

- ✓ **Análise estatística:** a hipótese do trabalho deverá ser formulada com base no delineamento experimental, mais precisamente no tamanho da amostra e no teste estatístico, o qual será utilizado para analisar os resultados obtidos no estudo. É importante salientar que a escolha do teste estatístico deverá ser determinada durante o delineamento experimental, de acordo com o objetivo do trabalho, e não após o término dos experimentos, no qual o experimentador escolhe o teste estatístico de acordo com o perfil dos resultados (SMALDINO; MCELREATH, 2016). Outro ponto importante é que a significância estatística não significa necessariamente relevância biológica. De uma forma geral, a escolha do teste estatístico precisa levar em conta as possíveis variabilidades biológicas dos animais, assim como os erros de medição (LANDIS et al., 2013).
- ✓ **Conduta com os resultados do estudo:** para que um resultado seja acrescentado ou retirado de um estudo, é necessário que haja uma justificativa prévia no delineamento experimental, esclarecendo os motivos pelos quais tais possíveis alterações de dados possam vir a ser realizadas. Os pesquisadores responsáveis pelo trabalho também precisam informar se o estudo foi reproduzido, e quais foram os resultados obtidos (LANDIS et al., 2013; MOGIL; MACLEOD, 2017).
- ✓ **Qualidade dos reagentes utilizados no estudo:** entre os inúmeros fatores que podem prejudicar a reprodutibilidade de ensaios não clínicos, a baixa qualidade dos reagentes, certamente está entre eles. Portanto, é preciso que as informações sobre os reagentes, como a validade, o fabricante, o lote etc, sejam descritas no material e métodos do trabalho. Alguns reagentes como os anticorpos, ou mesmo linhagens celulares, nem sempre apresentam as especificações descritas pelos fabricantes, o que pode levar os pesquisadores a concluir erroneamente os resultados do estudo. Antes da utilização dos reagentes nos experimentos, os mesmos devem ser previamente validados. A validação de um reagente, é a forma pela qual o pesquisador pode comprovar através de alguns testes, a verdadeira atividade de uma determinada substância (BAKER, 2015; MULLANE; WILLIAMS, 2015).
- ✓ **Grupos controles:** para a realização e avaliação de um ensaio não clínico, sempre que possível, deve conter no estudo um grupo controle positivo, ou seja, substâncias referência, a (s) qual

(ais) já é conhecido sua ação. Além do controle positivo, o (s) controle (s) negativo (s) (por exemplo, veículo utilizado para diluição das substâncias) também deve fazer parte do experimento para fins comparativos (EICKEN, 2013).

### **1.6. Possíveis soluções para reduzir a incidência de irreprodutibilidade em pesquisa não clínica**

Além da criação das diretrizes internacionais para orientar os pesquisadores no desenvolvimento de estudos não clínicos mais robustos e confiáveis, algumas agências de financiamento, como o *NIH*, também vêm buscando algumas soluções para reduzir a incidência de irreprodutibilidade de pesquisas não clínicas. O *NIH*, em parceria com o *NPG* (do Inglês, *Nature Publishing Group*), propuseram a criação de uma lista de verificação (*Checklist*), destinada a revisores de revistas científicas, contendo questões importantes que devem estar contempladas em um trabalho científico (EDITOR, 2013), como por exemplo: se no delineamento experimental estão contempladas todas as informações necessárias para que o trabalho possa ser reproduzido, qual foi o método estatístico escolhido para a análise dos resultados, se os animais dos grupos experimentais foram separados aleatoriamente, se os experimentos foram realizados de forma cega, entre outros. Este *checklist*, poderá contribuir para facilitar a compreensão da qualidade científica do trabalho, assim como analisar a origem do embasamento teórico do estudo, e decidir se os resultados de tal trabalho apresentam consistência científica para servir de base em futuros ensaios clínicos com seres humanos (COLLINS; TABAK, 2014).

Mais de trezentas revistas científicas (por exemplo, *PLOS*, *British Journal of Pharmacology*, *Nature*, *Science*, *PNAS*) adotaram recentemente diretrizes como o *ARRIVE* e *GSPC* (do Inglês, *Gold Standard Publication Checklist*), com a finalidade de incentivar os pesquisadores a melhorar a qualidade dos artigos submetidos para publicação. Desta forma, os autores que almejam submeter seus trabalhos a estas revistas terão que repensar a forma de projetar e conduzir os ensaios, priorizando a robustez, a transparência e a confiabilidade dos resultados (MCGRATH; CURTIS, 2015).

Por mais que existam algumas diretrizes para evitar a pesquisa de baixa qualidade científica no meio acadêmico, ainda são poucas as instituições públicas que promovem intensa fiscalização para evitar pesquisa científica de má qualidade e de baixa objetividade

(CHALMERS et al., 2014). Diante disso, tem sido proposto que as instituições de pesquisa que recebem financiamento público, promovam atividades frequentes de fiscalização de condutas científicas em laboratórios de pesquisa, na tentativa de combater a má qualidade científica, estimulando o ceticismo e a confiabilidade dos trabalhos produzidos pelos pesquisadores (professores, pós-graduandos e graduandos) (BEGLEY; BUCHAN; DIRNAGL, 2015; MCNUTT; NEREM, 2017). Para um estudante de pós-graduação que está iniciando sua carreira científica e irá trabalhar com animais de experimentação, é fundamental que seja fornecido no mínimo um treinamento básico por um profissional qualificado (VASCONCELOS, 2015). É fundamental que este pesquisador iniciante aprenda a observar o comportamento dos animais, que compreenda as atividades fisiológicas e as estruturas anatômicas, que identifique os sinais de sofrimento, que se preocupe com a qualidade sanitária dos animais, que entenda o processo de evolução da doença que está sendo pesquisada (quando for o caso) e reflita sobre o quão preditivo é o modelo experimental que está sendo estudado (ALBERTS et al., 2015). A transmissão destes conhecimentos a respeito dos animais utilizados em pesquisa científica é de responsabilidade da instituição, do grupo de pesquisa e da CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais). Portanto, é necessário garantir, através de treinamentos e fiscalizações, que os pesquisadores envolvidos em experimentação animal, sejam devidamente capacitados (CONCEA, 2015).

Além de identificar e compreender o comportamento dos animais, é preciso que os órgãos normativos, as instituições, os grupos de pesquisa, as agências de financiamento e as revistas científicas estimulem que os experimentos sejam realizados dentro das Boas Práticas de Laboratório (*BPL*) (BEGLEY; BUCHAN; DIRNAGL, 2015). A implementação da *BPL* em laboratórios de pesquisa é definitivamente um dos grandes desafios para o desenvolvimento de uma pesquisa científica mais concisa, precisa, organizada e de qualidade. A *BPL* organiza um estudo desde sua concepção e delineamento experimental até suas etapas finais (elaboração de relatório e arquivamento). Por mais que não seja exigido, as orientações preconizadas no programa *BPL* incentivam a realização de ciência de qualidade, pois preconizam que o desenho do estudo contenha todas as informações necessárias que justifiquem as razões pelas quais o estudo possa ser realizado. Os princípios da *BPL* esclarecem que os trabalhos científicos podem ser desenvolvidos com diferentes métodos, desde que sejam realizados através dos procedimentos operacionais padrão e que

tenham plenas condições de serem reproduzidos por demais pesquisadores (ANDRADE et al., 2016).

Os graduandos, pós-graduandos e professores de instituições acadêmicas devem organizar reuniões frequentes para discutir abertamente sobre os inúmeros problemas que estão comprometendo cada vez mais a confiabilidade e a translação de pesquisas não clínicas, principalmente as que envolvem animais de experimentação (CHAN et al., 2014). Estas reuniões podem esclarecer dúvidas, permitem a reflexão sobre as condutas que são tomadas nos experimentos, discutir com os colegas sobre o porquê de realizar pesquisa em qualidade e não em quantidade (SALMAN et al., 2014), debater sobre o quão preditivo são os modelos experimentais utilizados nos estudos, fazer autocrítica sobre a objetividade dos trabalhos, discutir sobre os valores despendidos em um projeto científico, qual é o custo de um rato ou de um camundongo, levantar questionamentos a respeito da relevância dos resultados dos trabalhos para a sociedade, e assim por diante (BEGLEY; BUCHAN; DIRNAGL, 2015).

### **1.7. Diretrizes internacionais para estudos não clínicos com animais de experimentação.**

Diretrizes internacionais como o *OECD* (do Inglês, *Organization for Economic Cooperation and Development*), *NC3Rs*, *CONSORT* (do Inglês, *Consolidated Standards of Reporting Trials*), *ARRIVE*, *GSPC* e *GLP* (do inglês, *Good Laboratory Practices*) por exemplo, fornecem orientações valiosas para o desenvolvimento de estudos não clínicos e clínicos mais robustos, rastreáveis e confiáveis, beneficiando tanto os pesquisadores envolvidos no estudo quanto os revisores de revistas científicas. Com o intuito de deixar os estudos científicos mais éticos, claros e concisos, várias organizações e grupos de pesquisa publicaram diretrizes sobre o desenho experimental e a execução de experimentos *in vivo* que sustentem o desenvolvimento clínico (KILKENNY et al., 2010).

A *OECD* é uma organização constituída por representantes de 35 países, tendo como objetivo analisar, discutir e decidir questões econômicas, sociais e com possíveis danos ao meio ambiente perante o desenvolvimento de preparações químicas ou produtos químicos (OECD, 2014). A *OECD* criou guias para a realização de estudos não clínicos regulados, dentro dos princípios da *BPL*; estes guias são importantes, pois fornecem informações necessárias para o

desenvolvimento de medicamentos, sugerindo as doses a serem administradas aos animais, as espécies animais que deverão ser utilizadas no estudo, os parâmetros que deverão ser analisados, assim como os resultados que deverão ser apresentados, além de priorizar a segurança da pesquisa (ANDRADE et al., 2016).

As pesquisas publicadas por Russel e Burch's no ano de 1959 sobre os Princípios da Técnica Experimental Humana (do Inglês, *The Principles of Humane Experimental Technique*), contribuem até hoje para a realização humanizada e consciente de experimentos envolvendo animais de experimentação, objetivando sempre o avanço científico. Os termos introduzidos por Russel e Burch's ficaram conhecidos e definidos como: Substituição, Refinamento e Redução, os 3Rs (do Inglês, Replacement, Refinement & Reduction) de animais em pesquisa. Foram alternativas criadas para i) *substituir*: através da busca por outros meios equivalentes para realizar pesquisa sem a utilização de animais de experimentação, minimizando as chances de expor os mesmos a riscos ou sofrimentos desnecessários, ii) *refinar*: através da diminuição de possíveis sofrimentos de animais utilizados em pesquisa, através de atitudes simples, como a utilização de protocolos analgésicos antes e após um procedimento invasivo; iii) *reduzir*: através da diminuição de animais em pesquisa sempre que possível; porém deve-se assegurar que a redução no número de animais não comprometerá a confiabilidade dos resultados finais (TANNENBAUM; BENNETT, 2015).

O guia *CONSORT*, homologado na metade da década de 1990 para estudos clínicos controlados e randomizados, é constituído de 25 itens que orientam pesquisadores a relatar informações completas, precisas, transparentes e confiáveis em estudos clínicos. A partir de sua publicação, diversas revistas científicas têm implementado o *CONSORT* como modelo de instrução para pesquisadores e revisores. Consequentemente, ficou evidente o aumento da qualidade e da transparência das informações publicadas de ensaios clínicos. Após a declaração do *CONSORT*, inúmeras diretrizes foram desenvolvidas com a mesma finalidade, ou seja, deixar os ensaios clínicos mais confiáveis (SCHULZ; ALTMAN; MOHER, 2010).

Tomando o guia *CONSORT* como referência, outras diretrizes internacionais foram criadas para orientar o desenvolvimento de ensaios não clínicos envolvendo animais de experimentação e fortalecer o processo de translação. Vários grupos de pesquisa no mundo tiveram a iniciativa de formular estas diretrizes, com o intuito, também, de aumentar o rigor científico em pesquisas com animais (KILKENNY et al., 2010). Nesse sentido, “as diretrizes, conhecidas como *ARRIVE*,

foram desenvolvidas como parte de uma iniciativa do NC3Rs para melhorar o desenho, a análise e o manuscrito de investigação com animais – maximizando a informação publicada e reduzindo os estudos desnecessários” (KILKENNY et al., 2010). As diretrizes *ARRIVE* foram publicadas em junho de 2010 na revista científica *PLOS Biology*, contendo 20 orientações essenciais (como por exemplo, o relato do tamanho da amostra, a espécie, linhagem, peso, sexo e a idade dos animais utilizados no estudo) para o desenvolvimento de um estudo não clínico replicável, transparente, preciso, detalhado e conciso. Para a construção das diretrizes *ARRIVE* foi necessário o envolvimento de dezenas de profissionais, desde cientistas a patrocinadores de pesquisa. As diretrizes *ARRIVE* foram criadas para serem acessíveis a todos os que trabalham com pesquisa científica, sejam pesquisadores experientes ou jovens pesquisadores, editores de revistas, revisores de artigos científicos ou agências de financiamento (KILKENNY et al., 2010).

As diretrizes *ARRIVE* (em ANEXO) abrangem todas as etapas do processo de desenvolvimento não clínico envolvendo animais de experimentação, orientando autores e revisores a seguir critérios rigorosos de qualidade científica. A utilização destas diretrizes nos trabalhos científicos não é obrigatória; no entanto, diversas revistas aderiram a estas diretrizes como pré-requisito para aceite de artigos (KILKENNY et al., 2010). Além das diretrizes *ARRIVE*, foram publicadas (também no ano de 2010) as diretrizes *GSPC*. Com o objetivo de melhorias na concepção e execução de ensaios não clínicos com animais de experimentação, a *GSPC* contém 74 orientações detalhadas, destinadas a cientistas, editores e revisores de periódicos internacionais (HOOIJMANS; LEENAARS; RITSKES-HOITINGA, 2010).

## **2. HIPÓTESE**

A hipótese desse trabalho foi que as diretrizes preconizadas no *ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments)*, que constituem critérios mínimos de planejamento experimental, normalmente não são seguidas em trabalhos publicados no Brasil nas áreas biomédicas.



### 3. JUSTIFICATIVA

Todos os anos um número expressivo de artigos científicos nas áreas biomédicas que utilizam animais de experimentação, são publicados em revistas científicas nacionais e internacionais. Paralelamente, em todo o mundo, são crescentes as dificuldades para a reprodutibilidade de artigos científicos por entidades independentes, o que tem exposto a sociedade a um problema crônico que está assolando a ciência (ALLISON et al., 2016; EDITOR, 2013). A falta de reprodutibilidade dos estudos científicos, especialmente nas áreas biomédicas, está diretamente relacionada a vários fatores, podendo ser atribuídos à qualidade dos animais utilizados, ao planejamento experimental, à execução dos ensaios e à avaliação dos resultados, sendo estes temas abordados e descritos nas diretrizes do *ARRIVE*. Assim, este estudo pretendeu investigar se as pesquisas brasileiras que estão sendo desenvolvidas em algumas áreas biomédicas seguem as diretrizes descritas no *ARRIVE*, e se os trabalhos publicados por algumas universidades e instituições de pesquisa brasileiras analisadas utilizaram os critérios mínimos de planejamento e de execução dos experimentos de modo a garantir a sua reprodutibilidade por laboratórios independentes.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivos gerais

Avaliar através de questionários distribuídos aos alunos de pós-graduação em diversas áreas biomédicas de instituições brasileiras, como são feitos os planejamentos e a condução de estudos não clínicos, baseando-se nas diretrizes *ARRIVE*. Além disso, este trabalho pretende traçar uma comparação das informações acima com aquelas descrita nos artigos publicados em periódicos nacionais e internacionais nos últimos anos pelas instituições participantes do estudo.

#### 4.1.1. Objetivos específicos

✓ Desenvolver um questionário (APÊNDICE A) contendo perguntas relacionadas à maneira com a qual são planejados e conduzidos os ensaios realizados com animais de experimentação pelos pós-graduandos de algumas universidades e instituições de pesquisas científicas brasileiras;

✓ Avaliar através de questionário questões relacionadas a utilização das diretrizes preconizadas pelo *ARRIVE*, focando principalmente: i) na qualidade dos animais de experimentação, ii) as condições ambientais onde estes animais são alojados, iii) no delineamento experimental dos ensaios, iv) na aprovação do projeto de pesquisa pelo comitê de ética em pesquisa animal da universidade ou instituição, v) no cálculo do tamanho da amostra experimental, vi) no tratamento estatístico utilizado.

✓ Realizar um levantamento bibliográfico de trabalhos não clínicos *in vivo* publicados pelas mesmas universidades e instituições participantes desta pesquisa nos últimos 4 anos e selecionar aleatoriamente estes estudos, a fim de compará-los com as respostas obtidas nos questionários;

✓ Comparar os resultados obtidos através dos questionários com aqueles descritos nos trabalhos publicados pelas universidades e instituições, com os resultados obtidos na literatura internacional;

✓ Analisar a incidência e a importância de colaborações científicas realizadas entre universidades e instituições brasileiras com centros de pesquisas internacionais;

✓ Analisar a influência do fator de impacto das revistas científicas onde foram publicados os trabalhos selecionados das universidades e instituições, na transparência das informações contidas nos estudos.



## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CESPH)

Como este trabalho envolveu a participação de questionários enviados aos estudantes de pós-graduação, foi necessária a submissão deste estudo para avaliação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (CEPSH) via Plataforma Brasil. O trabalho foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), gerando o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE), número 58145716.9.0000.0121.

### 5.2. Elaboração do Questionário

O questionário foi elaborado após uma ampla consulta na literatura internacional, utilizando como base de dados o “*PubMed*”. Foram realizadas consultas sobre a crise de reprodutibilidade de trabalhos científicos não clínicos envolvendo animais de experimentação, bem como sobre alguns dos principais fatores que geram essa alta incidência de estudos não clínicos irreprodutíveis. Também foram realizadas consultas em diretrizes internacionais para o desenvolvimento de experimentos não clínicos *in vivo* (como *ARRIVE*, *BPL*, *OECD*, *NC3Rs*, *NIH*, entre outros), para melhor compreender as orientações e o desenvolvimento de um estudo científico robusto, rastreável, confiável e reprodutível. Além disso, foram investigadas na literatura as possíveis maneiras de reduzir a alta incidência de trabalhos científicos irreprodutíveis e de baixa validade científica.

As perguntas selecionadas para a construção do questionário foram formuladas principalmente com base nas diretrizes *ARRIVE*, cujas orientações abrangem importantes tópicos tais como: a qualidade sanitária dos animais utilizados em experimentação científica, delineamento experimental (o qual compreende processos como o cálculo do tamanho da amostra, realização de randomização dos animais, distribuição aleatória dos animais em grupos experimentais, realização dos experimentos de forma cega, escolha adequada do teste estatístico, interpretação dos resultados do estudo, qualidade dos reagentes utilizados nos experimentos, existência de grupos controles positivos e negativos, entre outros). As perguntas também foram formuladas para o entendimento dos pós-graduandos sobre o conhecimento e aplicação das diretrizes do *ARRIVE* e de outras diretrizes de boas práticas com experimentação animal.

Ao final da elaboração de todas as questões que constituíram o questionário, foi realizada uma série de perguntas organizadas em blocos, os quais foram divididos em temas, dispostos da seguinte forma: o primeiro bloco de perguntas estava relacionado aos conhecimentos dos pós-graduandos a respeito das diretrizes *ARRIVE*. Na sequência, foram organizadas perguntas relacionadas aos cuidados com os animais utilizados nos ensaios pelos estudantes. As questões relacionadas com o delineamento experimental e análise estatística foram estruturadas no terceiro bloco. E, por fim, as perguntas relacionadas com a ética em pesquisa não clínica com animais de experimentação.

O questionário foi constituído de 28 perguntas de múltipla escolha, claras e objetivas, com somente duas opções de resposta “sim” ou “não”. As perguntas estavam relacionadas com o entendimento do pós-graduando a respeito do desenvolvimento de estudos não clínicos envolvendo animais de experimentação. Além disso, havia uma pergunta aberta, relacionada com a hipótese do trabalho do pesquisador.

Após a elaboração das questões e da organização dos blocos de perguntas divididos em temas, o questionário foi estruturado em uma conta online no site “[www.SurveyMonkey.com](http://www.SurveyMonkey.com)”, o qual trabalha especificamente com o desenvolvimento e divulgação de questionários profissionais, sendo assim mais representativos.

### **5.2.1. Distribuição do questionário**

Antes da distribuição dos questionários aos pós-graduandos, foi realizado um estudo piloto. O questionário foi distribuído por e-mail para um grupo de 15 pós-graduandos, sendo que, 10 destes pesquisadores eram provenientes da Universidade Federal de Santa Catarina, e os 5 restantes, do Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos. Após analisar o perfil de aceitação dos pós-graduandos através do estudo piloto, foi realizado alguns ajustes para melhorar a aceitação do público alvo, em sequência, o questionário foi distribuído através de um e-mail, apresentando o autor da pesquisa, o objetivo da pesquisa, um endereço eletrônico (<https://pt.surveymonkey.com/r/ERJ82HDLHM>) que direcionava os participantes ao questionário com as perguntas relacionadas a este estudo, e, em anexo, um termo de concordância (APÊNDICE B), o qual explicava como seria realizada a pesquisa. O e-mail foi enviado aos coordenadores dos programas de pós-graduação em Ciências Biológicas, em todas as regiões do país (sul, sudeste, centro-oeste, norte e nordeste), após a aprovação dos coordenadores dos respectivos programas, foi enviado um segundo e-mail aos responsáveis

pelos laboratórios de pesquisa, pedindo-lhes que encaminhassem este e-mail aos seus alunos de pós-graduação (mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos). A quantidade de solicitações enviadas se deu de forma proporcional ao número de universidades e instituições que realizavam pesquisas com animais de experimentação na área de Ciências Biológicas no Brasil. Por exemplo, se determinada região do país concentrasse dez instituições de pesquisa que desenvolvessem ensaios não clínicos *in vivo* na área de Ciências Biológicas, logo, seria enviado para estas dez instituições um e-mail contendo o questionário, e assim foi realizado proporcionalmente para as cinco regiões brasileiras.

Desta forma, e-mail com o pedido de participação foi enviado para todos os 26 estados e o Distrito Federal, para todas as capitais destes estados e para algumas cidades onde estavam localizadas universidades e instituições que desenvolviam pesquisa científica não clínica com uso de animais de experimentação, como a cidade de Santa Maria no Rio Grande do Sul, Criciúma no estado de Santa Catarina, Ponta Grossa no estado do Paraná, Ribeirão Preto, São Carlos e Franca no estado de São Paulo, Uberlândia e Ouro Preto no estado de Minas Gerais e Niterói no estado do Rio de Janeiro. Com isso, todas as Universidades Federais e Estaduais do país, assim como algumas universidades e instituições privadas de regiões como o sul, sudeste e nordeste do Brasil, receberam o convite para participarem desta pesquisa. E por fim, dentro das universidades e instituições, os convites foram enviados aos programas de pós-graduação em farmacologia, fisiologia, bioquímica, biofísica, toxicologia, imunologia, neurociência, microbiologia, genética, centro de experimentação animal, biologia celular e patologia.

O questionário tinha caráter sigiloso e impessoal, sendo somente solicitado a identificação da instituição e do departamento nos quais o pós-graduando desenvolveu (ou estava desenvolvendo) seu trabalho científico, o grau acadêmico (mestrando, doutorando ou pós-doutorando) e o sexo. Não houve qualquer tipo de contato pessoal ou eletrônico com os estudantes no momento do preenchimento do questionário. Na última página do questionário, o pós-graduando tinha a opção de envio do questionário. Assim, os questionários foram enviados automaticamente para a conta restrita do autor da pesquisa no “*SurveyMonkey*”, e, posteriormente, as respostas foram analisadas e registradas.

Caso os participantes da pesquisa tivessem o interesse de sanar alguma dúvida ou fazer alguma crítica, foi disponibilizado o e-mail do autor da pesquisa na última página do questionário.

### 5.2.2. Coleta de dados

Foi criada uma conta online na página da “*www.surveymonkey*” para construção e distribuição do questionário, assim como para a coleta e armazenamento dos resultados. A “*SurveyMonkey*” é uma companhia baseada em nuvem de desenvolvimento de pesquisa, com especialidade em criação e divulgação de questionários profissionais. Neste contexto, à medida que os pós-graduandos respondiam e enviavam os questionários para a conta online do autor da pesquisa, as respostas foram gradativamente armazenadas na “*SurveyMonkey*”, em dados brutos por cada pergunta formulada. Quando o número de questionários respondidos atingiu a marca de 151 participantes, foi realizada a análise dos resultados.

### 5.2.3. Análise dos dados

A análise dos dados foi realizada em porcentagem de respostas “sim” e “não” de cada pergunta formulada no questionário, através de representação gráfica, gerada a partir do programa “*Prism*” (versão 5).

## 5.3. Pesquisa das universidades e instituições participantes do estudo

Após a análise dos resultados obtidos com as respostas dos estudantes de pós-graduação, foi realizado um levantamento da literatura em bases de dados “*PubMed*” de estudos envolvendo animais de experimentação (ratos e camundongos), de alguns departamentos de pesquisa na área de Ciências Biológicas, de universidades e instituições brasileiras que responderam ao questionário. Para a realização deste levantamento da literatura foram estabelecidas palavras-chave (filtros) e critérios de inclusão (Tabela 1). As palavras-chave foram “**mice**” or “**rats**”, “**pharmacology**”, “**Brazil**”, “**Sigla da instituição que participou da pesquisa**”, or “**Nome da instituição em Português**”, or “**Nome da instituição em Inglês**”. Já os critérios de inclusão escolhidos e disponíveis em base de dados “*PubMed*”, foram: a seleção de trabalhos completos e gratuitos (**Free Full Text**), trabalhos publicados nos últimos quatro anos (**01/01/2013 a 01/01/2017**), a seleção de outros animais (**Other Animals**), e por fim, apenas a seleção de trabalhos onde o primeiro autor da pesquisa era proveniente da mesma instituição onde foi realizado o estudo.

Este levantamento da literatura foi realizado para fins comparativos, entre as respostas obtidas a partir do questionário com os estudantes e os resultados obtidos através da análise das informações contidas nos trabalhos publicados pelas mesmas universidades e instituições que participaram deste estudo.

### 5.3.1. Coleta dos trabalhos publicados

A Tabela 1, mostra os filtros que foram utilizados para a realização do levantamento de dados.

Tabela 1. Filtros utilizados para a coleta dos trabalhos publicados

<b>FILTROS</b>	<b>PALAVRAS-CHAVE</b>
FILTRO 1	“mice” or “rats” “pharmacology” “Brazil” “SIGLA DA UNIVERSIDADE ou INSTITUIÇÃO” or “Nome da Universidade ou Instituição em Português” or “Nome da Universidade ou Instituição em “Ingês”
FILTRO 2	“mice” or “rats” “pharmacology” “Brazil” “SIGLA DA UNIVERSIDADE ou INSTITUIÇÃO” or “Nome da Universidade ou Instituição em Português” or “Nome da Universidade ou Instituição em “Ingês” + Free Full Text + Nos últimos 4 anos (01/01/2013 a 01/01/2017) + Other Animals
FILTRO 3	“mice” or “rats” “pharmacology” “Brazil” “SIGLA DA UNIVERSIDADE ou INSTITUIÇÃO” or “Nome da Universidade ou Instituição em Português” or “Nome da Universidade ou Instituição em “Ingês” + Free Full Text + Nos últimos 4 anos (01/01/2013 a 01/01/2017) + Other Animals + Que o autor do trabalho seja proveniente da instituição onde foi realizado a pesquisa

De acordo com os critérios de inclusão expostos na tabela 1, foram analisadas todas as universidades e instituições de pesquisa participantes deste estudo, e com isso, foi definido o número total de trabalhos coletados por universidade e instituição participante. Após a separação dos trabalhos que atenderam aos critérios de seleção pré-estabelecidos, os *PMIDs* (*Identificador Digital de Documentos do PubMed*) dos artigos foram armazenados em planilhas criadas através do programa *Excel* (*versão 2013*), as quais foram nomeadas com cada universidade e instituição correspondente.

### **5.3.2. Distribuição aleatória do número total de trabalhos publicados**

Após a coleta dos trabalhos publicados por universidades e instituições de pesquisa nacionais, através dos filtros de pesquisa (Tabela 1), foi realizada, a partir das ferramentas de trabalho disponíveis no programa *Excel* (*versão 2013*), a distribuição aleatória destes trabalhos em números correspondentes aos obtidos com os questionários respondidos pelos estudantes. Os trabalhos correspondentes a cada universidade e instituição de pesquisa obtidos no filtro 3, foram numerados em pastas no Excel, em seguida, para a distribuição aleatória destes trabalhos em números correspondentes aos obtidos com o questionário, foi realizada a distribuição aleatória através da seleção de uma célula do Excel. Posteriormente, foi acrescentado a esta célula o símbolo de igual (=), mais a palavra (ALEATÓRIOENTRE), mais o primeiro número da numeração dos trabalhos, mais o símbolo (;), mais o último número da numeração dos trabalhos, o fechamento dos parênteses, e por fim, foi pressionado a tecla (Enter) para gerar um número aleatório. Os números aleatórios foram gerados até completar o total de trabalhos que corresponderam ao número de questionários respondido pelos pós-graduandos de cada universidade e instituição de pesquisa. Por exemplo, os estudantes do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), uma das participantes desta pesquisa, contribuíram respondendo a 12 questionários. Logo, quando foi realizado o levantamento literário com a UFMG através dos filtros esquematizados na tabela 1, foram obtidos um total de 11.482 trabalhos com o filtro 1, em seguida, um total de 669 trabalhos com o filtro 2, e por fim, um total de 76 trabalhos com o filtro 3. Destes 76 trabalhos que entraram no pré-requisito de seleção, foram selecionados aleatoriamente 12 trabalhos, os quais foram proporcionais aos 12 questionários respondidos pelos estudantes da UFMG. Desta

forma, a planilha nomeada no programa *Excel (versão 2013)*, com as siglas UFMG, foi preenchida com 12 *PMIDs* de trabalhos publicados. O mesmo procedimento foi realizado com todas as outras universidades e instituições participantes desta pesquisa, até completar o total de 151 trabalhos publicados, correspondente aos 151 questionários respondidos pelos pós-graduandos.

### **5.3.3. Análise dos trabalhos selecionados**

Após o levantamento da literatura e a seleção aleatória de 151 artigos publicados em revistas especializadas pelas diversas instituições brasileiras, foi desenvolvido um segundo questionário (APÊNDICE C) pelo autor da pesquisa, contendo perguntas semelhantes aquelas enviadas aos estudantes de pós-graduação. Em seguida, os 151 trabalhos selecionados foram distribuídos aleatoriamente através do programa *Excel (versão 2013)*, para dez avaliadores independentes. Em sequência, foi realizada uma reunião com todos estes dez avaliadores para instruí-los sobre o processo de avaliação dos trabalhos publicados a partir deste segundo questionário (APÊNDICE C). O objetivo destes avaliadores foi identificar nos trabalhos publicados o grau de transparência das informações quanto ao desenvolvimento de experimentação em animais de laboratório. As perguntas formuladas no questionário foram relacionadas à hipótese e ao objetivo do estudo, bem como se houve aprovação prévia do estudo pelo comitê de ética da instituição; se as diretrizes *ARRIVE* foram utilizadas no trabalho; se foram descritas informações sobre as características e condições sanitárias dos animais utilizados nos estudos; se foram mencionadas as informações sobre o delineamento experimental; sobre a origem dos reagentes utilizados nos trabalhos; se foi relatado o teste estatísticos utilizado para análise dos resultados, entre outros.

### **5.3.4. Análise dos dados encontrados pelos avaliadores**

Após o término da análise dos artigos pelos avaliadores independentes, os questionários respondidos foram enviados ao autor desta pesquisa para contabilização dos resultados. Em sequência, os dados brutos gerados da contabilização dos questionários foram plotados em gráficos através do programa "*Prism*" (versão 5) e comparados com as respostas que foram obtidas pelos pós-graduandos através do questionário principal. Assim, as respostas dos estudantes foram comparadas com as respostas obtidas pelos avaliadores através da

análise dos trabalhos publicados pelas mesmas universidades e instituições que os pós-graduandos estavam inseridos.

#### **5.4. Avaliações dos resultados obtidos através do questionário enviado aos estudantes de pós-graduação, dos trabalhos publicados pelas universidades e instituições participantes e dos resultados obtidos da literatura**

Além das comparações realizadas entre as respostas obtidas pelos pós-graduandos com os resultados obtidos através da análise dos trabalhos publicados pelas universidades e instituições, foi realizada também a comparação entre os dados disponíveis na literatura. Desta forma, foi gerado um gráfico comparativo entre os resultados das duas pesquisas realizadas neste estudo com os dados disponíveis na literatura.

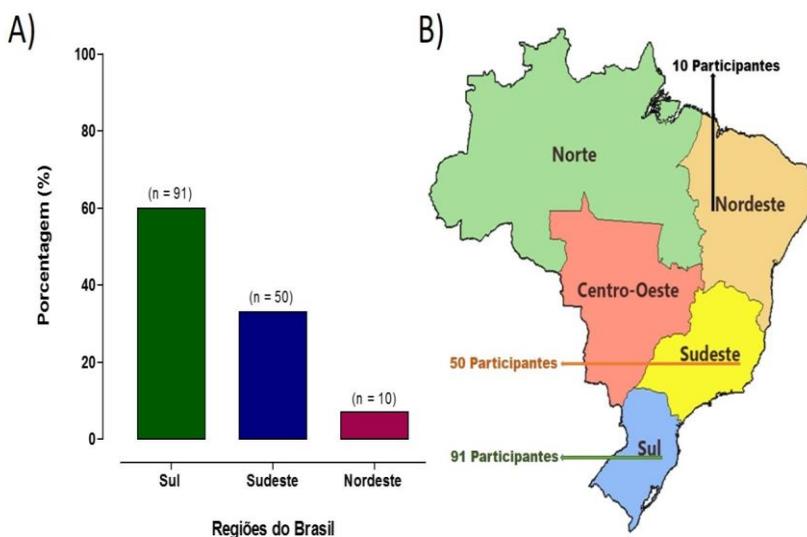
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Resultados referentes à participação dos pós-graduandos através do questionário

#### 6.1.2. Dados sobre a distribuição dos participantes por regiões do Brasil

A quantidade de solicitações (e-mails) enviadas se deu de forma proporcional as universidades e ou instituições que realizavam pesquisas com animais de experimentação, na área de Ciências Biológicas no Brasil. Como pode ser observado na figura 3, a região Sul do Brasil contribuiu com 60% das participações totais (Figura 3A) da pesquisa, correspondendo a 91 questionários (Figura 3 B), sendo a região com o maior número de participantes. Em seguida, a região na qual houve maior participação foi a Sudeste, com 33% (Figura 3A), totalizando 50 questionários (Figura 3B). Por fim, a região Nordeste contribuiu com 7% das participações totais (Figura 3A), correspondendo a 10 questionários respondidos pelos pós-graduandos (Figura 3B). Este projeto de pesquisa contou com a participação de 151 pós-graduandos que responderam ao questionário.

Figura 3. Distribuição dos participantes do questionário por regiões do país.

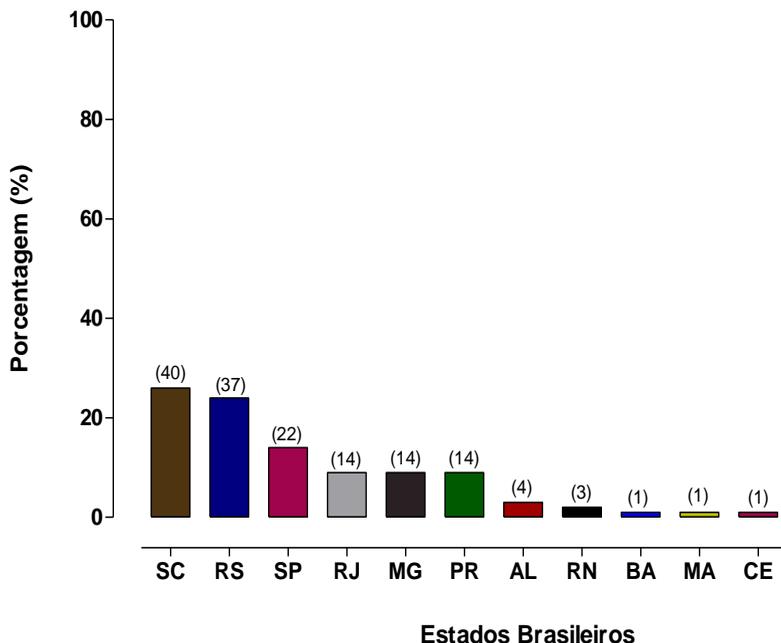


O questionário foi respondido por 151 participantes distribuídos pelas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil. (A) Porcentagem de participações e (B) número de participantes por regiões do país.

### **6.1.3. Dados sobre a distribuição dos participantes da pesquisa por estados brasileiros**

Como pode ser observado na Figura 4, este estudo contou com a participação de 11 estados brasileiros, distribuídos pela região Sul, Sudeste e Nordeste. O Estado de Santa Catarina (SC) apresentou maior contribuição em porcentagem de questionários respondidos, com 26% das participações (40 participantes). Em seguida, o Estado do Rio Grande do Sul (RS), o qual contribuiu com 24% dos questionários (37 participantes) e o Estado do Paraná (PR), que contribuiu com 9% dos questionários (14 participantes). Em relação a região Sudeste, o Estado de São Paulo (SP), apresentou maior porcentagem de participantes, sendo responsável por 14% dos questionários respondidos (22 participantes). Os Estados do Rio de Janeiro (RJ) e Minas Gerais (MG), contribuíram com 9% dos questionários cada, correspondendo a 14 participantes por estado. Para a região Nordeste, o Estado de Alagoas (AL) contribuiu com 3% dos questionários (4 participantes), o Estado do Rio Grande do Norte (RN) com 2% (3 participantes), e os Estados da Bahia (BA), Maranhão (MA) e Ceará (CE), corresponderam a 1% dos participantes (1 questionário por estado). Embora, tenha sido enviado e-mails solicitando a participação das instituições do Centro-Oeste e Norte do Brasil, não houve a participação destas regiões no estudo. A falta de colaboração de pós-graduando destes estados pode estar relacionada em parte, com o baixo desenvolvimento de pesquisas não clínicas com animais de experimentação pelas universidades e instituições de pesquisa destas regiões, bem como pelo baixo interesse por parte destas regiões em participar desta pesquisa.

Figura 4. Número de questionários respondidos por estados brasileiros.



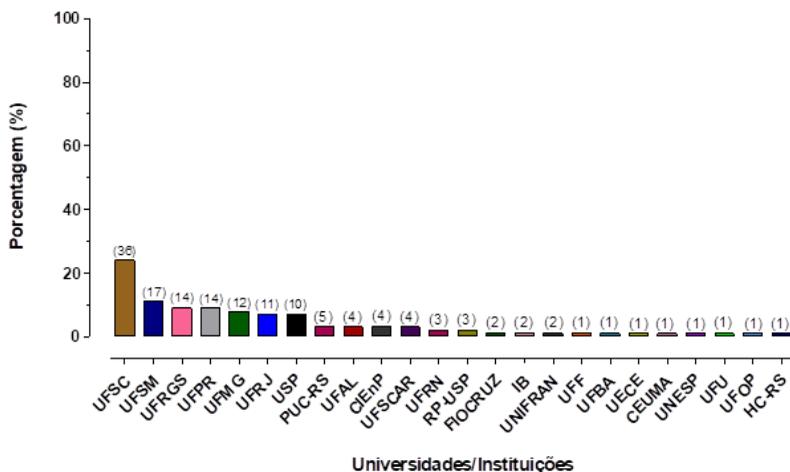
Acima de cada barra está indicado o número total de questionários por estado brasileiro. SC, Santa Catarina; RS, Rio Grande do Sul; SP, São Paulo; RJ, Rio de Janeiro; MG, Minas Gerais; PR, Paraná; AL, Alagoas; RN, Rio Grande do Norte; BA, Bahia; MA, Maranhão; CE, Ceará.

#### 6.1.4. Dados sobre a participação das universidades e instituições de pesquisa

Como pode ser observado na Figura 5, a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) contribuiu com 24% dos questionários respondidos. Em seguida, a Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) contribuiu com 11%, a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e a Universidade Federal do Paraná (UFPR) contribuíram com 9% cada. A Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) contribuiu com 8% dos questionários, a Universidade Federal do Rio de

Janeiro (UFRJ) com 7% e a Universidade de São Paulo (USP) contribuíram com 7% e a Universidade Pontifícia do Rio Grande do Sul (PUC) com 3% dos questionários recebidos. A Universidade Federal de Alagoas (UFAL), o Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos (CIEnP) e a Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), contribuíram com 9% dos questionários. A Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e a Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto (RP-USP) com 2% cada; a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), o Instituto Butantã (IB), a Universidade de Franca (UNIFRAN), a Universidade Federal Fluminense (UFF), a Universidade Federal da Bahia (UFBA), a Universidade Estadual do Ceará (UECE), o Centro Universitário do Maranhão (CEUMA), a Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), a Universidade Federal de Uberlândia (UFU), a Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e o Hospital das Clínicas do Rio Grande do Sul (HC-RS) contribuíram com 1% das participações por instituição.

Figura 5. Distribuição dos questionários respondidos por Universidades e Instituições de Pesquisa.



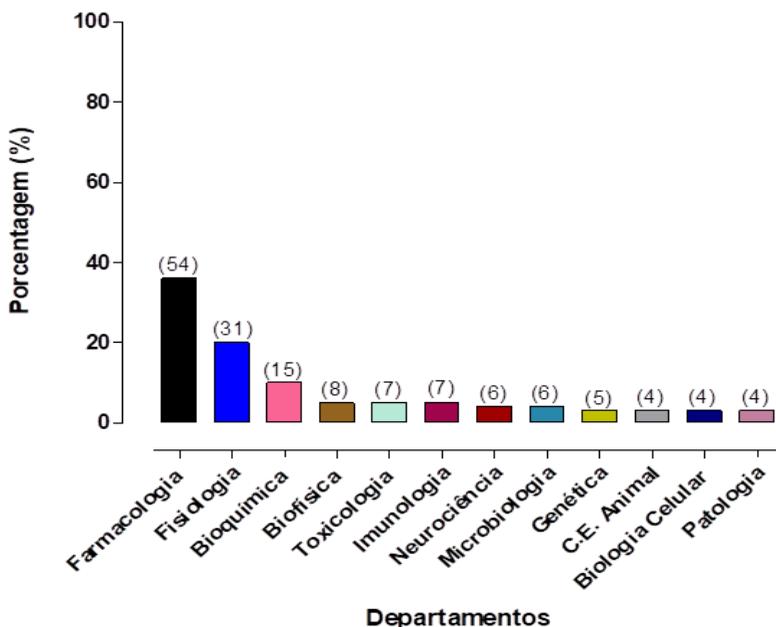
Dados sobre a participação das universidades e institutos de pesquisa no questionário. As universidades e instituições participantes foram: UFSC, UFSM, UFRGS, UFPR, UFMG, UFRJ, USP, PUC-RS, UFAL, CIEnP, UFSCAR, UFRN, RP-USP, FIOCRUZ, IB, UNIFRAN, UFF, UFBA, UECE, CEUMA, UNESP, UFU, UFOP e HC-RS. Acima

de cada barra está indicado o número total de questionários por universidade e ou instituição.

### 6.1.5. Dados sobre a participação dos programas de pós-graduação

Como pode ser observado na Figura 6, os programas de Pós-Graduação em Farmacologia foram responsáveis por 36% das participações. Em seguida, os departamentos de Fisiologia contribuíram com 20% das participações. Os departamentos de Bioquímica contribuíram com 10% dos questionários. Os departamentos de Biofísica contribuíram com 5% dos questionários. Os departamentos de Toxicologia e Imunologia contribuíram juntos com 10% das participações. Os departamentos de Neurociência e Microbiologia contribuíram com 4% dos questionários cada. Os departamentos de Genética contribuíram com 3% das participações. Por fim, os Centros de Experimentação Animal, Biologia Celular e Patologia, contribuíram com 3% das participações cada.

Figura 6. Distribuição dos questionários respondidos por programas de pós-graduação.



Dados sobre a participação dos departamentos de pesquisa no questionário. Os Programas de Pós-Graduação participantes, foram os departamentos de Farmacologia, Fisiologia, Bioquímica, Biofísica, Toxicologia, Imunologia, Neurociência, Microbiologia, Genética, Centro de Experimentação Animal, Biologia Celular e Patologia. Acima de cada barra está indicado o número total de questionários por departamento.

## **6.2. Resultados obtidos através do questionário enviado aos estudantes de pós-graduação**

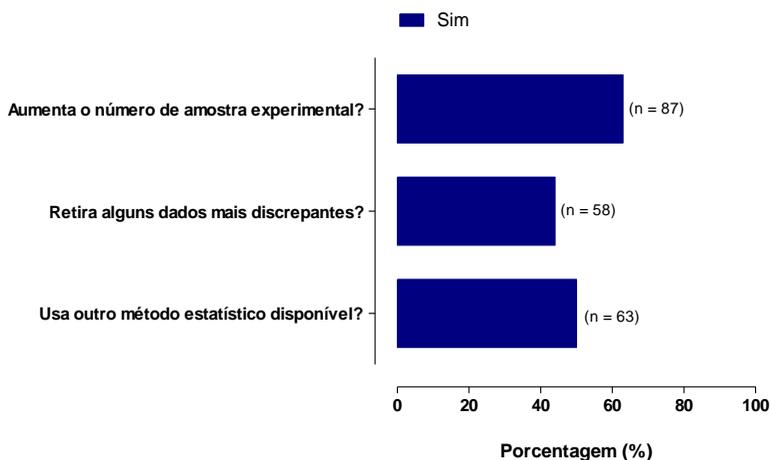
### **6.2.1. Avaliações sobre a conduta do pesquisador quando os dados obtidos no estudo não foram estatisticamente significantes entre grupos experimentais**

Os incentivos pela busca de resultados positivos por grande parte da comunidade científica, por financiadores de pesquisa e por muitos dos editores de periódicos internacionais, podem influenciar os pesquisadores a desenvolverem trabalhos com vieses conhecidos e desconhecidos, comprometendo assim a confiabilidade dos estudos. Neste contexto, um exemplo claro é com relação a uma expressiva parte de revistas científicas de alto impacto, as quais priorizam a divulgação de trabalhos com resultados positivos, pois os mesmos geram inúmeras citações, fazendo com que a revistas tenham mais credibilidade e visibilidade científica (LANDIS et al., 2013).

Neste sentido, para a avaliação da conduta do pesquisador sobre seu posicionamento em relação aos dados obtidos em um experimento, o questionário abordou uma questão específica com mais de uma opção de resposta a respeito da atuação do pesquisador no que tange a avaliação dos dados brutos gerados. Desta forma, foi realizada a seguinte questão: Em relação aos resultados obtidos em ensaios não clínicos envolvendo animais, quais atitudes seriam tomadas caso os dados da pesquisa não apresentarem significância estatística? Esta questão foi elaborada com base em guias internacionais para Boas Práticas de Laboratório (*BPL*), e através dos parâmetros oriundos das diretrizes *ARRIVE*. Conforme observado na figura 7, 63% dos pós-graduandos relataram que aumentam o número das amostras experimentais (animais), quando não foi observado diferença estatisticamente significativa entre determinados grupos experimentais. Além disso, em 50% dos casos, os pesquisadores optam também por utilizar outro método estatístico para verificar a possibilidade de ser observado diferença estatisticamente significativa

entre os grupos experimentais. Por fim, 44% dos participantes afirmaram que podem retirar dados brutos discrepantes, a fim de deixar a amostra mais homogênea, aumentando a probabilidade de os dados apresentarem significância estatística.

Figura 7. Perfil de resposta do questionário, descrito em porcentagem, quando perguntado sobre a conduta do pesquisador quando os dados do estudo não foram estatisticamente significantes.



As perguntas descritas na figura foram formuladas somente no questionário. As questões propostas buscaram avaliar a forma com que os pesquisadores avaliam os dados quando estes não geram resultados esperados, sendo perguntado se o pesquisador aumenta o número experimental, retira algum dado discrepante ou utiliza outro método estatístico disponível para alcançar a diferença significativamente estatística. Os dados foram plotados como a porcentagem de respostas positivas obtidas para os parâmetros avaliados. Ao lado de cada barra está indicado o número total de participantes que responderam positivamente a questão.

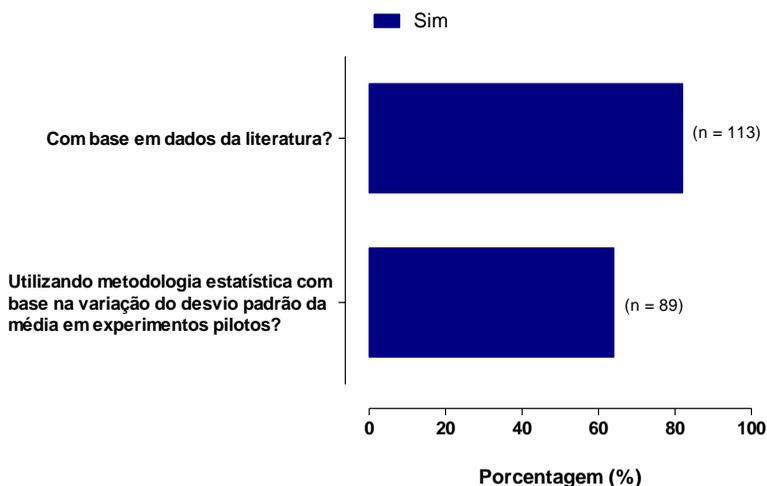
### **6.2.2. Avaliações sobre a maneira com a qual é realizado o cálculo do tamanho da amostra experimental**

Um bom planejamento experimental é fundamental para que se obtenha dados robustos e com validade científica. Dentro do planejamento de um ensaio, um tópico importante consiste na definição

do tamanho da amostra experimental, ou seja, o número de animais por grupo. Segundo Festing e Altman (2002), quando não se conhece a variação experimental, que é baseada na média e no desvio padrão da amostra, é necessário a realização de um experimento piloto para definição de tais parâmetros, para posteriormente realizar o cálculo do tamanho da amostra experimental.

Com isso, afim de avaliar a maneira com a qual os pesquisadores realizam o cálculo do tamanho da amostra experimental, foram abordadas duas perguntas no questionário: “O pesquisador realiza o cálculo do tamanho da amostra utilizando dados da literatura e/ou se o faz utilizando dados de média e desvio padrão de estudos piloto realizados no próprio laboratório”. Conforme observado na figura 8, 82% dos pesquisadores realizam a estimativa do tamanho da amostra experimental com base em dados da literatura, enquanto que 64% dos pesquisadores também fazem um estudo piloto e o utilizam como base para, através da média e desvio padrão dos resultados, realizar o cálculo matemático do tamanho da amostra experimental para o experimento completo.

Figura 8. Perfil de resposta do questionário, descrito em porcentagem, quando perguntado sobre a estimativa do tamanho da amostra experimental.



As perguntas descritas na figura foram formuladas somente no questionário. As questões propostas buscaram avaliar a forma de estimativa realizada pelos pesquisadores para calcular o tamanho da

amostra experimental, sendo perguntado se o número experimental foi calculado com base na literatura ou se foi calculado através de método estatístico, utilizando estudo piloto. Os dados foram plotados como a porcentagem de respostas positivas obtidas para os parâmetros avaliados. Ao lado de cada barra está indicado o número total de participantes que responderam positivamente a questão.

### **6.3. Levantamento bibliográficos de trabalhos não clínicos *in vivo* publicados pelas mesmas universidades e instituições participantes da pesquisa**

#### **6.3.1. Seleção de trabalhos publicados a partir de critérios de inclusão**

A Tabela 2, representa a consulta realizada através da base de dados *PubMed*, com o auxílio de alguns filtros de pesquisa, elaborados para obtenção de trabalhos publicados pelas universidades e instituições participantes deste estudo. Como pode ser observado na tabela 2, o número de trabalhos publicados pelas universidades e instituições de pesquisa, obtidos através da consulta literária com o filtro 1, foi de 87.168 trabalhos. Em seguida, foi realizado uma segunda consulta com o filtro 2, onde foi obtido um total de 4.134 trabalhos publicados. Por fim, foi realizado a consulta com o filtro 3, gerando 535 trabalhos. Após as consultas, os 535 trabalhos publicados passaram por uma seleção aleatória, para obtenção de um número final de 151 trabalhos publicados, quantia proporcional ao número de questionários respondidos pelos estudantes de pós-graduação.

Tabela 2. Números de trabalhos publicados obtidos a partir de filtros de pesquisa

FILTROS	PALAVRAS-CHAVE	Nº DE TRABALHOS
FILTRO 1	<p>“mice” or “rats” “pharmacology”  “brazil” “SIGLA DA  UNIVERSIDADE ou  INSTITUIÇÃO” or “Nome da  Universidade ou Instituição em  Português” or “Nome da  Universidade ou Instituição em  “Ingês”</p>	87.168
FILTRO 2	<p>“mice” or “rats” “pharmacology”  “brazil” “SIGLA DA  UNIVERSIDADE ou  INSTITUIÇÃO” or “Nome da  Universidade ou Instituição em  Português” or “Nome da  Universidade ou Instituição em  “Ingês” + Free Full Text + Nos  últimos 4 anos (01/01/2013 a  01/01/2017) + Other Animals</p>	4.134
FILTRO 3	<p>“mice” or “rats” “pharmacology”  “brazil” “SIGLA DA  UNIVERSIDADE ou  INSTITUIÇÃO” or “Nome da  Universidade ou Instituição em  Português” or “Nome da  Universidade ou Instituição em  “Ingês” + Free Full Text + Nos  últimos 4 anos (01/01/2013 a  01/01/2017) + Other Animals + Que  o autor do trabalho seja proveniente  da instituição onde foi realizado a  pesquisa</p>	535
FILTRO 4	SELEÇÃO ALEATÓRIA DOS 535 TRABALHOS	151

## **6.4. Avaliações dos resultados obtidos através dos trabalhos publicados pelas universidades e instituições participantes da pesquisa**

### **6.4.1. Questões relacionadas ao planejamento experimental, analisadas apenas nos resultados obtidos através dos trabalhos publicados**

Com o objetivo de analisar algumas questões referentes apenas aos trabalhos publicados pelas mesmas universidades e instituições que participaram desta pesquisa, foram formuladas algumas questões que não fizeram parte do questionário enviado aos alunos de pós-graduação. As respostas foram separadas em: sim (azul) e não (verde), para as questões analisadas.

Um ponto importante no desenho experimental é a definição do mesmo número de animais para todos os grupos experimentais. Desta forma, a comparação entre os grupos se torna homogênea, proporcional e com possibilidade de gerar resultados com validade científica e menor probabilidade de resultados falsos positivos (MCGRATH; CURTIS, 2015). Neste sentido, quando analisado nos trabalhos se foi descrito informações quanto ao número de animais por grupo experimental, pode ser observado na figura 9, que em 85% dos trabalhos foi descrito o número de animais por grupo e destes 85%, apenas 47% apresentavam o mesmo número de animais em cada grupo experimental.

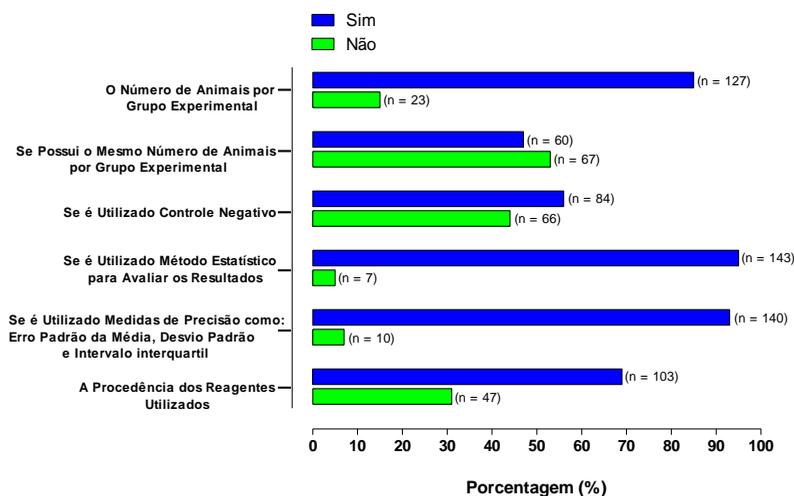
O planejamento de um estudo não clínico que utiliza animais, passa pela composição dos grupos experimentais. Dentro deste contexto, um dos grupos experimentais que deve fazer parte do estudo é o grupo composto pelo controle negativo (ex. veículo utilizado para diluição da substância teste) (EICKEN, 2013). Ao analisar esta questão, foi observado que 56% dos trabalhos publicados utilizavam o controle negativo nos ensaios, não sendo observado tal controle em 44% dos trabalhos avaliados.

A escolha do método estatístico adequado é um ponto crítico para a análise dos dados gerados no estudo. De fato, para analisar o perfil de resposta das substâncias avaliadas, são utilizados alguns testes estatísticos que normalmente devem ser pré-estabelecidos, os quais irão indicar se as respostas encontradas foram devido ao acaso ou fazem parte do fenômeno (MCGRATH; CURTIS, 2015). Sendo assim, pode se observar na figura 9, que as descrições sobre os métodos estatísticos foram descritas na maioria dos trabalhos publicados, cerca de 95%. Além disso, medidas de precisão são importantes para informar a

flutuação dos dados dentro de uma análise. Em 93% dos trabalhos publicados as informações de medidas de precisão, como média, erro padrão da média, desvio padrão e intervalo interquartil foram descritas.

A qualidade dos ensaios passa também pela organização e qualidade do material e dos reagentes utilizados. De fato, falta de informações quanto a procedência, validade e lote das substâncias utilizadas no estudo inviabilizam as tentativas de reprodutibilidade dos trabalhos. Neste sentido, foi observado nos trabalhos publicados que as informações quanto a procedência dos reagentes foi descrita em 69% deles (Figura 9), e não mencionadas em 31%.

Figura 9. Análise de alguns parâmetros obtidos apenas através dos trabalhos publicados.



As perguntas descritas na figura foram formuladas somente nos trabalhos publicados, sendo que as opções de respostas aos avaliadores eram “sim” (azul) ou “não” (verde). As questões propostas buscaram avaliar informações quanto ao planejamento experimental, como por exemplo, a descrição dos trabalhos quanto ao número de animais por grupo experimental, se os grupos experimentais possuíam o mesmo número de amostra, se foi utilizado grupo controle negativo, se foi descrito o método estatístico para avaliação dos resultados, se foi utilizado medidas de precisão como erro padrão da média, desvio padrão e intervalo interquartil, e se foi informado a procedência dos reagentes utilizados no estudo. Os dados foram plotados como a porcentagem de

respostas obtidas para os parâmetros avaliados. Ao lado de cada barra está indicado o número total de trabalhos publicados.

## **6.5. Resultados obtidos através do questionário enviado aos estudantes de pós-graduação e comparados com trabalhos publicados pelas universidades e instituições participantes**

### **6.5.1. Avaliações do conhecimento dos pesquisadores a respeito dos animais utilizados no estudo, e uma correlação dos mesmos parâmetros em trabalhos publicados**

Com o intuito de comparar os resultados obtidos através do questionário enviado aos estudantes de pós-graduação, foi realizado um levantamento da literatura através do portal de periódicos “*Pubmed*”. Através desta base de dados, foram selecionados trabalhos publicados nos últimos 4 anos, pelas mesmas instituições que participaram da pesquisa e que utilizavam animais de experimentação. Os trabalhos encontrados na literatura, passaram por filtros de seleção (descritos com mais detalhes no material e métodos), foram selecionados aleatoriamente e proporcionalmente as instituições que participaram do questionário.

Nesta avaliação, foram comparados o grau de informações correspondente a alguns parâmetros relacionados aos animais utilizados nos ensaios, como a espécie e a linhagem animal utilizada nos estudos, assim como a qualidade sanitária dos mesmos, a procedência e o cruzamento das matrizes, e informações quanto aos critérios de acasalamento dos animais.

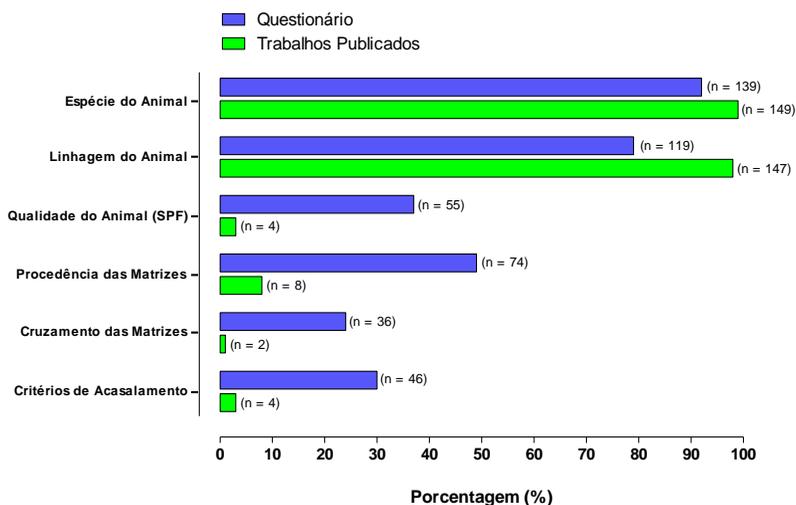
Conforme pode ser observado na figura 10, os dados das barras azuis foram adquiridos pelo questionário, enquanto que as barras em verde foram as respostas encontradas nos trabalhos publicados. Assim, 92% dos pesquisadores relataram que conhecem e descrevem a espécie animal utilizada no estudo, sendo observado nos trabalhos publicados um resultado semelhante (99%), para este parâmetro. Em relação a linhagem animal utilizada no estudo, foi observado que 79% dos pesquisadores informam a linhagem em seus trabalhos, e de forma similar, os trabalhos publicados também apresentaram a descrição da linhagem animal (98%).

A qualidade sanitária dos animais tem influência importante no resultado dos ensaios. Os animais livres de patógenos especificados ou *SPF* (do inglês, *Specific Pathogen Free*), são desprovidos de

determinados patógenos que podem levar a algum tipo de doença. Os animais *SPF* são criados e alojados necessariamente em ambientes de alto controle sanitário, sendo os animais mais indicados para o desenvolvimento de pesquisa não clínica pela sua alta qualidade sanitária. Como pode ser observado na figura 10, 37% dos pesquisadores afirmaram utilizar animais *SPF* em seus estudos. No entanto, apenas 3% dos trabalhos publicados apresentavam tal informação demonstrando uma clara discrepância entre as informações obtidas.

Os parâmetros como a procedência das matrizes dos animais utilizados no estudo, a forma ou a maneira que é realizado o cruzamento das matrizes, e os critérios de acasalamento dos animais, são informações importantes para que se tenha a rastreabilidade dos animais, e assim saber se são mantidas suas características genéticas. Neste contexto, pode ser observado na figura 10, que o conhecimento dos pesquisadores a respeito dos parâmetros de procedência das matrizes, cruzamento das matrizes, e critérios de acasalamento foram, 49%, 24% e 30%, respectivamente. Por outro lado, através da avaliação dos trabalhos publicados, foi observado que estes parâmetros foram pouco mencionados, sendo descrito a procedência das matrizes em 8% dos trabalhos publicados, o cruzamento das matrizes em apenas 1% dos trabalhos publicados, e por fim, os critérios de acasalamento em 3% dos trabalhos publicados.

Figura 10. Comparação de questões relacionadas aos animais, entre o questionário e os trabalhos publicados pelas universidades e instituições que participaram desta pesquisa.



As perguntas descritas na figura foram formuladas tanto no questionário (azul), quanto para a avaliação nos trabalhos publicados pelas instituições participantes da pesquisa (verde). As questões propostas buscaram avaliar a qualidade dos animais, como a descrição da espécie e da linhagem animal utilizada, a qualidade do animal (*Specific Pathogen Free – SPF*), a procedência e o cruzamento das matrizes e os critérios de acasalamento. Os dados foram plotados como a porcentagem de respostas obtidas para os parâmetros avaliados. Ao lado de cada barra está indicado o número total de questionários ou trabalhos publicados.

### 6.5.2. Avaliações do conhecimento dos pesquisadores a respeito dos cuidados com os animais utilizados no estudo, e uma comparação dos mesmos parâmetros em trabalhos publicados

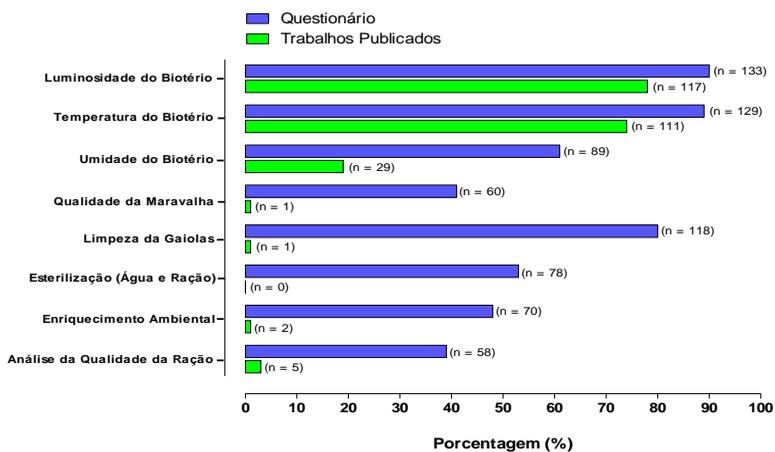
A qualidade dos animais também passa por critérios que compreendem seu ambiente de manutenção ao longo da vida. Segundo as diretrizes *ARRIVE*, é fundamental relatar o tipo de gaiola, o material de nidificação, o número de animais por gaiola, condições de manutenção, frequência de alimentação, ciclos de luz claro e escuro, umidade, temperatura, qualidade de água, acesso a água e comida, enriquecimento ambiental, dentre outros (KILKENNY et al., 2010). O

controle destes parâmetros e a descrição dos mesmos nas pesquisas publicadas são de extrema importância para minimizar as possíveis variações biológicas, reduzindo assim a alta incidência de irreprodutibilidade de trabalhos publicados (REARDON, 2016).

Conforme pode ser observado na figura 11, os dados das barras azuis foram adquiridos pelo questionário, enquanto que as barras em verde foram as respostas encontradas nos trabalhos publicados. Assim, 90% dos pesquisadores afirmaram conhecer e relatar o controle de luminosidade do biotério onde foram criados os animais utilizados em suas pesquisas. Os dados de luminosidade foram informados em 78% dos trabalhos publicados. O controle de temperatura, segundo os pesquisadores, é citado em 89% das instalações onde foram criados os animais utilizados na pesquisa. A descrição da temperatura em que os animais foram mantidos foi relatado em 74% dos trabalhos avaliados. O controle de umidade também é fundamental para manter a homogeneidade ambiental onde os animais são mantidos, sendo observado que 61% dos pesquisadores conhecem ou realizam tal verificação em seus biotérios. No entanto, em apenas 19% dos trabalhos publicados informaram os parâmetros de umidade utilizados nos biotérios que mantinham os animais. Por fim, 41% dos pesquisadores afirmaram conhecer e relatar a qualidade da maravalha utilizada para a cama dos animais, enquanto que apenas 1% dos trabalhos avaliados descreveram tal informação.

As informações quanto a rotina de limpeza das gaiolas habitadas pelos animais, foi relatado em 80% dos questionários, porém descrito em apenas 1% dos trabalhos publicados. As informações quanto à esterilização da água e ração consumida pelos animais, foi relatado em 53% dos questionários, e não foi descrita nos trabalhos publicados. O enriquecimento ambiental, uma maneira de reduzir o estresse dos animais, foi relatado por 48% dos pesquisadores, porém este dado foi descrito em apenas 1% dos trabalhos publicados. Por fim, 39% dos pesquisadores informaram que realizam a análise da qualidade da ração consumida pelos animais, enquanto que este parâmetro foi observado em apenas 3% dos trabalhos publicados.

Figura 11. Comparação de questões relacionadas aos cuidados com os animais, entre o questionário e os trabalhos publicados pelas universidades e instituições que participaram desta pesquisa.



As perguntas descritas na figura foram formuladas tanto no questionário (azul), quanto para a avaliação nos trabalhos publicados pelas instituições participantes da pesquisa (verde). As questões propostas buscaram avaliar informações quanto a manutenção e cuidados com os animais, como o controle da luminosidade, temperatura e umidade do biotério, assim como a qualidade da maravalha e a rotina de limpeza das gaiolas, a esterilização da água e ração consumida pelos animais, o enriquecimento ambiental e a análise da qualidade da ração. Os dados foram plotados como a porcentagem de respostas obtidas para os parâmetros avaliados. Ao lado de cada barra está indicado o número total de questionários ou trabalhos publicados.

### 6.5.3. Questões relacionadas ao planejamento experimental, analisadas tanto nos resultados obtidos através dos questionários, quanto nos trabalhos publicados

Segundo as diretrizes *ARRIVE*, um bom planejamento experimental contempla ações distintas que almejam reduzir os vieses de ensaios realizados com animais de experimentação (KILKENNY et al., 2010). Além disso, o planejamento adequado de um experimento corrobora com a ideia de redução, refinamento e substituição de animais em pesquisa, descritos por Russel e Burch's na década de 1959,

princípios da Técnica Experimental Humana (do inglês, *The Principles of Humane Experimental Technique*), princípios estes que contribuem até hoje para a realização humanizada e consciente de experimentos envolvendo animais de experimentação, objetivando sempre o avanço científico (TANNENBAUM; BENNETT, 2015).

Infelizmente, nos últimos anos não tem se ampliado a utilização das diretrizes *ARRIVE* no planejamento e na condução dos estudos não clínicos envolvendo animais de experimentação. De fato, por mais que as diretrizes *ARRIVE* orientem os autores e revisores a seguirem critérios rigorosos de qualidade científica para que os trabalhos se tornem mais robustos, rastreáveis e reproduzíveis, ainda há relativamente pouca adesão destas diretrizes por parte dos pesquisadores, revisores e editores de revistas científicas (BAKER et al., 2014). Conforme pode ser observado na figura 12, os dados das barras azuis foram adquiridos pelo questionário, enquanto que as barras em verde foram as respostas encontradas nos trabalhos publicados. Assim, 54% dos pesquisadores afirmaram utilizar as diretrizes *ARRIVE* em seus estudos, enquanto que apenas 4% dos trabalhos publicados descreveram tal informação.

Anteriormente ao início de um ensaio é importante a aprovação do protocolo experimental pelo comitê de ética. Segundo o *ARRIVE*, é fundamental indicar nos trabalhos o número do protocolo experimental e os conselhos de ética que avaliaram o protocolo (KILKENNY et al., 2010). Neste sentido, 87% dos pesquisadores afirmaram realizar os ensaios *in vivo* após aprovação do comitê de ética, em consonância com os 93% dos trabalhos publicados, que incluíam a informação sobre a aprovação do protocolo utilizado no estudo.

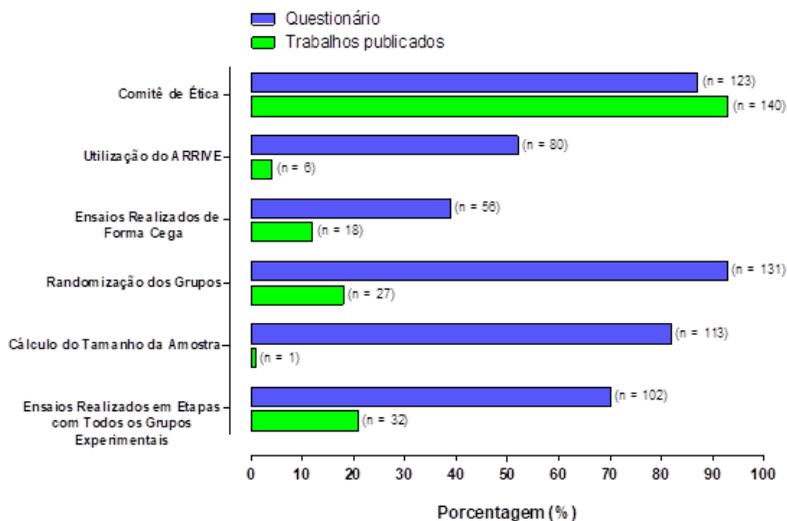
Na execução e na coleta de dados de um estudo *in vivo*, é importante manter a isenção de expectativa. Segundo o *ARRIVE*, para que os resultados obtidos sejam os mais fiéis a realidade, é fundamental quando possível, que as administrações de substâncias e a coleta de dados, sejam realizadas de forma cega (KILKENNY et al., 2010). De fato, experimentos que não são realizados de forma cega aumentam a probabilidade de se obter resultados esperados quando comparados com experimentos cegos, o que pode comprometer toda confiabilidade do estudo (BEBARTA; LUYTEN; HEARD, 2003). Como pode ser observado na figura 12, 39% dos pesquisadores responderam que os trabalhos foram realizados de forma cega, enquanto que este número é ainda menor (12%) quando se analisa os publicados pelos pesquisadores brasileiros.

Outro fator importante para que se possa obter resultados robustos de um ensaio com animais, é a randomização da amostra nos grupos experimentais, evitando possibilidades de variações conhecidas e desconhecidas que podem enviesar os resultados do estudo. Segundo as diretrizes *ARRIVE*, além de realizar a randomização, os pesquisadores deveriam informar a forma como foi realizado a randomização, a fim de facilitar equipes independentes de repetir o ensaio nas mesmas condições (KILKENNY et al., 2010). Como pode ser observado na figura 12, foi relatado por 93% dos pesquisadores a utilização de randomização nos grupos experimentais, enquanto que este número caiu para apenas 18% nos trabalhos publicados.

A definição do tamanho da amostra experimental é importante pois poucos animais por grupo experimental podem gerar resultados controversos e inconclusivos, enquanto que um número excessivo de animais vai em descontra aos princípios de redução, refinamento e substituição de animais em pesquisa. No planejamento do estudo, quando não se conhece a variação experimental, que é baseada na média e desvio padrão de uma amostra, é necessário que seja realizado um experimento piloto para definir os parâmetros de média e desvio padrão, para posteriormente ser calculado através de fórmulas matemáticas o número ideal de animais por grupo experimental (FESTING; ALTMAN, 2002). Neste sentido, pode ser observado na figura 12 que, 82% dos pesquisadores afirmaram nos questionários que realizam o cálculo do tamanho da amostra para definir o número experimental, enquanto que apenas 1% dos trabalhos publicados afirmaram realizar tal procedimento.

Por fim, quando aos estudos são realizados em etapas, é importante que em cada etapa do ensaio esteja presente representantes de todos os grupos experimentais, contemplando o controle negativo e o controle positivo. Desta forma, todos os grupos de um estudo com finalidade comparativa, serão expostos aos mesmos tipos de variações ambientais, sob a manipulação dos mesmos experimentadores, utilizando as mesmas substâncias e diluentes. Neste sentido, quando analisado a realização dos ensaios em etapas, 70% dos pesquisadores afirmaram utilizar todos os grupos experimentais em cada etapa, porém, apenas 21% dos trabalhos publicados afirmaram realizar este procedimento (figura 12).

Figura 12. Comparação de alguns parâmetros obtidos através do questionário e dos trabalhos publicados pelas universidades e instituições que participaram desta pesquisa.



As perguntas descritas na figura foram formuladas tanto no questionário (azul), quanto para a avaliação nos trabalhos publicados pelas instituições participantes da pesquisa (verde). As questões propostas buscaram avaliar informações quanto ao planejamento experimental, como por exemplo, se os trabalhos foram previamente aprovados pelo comitê de ética da instituição, se os estudos foram desenvolvidos seguindo as diretrizes *ARRIVE*, se os ensaios foram realizados de forma cega, se foi realizado a randomização dos grupos experimentais, se foi realizado o cálculo do tamanho da amostra e se os estudos foram realizados em etapas com todos os grupos experimentais. Os dados foram plotados como a porcentagem de respostas obtidas para os parâmetros avaliados. Ao lado de cada barra está indicado o número total de questionários (azul) ou trabalhos publicados (verde), que foram positivos para a pergunta realizada.

## **6.6. Avaliações dos resultados obtidos através do questionário enviado aos estudantes de pós-graduação, dos trabalhos publicados pelas universidades e instituições participantes e dos resultados obtidos da literatura**

### **6.6.1. Questões relacionadas ao planejamento experimental**

Os dados oriundos deste estudo foram confrontados com resultados prévios da literatura (figura 13). Os pontos analisados nestas comparações foram em relação ao planejamento experimental, especificamente a respeito da aprovação prévia do protocolo experimental pelo comitê de ética, a realização de randomização dos animais, realização dos ensaios de forma cega e a realização do cálculo para determinar o tamanho da amostra experimental.

Anteriormente ao início de um ensaio é importante a aprovação do protocolo experimental pelo comitê de ética. Conforme observado por Baker et al. (2014), 99% dos trabalhos avaliados descreviam a aprovação do comitê de ética para o protocolo experimental utilizado. Neste contexto, os dados oriundos da resposta do questionário respondido pelos pesquisadores estão em consonância com os trabalhos publicados pelas universidades participantes, bem com dados da literatura, uma vez que, 87% dos pesquisadores afirmaram que realizam seus ensaios após aprovação do comitê de ética, da mesma maneira que o observado nos trabalhos publicados (93%).

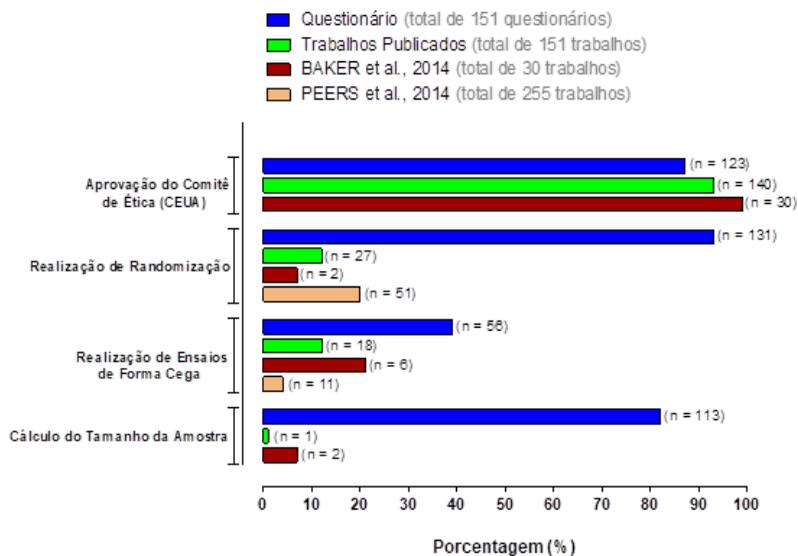
As diretrizes ARRIVE recomendam sobre a importância da randomização dos grupos experimentais, ou seja, que nas amostras estejam diluídos fatores intrínsecos que possam gerar vieses nos resultados. No estudo publicado por Baker et al. (2014), foi observado que 7% dos trabalhos publicados realizaram a randomização dos grupos experimentais, dados mais favoráveis foram observados por Peers et al. (2014), com 20% dos trabalhos realizando randomização. Assim como observado na literatura, apenas 18% dos trabalhos publicados pelas universidades brasileiras que fizeram parte da pesquisa, mencionaram realizar a randomização dos grupos experimentais. Por outro lado, 93% dos pesquisadores que responderam o questionário afirmaram utilizar a randomização para homogeneizar os grupos experimentais.

Nas diretrizes recomendadas pelo ARRIVE está descrito que, para os dados serem os mais fiéis a realidade, é fundamental quando possível a coleta de forma cega (KILKENNY et al., 2010). Segundo Peers et al. (2014), foi observado que 4% dos trabalhos realizam a coleta dos dados de forma cega. Ainda neste contexto, Baker et al. (2014),

observaram que 21% dos trabalhos utilizavam também a coleta dos resultados de forma cega. As informações quanto a realização dos ensaios de forma cega foi relatada em somente 39% dos questionários respondidos, enquanto que apenas 12% dos trabalhos publicados pelas instituições participantes descreveram esta informação.

O cálculo do tamanho da amostra deve ser suficiente para que se possa ser detectado diferença estatística entre os grupos quando o fenômeno é verdadeiro. Segundo dados da literatura, apenas 7% dos trabalhos publicados apresentaram e/ou informaram a realização do cálculo do tamanho da amostra experimental, o que poderia gerar resultados falso negativos ou falso positivos. De fato, o mesmo perfil foi observado nos trabalhos publicados pelas instituições brasileiras participantes da pesquisa, com apenas 1% dos artigos descrevendo a utilização do cálculo do tamanho da amostra. Ao contrário, 82% dos pesquisadores que responderam o questionário informaram que utilizam o cálculo do tamanho da amostra para determinar o número experimental em seus ensaios.

Figura 13. Comparação entre os resultados obtidos neste estudo com dados da literatura.



As perguntas descritas na figura foram formuladas tanto no questionário (azul), quanto nos trabalhos publicados pelas instituições

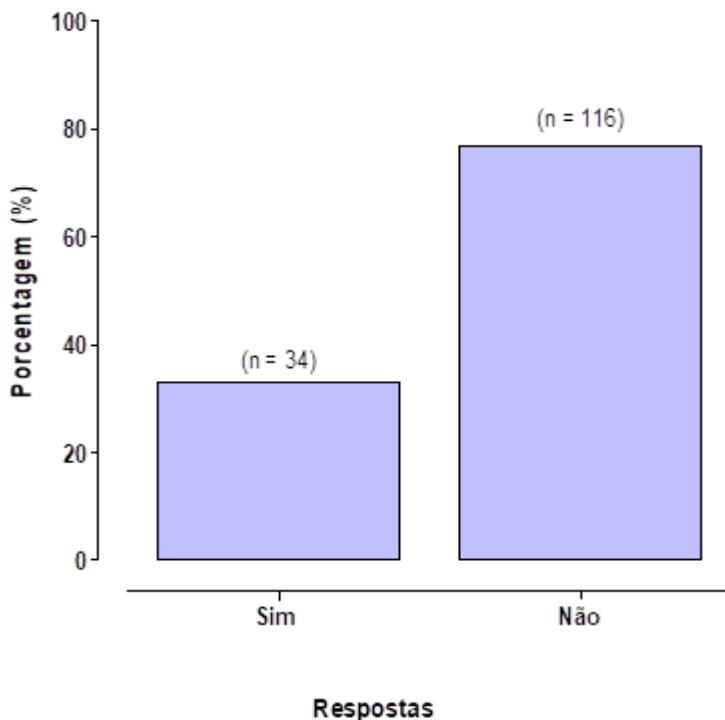
participantes da pesquisa (verde), e comparados aos dados previamente publicados por Baker et al. (2014) e Peers et al. (2014), em vermelho e bege, respectivamente. As questões propostas buscaram avaliar informações quanto ao planejamento experimental, como por exemplo, se os trabalhos foram previamente aprovados pelo comitê de ética da instituição, se os estudos foram desenvolvidos seguindo as diretrizes *ARRIVE*, se os ensaios foram realizados de forma cega, se foi realizado à randomização dos grupos experimentais e como foi estimado o tamanho da amostra. Os dados foram plotados como a porcentagem de respostas positivas obtidas para os parâmetros avaliados. Ao lado de cada barra está indicado o número total de questionários, de trabalhos publicados ou do número de estudos da literatura.

## **6.7. Avaliações de parcerias científicas entre instituições de pesquisa brasileiras e internacionais, bem como a influência do fator de impacto das revistas científicas nas descrições dos trabalhos publicados**

### **6.7.1. Questões relacionadas as colaborações científicas realizadas entre universidades e instituições brasileiras com centros de pesquisas internacionais**

A realização de possíveis parcerias internacionais foi avaliada nos trabalhos publicados pelos autores dos estudos não clínicos envolvendo animais de experimentação desenvolvidos no Brasil. Na Figura 14, pode ser observado que dos 150 trabalhos publicados por pesquisadores brasileiros nos últimos 4 anos, pelas mesmas universidades e ou instituições que participaram desta pesquisa, em apenas 33% deles foi observado algum tipo participação de centros de pesquisas internacionais.

Figura 14. Avaliação das colaborações internacionais dos trabalhos científicos brasileiros selecionados para este estudo.



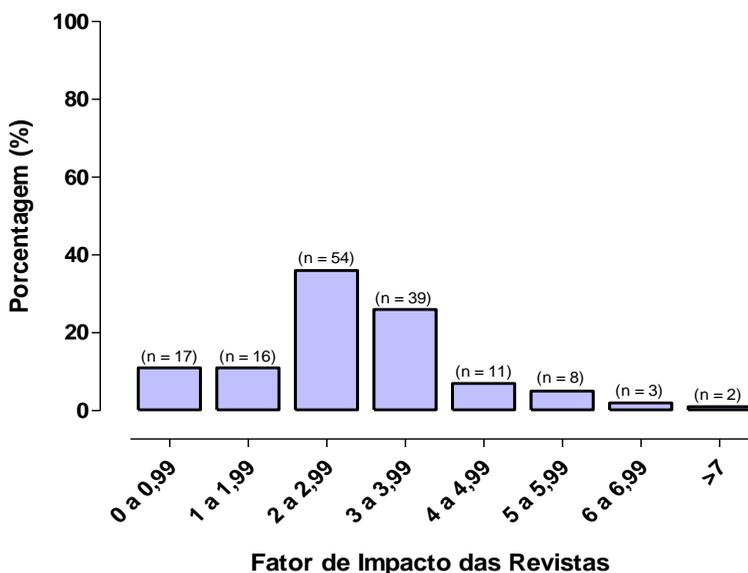
Avaliação da participação de entidades internacionais nos 150 trabalhos científicos brasileiros selecionados para este estudo. Acima de cada barra está indicado o número total de trabalhos que apresentavam participações internacionais (sim), ou que não possuíam a participação de entidade internacional (não).

### **6.8. Questões relacionadas ao fator de impacto das revistas científicas onde foram publicados os trabalhos selecionados das universidades e instituições de pesquisa participantes deste estudo**

Com o intuito de analisar se o fator de impacto das revistas científicas contribui com o grau de detalhamento das informações contidas nos trabalhos publicados, foi analisado em cada um dos 150 trabalhos publicados e selecionados aleatoriamente, o fator de impacto

dos periódicos onde estes estudos foram publicados. Conforme pode ser observado na figura 15, 1% dos trabalhos publicados por pesquisadores brasileiros apresentaram fator de impacto de 0 a 0,99; outros 11% de 1 a 1,99; 36% de 2 a 2,99; 26% de 3 a 3,99; 7% de 4 a 4,99; 5% de 5 a 5,99; 2% de 6 a 6,99 e 1% acima de 7. Sendo assim, a grande maioria dos trabalhos, cerca de 62%, foram publicados em revistas com o fator de impacto que varia entre 2 a 3,99, o que sugere que esse parâmetro não influenciou o grau de detalhamento e planejamento experimental dos trabalhos.

Figura 15. Avaliação do fator de impacto das revistas científicas as quais foram publicados os trabalhos selecionados para este estudo.



Os valores do fator de impacto das revistas científicas foram obtidos através da página eletrônica *Jornal Impact Fator*. Os dados dos valores de fatores de impacto foram divididos compreendendo as seguintes categorias: 0 a 0,99; 1 a 1,99; 2 a 2,99; 3 a 3,99; 4 a 4,99; 5 a 5,99; 6 a 6,99 e acima de 7. Acima de cada barra está indicado o número total de trabalhos por bloco de fator de impacto.



## 7. DISCUSSÃO

A evolução do conhecimento científico está diretamente associada às pesquisas científicas realizadas no decorrer da história da humanidade, sejam elas com resultados negativos ou positivos. De forma geral, esta evolução do conhecimento científico foi baseada em uma ciência bem planejada e executada, com incontáveis repetições de experimentos, registros adequados dos resultados obtidos e também pelos erros acumulados. Neste sentido, muito do que foi realizado ao longo do tempo por meio da ciência biomédica, como por exemplo a descoberta e síntese de substâncias químicas e o desenvolvimento de medicamentos capazes de melhorar a qualidade de vida ou aumentar a sobrevivência de pacientes, foram consolidados a partir de uma ciência robusta, transparente e confiável (BEGLEY; IOANNIDIS, 2015).

Ao longo da história humana ocorreram enfermidades catastróficas que dizimaram populações, as quais também permitiram a evolução no conhecimento e tratamento de doenças. No passado, a demanda pelo conhecimento aliada à necessidade, contava apenas, ou principalmente, pela experiência sensorial, também conhecida como empirismo. Embora os dados empíricos permeassem a ciência, há alguns relatos de experiências confirmadas através de comprovação científica desde o velho testamento (MASSUD FILHO, 2016). Com o passar dos anos, e em decorrência da evolução científica, as práticas empíricas um tanto questionáveis foram perdendo espaço pelos trabalhos realizados por cientistas como Louis Pasteur, Alexander Fleming, Robert Koch e Claude Bernad, entre outros, iniciando uma nova fase da ciência experimental, conhecida como revolução terapêutica (MASSUD FILHO, 2016).

A evolução no tratamento de doenças chegou a tal ponto que atualmente as pesquisas buscam evidenciar um fenômeno através de uma compilação de dados científicos realizados em sistemas *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* e utilizando animais de experimentação (*in vivo*). Para o desenvolvimento de um novo medicamento, por exemplo, além dos estudos de eficácia que são necessários à avaliação da atividade de uma substância sobre uma determinada doença, ensaios que confirmem a segurança são extremamente importantes e obrigatórios, sendo exigidos pelas agências regulatórias no âmbito da solicitação de aprovação para passar a ser utilizado pela primeira vez em humanos (ANDRADE et al., 2016). Tal importância dos estudos em animais que avaliam a toxicidade foi dada após episódios desastrosos com medicamentos que, ao

passarem a utilização humana sem os devidos ensaios de segurança, resultaram em prejuízos irreparáveis aos pacientes.

Mais recentemente, tem sido observada a ocorrência de uma baixa correlação entre estudos não clínicos realizados em animais de experimentação com os resultados observados em estudos clínicos (KILKENNY et al., 2010; MCGRATH; LILLEY, 2015). Na contramão de uma ciência séria e efetiva, o caminho que conecta o processo de geração de conhecimento e transformação deste conhecimento em um produto, o qual possa de alguma forma beneficiar a sociedade, é um dos grandes gargalos ao avanço da pesquisa translacional (BENDER, 2016). De fato, a falta de critérios para o planejamento e a execução de estudos não clínicos tem sido extremamente nociva para o desenvolvimento de novos medicamentos (MASSUD FILHO, 2016).

A execução, divulgação e perpetuação de estudos que utilizam animais e que apresentam falhas primárias, são algumas das razões pelas quais a ciência desenvolvida nos últimos anos, tanto no âmbito acadêmico, quanto nas indústrias, vêm sendo criticada no que tange a qualidade, confiabilidade e robustez dos estudos (KILKENNY et al., 2013). De fato, após ser realizada uma análise de trabalhos científicos publicados em periódicos internacionais de elevado padrão científico e que utilizaram animais nos experimentos, Kilkenny e colaboradores (2009) observaram que problemas relacionados com o planejamento experimental, incluindo: i) cálculo do tamanho da amostra, ii) qualidade sanitária dos animais, iii) realização de experimentos de forma cega, iv) análise estatística dos dados, entre outros aspectos, podem ser os responsáveis pela falta de reprodutibilidade dos estudos.

A transparência nas informações disponibilizadas em um trabalho científico é, sem dúvida, fundamental para que os resultados de artigo publicado possa ser reproduzido na íntegra por pesquisadores independentes (ENSERINK, 2017). Assim, artigos científicos publicado em boas revistas internacionais onde os diversos fatores descritos acima não foram descritos com clareza, impossibilita a reprodução dos resultados obtidos (GLASZIOU et al., 2014). Além disso, só é possível aos revisores de revistas científicas realizarem uma avaliação adequada dos trabalhos submetidos a publicação se, todas essas informações estiverem descritas claramente na metodologia e nos resultados do estudo. Neste sentido, um planejamento experimental bem feito e descrito com clareza torna-se vital para permitir a reprodutibilidade e confiabilidade científica, independente da revista onde o artigo foi publicado (KILKENNY et al., 2009).

A deficiência na translação de estudos não clínicos para os estudos clínicos, compromete um longo e complexo processo científico. De fato, estudos demonstram que apenas 1/3 dos trabalhos envolvendo animais, publicados nas sete principais revistas científicas mundiais, foram posteriormente aprovados por órgãos reguladores para serem comercializados (MONNIER et al., 2013). A crise na reprodutibilidade de resultados de estudos com o uso de animais reportada por grande parte da comunidade científica vem do fato de que, independente da qualidade da revista científica onde o artigo foi publicado, a grande maioria dos trabalhos analisados, de certa forma, apresentaram falhas importantes que comprometeram a comprovação dos resultados em estudos clínicos (CHAN et al., 2014).

O planejamento experimental mal elaborado, associado com inadequada condução experimental, são os principais fatores que dificultam o processo de translação de estudos em animais para humanos (LLOVERA; LIESZ, 2016). De fato, a maneira com a qual as pesquisas são realizadas, o motivo e a velocidade com que elas são divulgadas, está associado em parte a pressão por publicações (BESPALOV et al., 2016), aos critérios exigidos para o financiamento das pesquisas, as ambições em progressões de carreira científica, as disponibilidades de bolsas de pesquisa e a falta de capacitação dos pesquisadores, podendo ser alguns dos fatores determinantes para a qualidade do estudo (EDWARDS; ROY, 2016). Além disso, tem sido observado preocupação excessiva por parte dos pesquisadores pelo número de publicações científicas, em detrimento da qualidade das mesmas, o que vem sendo facilitado pela existência e disponibilidade de muitas revistas predatórias. Estas cobram em dinheiro pela publicação de trabalhos científicos, e quase sempre, sem o mínimo de avaliação ético-científico por parte dos revisores e editores destes periódicos, reduzindo assim a qualidade e a confiabilidade dos artigos por elas publicados (RENNIE, 2016; SHEN; BJÖRK, 2015). Esse fato, aliado a formação científica deficiente de muitos pesquisadores, dificulta a reprodutibilidade dos trabalhos científicos, e conseqüentemente contribui para o insucesso das translações clínicas (CONSENSUS et al., 2011; EVERITT, 2015).

Outros fatores intrínsecos ao trabalho podem contribuir para a dificuldade de reprodução e na translação dos dados para humanos. De fato, o desconhecimento das ferramentas necessárias para minimizar o viés na pesquisa, como por exemplo: i) a descrição do cálculo do tamanho amostral, ii) randomização dos grupos experimentais, iii) realização de experimentos de forma cega, iv) a garantia da qualidade

dos animais utilizados nos estudos, etc. são fatores que podem contribuir para a irreprodutibilidade do estudo (HACKAM; REDELMEIER, 2006; VASILEVSKY et al., 2013).

Com o intuito de minimizar tais discrepâncias entre os dados observados nos estudos não clínicos que utilizam animais, em 2009 o Centro Nacional para Substituição, Refinamento e Redução de animais em pesquisa (*NC3R*) formulou um guia, para que os pesquisadores pudessem se basear por ocasião do planejamento experimental, na execução de um ensaio com animais e, por fim, na divulgação dos dados. Este guia foi denominado de *ARRIVE*, e descreve em seus 20 tópicos, informações cruciais para o desenvolvimento de ensaios não clínicos mais robustos, rastreáveis e reprodutíveis (KILKENNY et al., 2010).

Na última década observou-se um crescimento expressivo da produção científica brasileira publicada em periódicos internacionais. Atualmente, o Brasil se encontra entre os 15 países que mais publicam trabalhos científicos em periódicos internacionais, sendo que a maioria destas publicações utilizam animais de experimentação (GUIMARAES, 2004). Neste sentido, a forma pela qual avaliou-se a qualidade dos estudos não clínicos *in vivo* desenvolvidos no país, foi a partir das descrições científicas contidas nos questionários aplicados aos pós-graduandos, e através da seleção aleatória dos trabalhos publicados em periódicos nacionais e internacionais por pesquisadores brasileiros. Desta forma, ao ser analisado a utilização das diretrizes *ARRIVE* nos estudos, foi observado que a maioria dos pesquisadores utilizam ou tem conhecimento das diretrizes *ARRIVE* no momento do planejamento ou na execução dos estudos. Por outro lado, ao ser avaliado a utilização das diretrizes *ARRIVE* nos artigos científicos publicados pelas instituições avaliadas, constatou-se que apenas 4% destes artigos mencionaram a utilização desse guia nos ensaios. Este dado aparentemente bastante discrepante corrobora com avaliações semelhantes realizadas por órgãos como *NC3Rs*, *NIH*, *FDA*, *OECD*, assim como por revistas científicas renomadas, como o grupo *Nature*, *Science*, *BJP* (*British Journal of Pharmacology*), *Plos One*, onde foi observado que uma ínfima quantidade de trabalhos publicados realmente utiliza o *ARRIVE* como um guia para o planejamento e a condução de estudos não clínicos com animais de experimentação. De fato, ainda há pouca adesão das diretrizes *ARRIVE* por parte dos pesquisadores, revisores e editores de revistas científicas (BAKER et al., 2014).

Ainda em relação às diretrizes *ARRIVE*, um bom planejamento experimental contempla distintas ações que almejam reduzir o viés de

ensaios com animais de experimentação (KILKENNY et al., 2010). O planejamento adequado de um experimento corrobora com a ideia da redução, refinamento e substituição de animais em pesquisa, descritos por Russel e Burch's na década de 1959, no livro princípios da Técnica Experimental Humana (do inglês, *The Principles of Humane Experimental Technique*). Estes princípios contribuem até hoje para a realização humanizada e consciente de experimentos envolvendo animais de experimentação (TANNENBAUM; BENNETT, 2015).

No que tange a utilização de animais na pesquisa científica nas áreas biomédicas, uma das primeiras atitudes a ser tomada é a aprovação prévia dos protocolos experimentais por uma Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUAs) de universidades ou instituições de pesquisa. Segundo as diretrizes *ARRIVE*, é fundamental indicar em trabalhos publicados o número do protocolo experimental de aprovação, além dos conselhos de ética que avaliaram o protocolo (KILKENNY et al., 2010). Estes dados são importantes, pois informações descritas no projeto de pesquisa sobre a condução dos ensaios com animais de experimentação poderão ser frequentemente fiscalizadas pelas comissões de ética das instituições. Além disso, o pesquisador responsável pelo estudo poderá ser monitorado, e caso conduza o estudo de forma antiética, o mesmo poderá ser penalizado (CONCEA, 2015). Neste sentido, quase que a totalidade dos pesquisadores brasileiros analisados no presente estudo afirmaram realizar os estudos somente após aprovação do protocolo pela comissão de ética. Em um trabalho realizado por Baker e colaboradores (2014), foi observado um perfil semelhante, sendo descrito que 99% das publicações descreviam a aprovação do estudo por parte de uma comissão de ética. De fato, foi observado que quase a totalidade dos trabalhos publicados pelas instituições que participaram desta pesquisa realizaram o estudo somente após a aprovação do protocolo pelo CEUA. Sendo assim, parece que a falta de reprodutibilidade nos ensaios realizados não está relacionada diretamente a aprovação do protocolo pelos respectivos comitês de ética em pesquisa animal. No entanto, não há certeza se o que é descrito nos protocolos enviados a comissão de ética das instituições de pesquisa, realmente são cumpridos pelos autores dos trabalhos científicos publicados.

Outro fator relevante para a realização dos estudos não clínicos *in vivo*, é a definição do número de animais por grupo experimental, a partir do cálculo do tamanho da amostra. Neste sentido, foi observado que 82% dos pesquisadores avaliados através de questionário, afirmaram utilizar o cálculo do tamanho da amostra para definir o número experimental. No entanto, apenas em 1% dos trabalhos

publicados foi observado tal descrição. Estudo semelhante realizado por Baker e colaboradores (2014), demonstrou que apenas 7% dos artigos publicados e avaliados no estudo descreveram a utilização do cálculo do tamanho da amostra. A definição do tamanho da amostra é importante, pois poucos animais por grupo experimental podem gerar resultados controversos, e portanto, sem validade estatística. Por outro lado, utilizar um número excessivo de animais vai em desacordo aos princípios de redução, refinamento e substituição de animais em pesquisa (MCGRATH; CURTIS, 2015).

A maneira com a qual é estimado o cálculo do tamanho da amostra é variável entre os participantes que responderam o questionário. Cerca de 82% dos pesquisadores informaram que realizam o cálculo do tamanho da amostra através de dados oriundos de experimentos semelhantes encontrados na literatura, enquanto que, 64% informaram que realizam através de cálculos matemáticos utilizando média e desvio padrão de estudos piloto. De acordo com estes resultados, foi observado que os pesquisadores preferem iniciar os ensaios a partir do número de amostra baseados em trabalhos publicados semelhantes aos que serão por eles desenvolvidos. Porém, de acordo com Hooijmans e colaboradores (2010), por mais que os trabalhos tenham similaridade, um bom planejamento experimental inclui realizar o cálculo do tamanho da amostra, através de dados oriundos do próprio laboratório.

Para que seja realizado o cálculo do tamanho da amostra primeiramente é necessário conhecer a variação experimental que é baseada na média e no desvio padrão de uma amostra teste. Quando os dados de variação não estão disponíveis na literatura, é necessário que seja realizado um experimento piloto que mimetize o ensaio, para que seja definido os parâmetros de média e desvio padrão da amostra para, posteriormente, ser calculado através de fórmulas matemáticas a melhor quantidade de animais por grupo experimental (FESTING; ALTMAN, 2002). Portanto, o número de animais por grupo deve ser definido antes do início dos ensaios, assim como é primordial sua descrição nos trabalhos, juntamente com a maneira pela qual o pesquisador realizou o cálculo do tamanho da amostra (EISEN; GANLEY; MACCALLUM, 2014).

O conhecimento do tamanho da amostra é apenas uma das premissas necessárias para a realização de um ensaio robusto. Outro fator importante e preconizado pelo guia *ARRIVE* é a realização da randomização, ou separação aleatória dos animais nos diversos grupos experimentais (KILKENNY et al., 2010). A randomização dos animais

em grupos experimentais ajuda a homogeneizar variações conhecidas e desconhecidas que podem enviesar os resultados do estudo. Por exemplo, os animais utilizados nos estudos podem apresentar infecções subclínicas imperceptíveis aos olhos do pesquisador, as quais podem prejudicar a interpretação dos resultados do estudo caso o pesquisador não utilize critérios de randomização (BEBARTA; LUYTEN; HEARD, 2003). Segundo as diretrizes *ARRIVE* e o guia *GSPC*, além de realizar a randomização, os pesquisadores deveriam informar a forma utilizada para realizar a randomização, a fim de facilitar equipes independentes no processo de reprodutibilidade dos ensaios. (HOOIJMANS; LEENAARS; RITSKES-HOITINGA, 2010; KILKENNY et al., 2010). Sendo assim, quase que a totalidade (93%) dos pós-graduandos afirmou realizar a randomização no ato da separação dos grupos experimentais. Por outro lado, dados da literatura tem demonstrado que apenas 7% a 20% das publicações descrevem a realização de randomização (BAKER et al., 2014; PEERS et al., 2014). Corroborando com os resultados observados por Baker e colaboradores (2014) e por Peers e colaboradores (2014), foi constatado que apenas 18% das publicações realizadas pelos pesquisadores brasileiros informaram a realização da randomização dos grupos experimentais nos artigos publicados.

Através de uma análise realizada em 7.249 trabalhos científicos envolvendo um total de 121.784 animais, utilizados como modelos experimentais para AVE (Acidente Vascular Encefálico), pôde ser observado que nos ensaios onde houve a randomização dos grupos experimentais, foram encontrados resultados com menor efeito quando comparados aos ensaios que não foram utilizados processos de randomização (HIRST et al., 2014). De fato, a incapacidade de randomizar provavelmente resultará em uma superestimação dos benefícios aparentes do tratamento das intervenções em uma série de doenças e medidas de resultado (HIRST et al., 2014). Além disso, Schulz e colaboradores (1995) observaram que a razão de possibilidades, que é definida como a razão entre a chance de um evento ocorrer em um grupo e a chance de ocorrer em outro grupo, foram exagerados em 30% nos testes sem randomização (SCHULZ et al., 1995). De fato, muitas pesquisas têm confirmado que resultados realizados após a separação dos grupos por randomização reduzem consideravelmente os vieses dos ensaios (ODGAARD-JENSEN et al., 2011; SAVOVIĆ et al., 2012). Para entender a magnitude de resultados oriundos de ensaios com vieses, foi observado que 503 candidatos a medicamentos para uso no tratamento de AVE, que apresentaram eficácia em modelos animais, apenas um (ativador de plasminogênio

tecidual) se mostrou suficientemente eficaz em humanos (MACLEOD et al., 2010).

Além da realização e descrição da randomização, outra conduta importante a ser inserida em um planejamento experimental de um estudo não clínico envolvendo animais de experimentação, é a realização dos ensaios experimentais de forma cega (BEBARTA; LUYTEN; HEARD, 2003). Assim, na execução e na coleta de dados de um estudo *in vivo* é importante manter a isenção de expectativas. Esse fato pode ser evitado com a realização do ensaio de maneira cega. Segundo os critérios estabelecidos pelo *ARRIVE*, para que os resultados obtidos sejam os mais fiéis à realidade do fenômeno, é fundamental quando possível, que as administrações de substâncias e a coleta de dados sejam realizadas de forma cega, isto é, quem realiza os experimentos não tem conhecimento dos tratamentos realizados nos animais nem do que está sendo coletado (KILKENNY et al., 2010).

Através dos dados oriundos do questionário, foi observado que 39% dos pesquisadores afirmaram realizar os estudos de forma cega, seja na administração das substâncias, quanto na avaliação do experimento. De forma contraditória, foi constatado que apenas 12% das publicações realizadas pelos pesquisadores brasileiros informam a realização dos estudos de forma cega, o que vai de encontro aos dados observados por Baker e colaboradores (2014) e por Peers e colaboradores (2014), que constataram que apenas 21% e 4%, respectivamente, utilizaram a avaliação cega como um princípio de análise dos dados.

A importância da realização de estudos cegos foi descrita por Bebarta e colaboradores (2003), onde foi observado que a não realização de estudos de forma cega aumenta a probabilidade de se obter resultados esperados, quando comparados com experimentos cegos, o que pode comprometer substancialmente a confiabilidade do estudo. Em um estudo recente foi observado que apenas um em cada cinco experimentos com animais usaram avaliações de resultados de forma cega (MACLEOD, 2014). Além disso, foi observado grande diferença no tamanho do efeito entre estudos que avaliaram os resultados de forma cega e os que não o fizeram (HIRST et al., 2014), o que poderia superestimar um efeito desejado pelo experimentador.

A translação de um ensaio em animais para humanos é um dos pontos críticos para as falhas nos ensaios clínicos, sendo assim, a validação de um ensaio com animais é importante para que a probabilidade de translação seja maior (EISEN; GANLEY; MACCALLUM, 2014). Para realizar a validação de um ensaio é

fundamental a utilização de um grupo denominado de controle negativo (placebo), que tem o objetivo de garantir que uma variável desconhecida não afete negativamente os animais no experimento, o que pode resultar em uma conclusão falso-positiva. Da mesma forma, um controle denominado de controle positivo, deve ser usado para garantir que os protocolos experimentais sejam realmente capazes de detectar um efeito (BEGLEY; IOANNIDIS, 2015). Além disso, pode ser utilizado um controle comparativo (medicamento já utilizado em pacientes), para avaliar se um novo tratamento é mais ou menos eficaz do que está disponível no mercado (HOCHMAN et al., 2005). Neste contexto, foi observado que o relato de grupos controles negativos nos experimentos dos pesquisadores brasileiros, foi em torno de 55%. Como mencionado acima, a utilização de grupos controles negativos e positivos em experimentos *in vivo* para fins comparativos, se torna indispensável, pois ensaios sem grupos controles, podem gerar resultados falsos-positivos.

Considerando o tamanho de um estudo que diz respeito a quantidade de animais utilizada, os grupos experimentais e a duração do ensaio, em alguns casos se fazem necessários a realização do experimento em etapas ou replicatas. Assim, todas as etapas do estudo devem ser descritas no trabalho, de forma detalhada, para que os ensaios sejam reproduzidos. Além disso, em todas as etapas, os grupos de um estudo com finalidade comparativa (controles), deverão estar presentes, para que sejam expostos aos mesmos tipos de variações ambientais, sob a manipulação dos mesmos experimentadores, e utilizando as mesmas substâncias e diluentes (PRESCOTT; LIDSTER, 2017). Através do questionário pôde-se observar que 70% dos pesquisadores brasileiros afirmaram realizar os estudos em etapas e em todas elas utilizaram os grupos controles. Por outro lado, ao ser avaliado os trabalhos publicados, apenas 21% artigos descreviam tais informações. Esse fato certamente pode comprometer a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados obtidos nesses estudos.

Com relação à publicação de resultados científicos, tem sido amplamente discutido entre a comunidade científica, a importância da divulgação dos resultados “negativos” obtidos nas pesquisas. As hipóteses não confirmadas são muito menos propensas a serem divulgados na literatura, com isso, estes resultados são efetivamente perdidos para ciência, gerando assim um alto desperdício financeiro, de animais e de tempo dedicado em pesquisa. Além disso, a publicação de resultados “negativos” é considerada por muitos autores, menos atrativa, de baixa visibilidade, menos propensos a abrir novas vias de pesquisa e

com isso menos oportunidades de financiamentos de projetos científicos (ECNP NEUROSCIENCE OPPLIED, 2017).

Outras informações também relevantes para que seja possível a reprodutibilidade do estudo, é conhecimento a respeito da espécie e da linhagem animal utilizada, assim como a qualidade sanitária dos animais. Assim, parâmetros como a procedência das matrizes dos animais utilizados no estudo, a forma ou a maneira que é realizado o cruzamento das matrizes e os critérios de acasalamento dos animais, são informações importantes para que se tenha a rastreabilidade dos animais, e assim saber se foram mantidas suas características originais (HOOIJMANS; LEENAARS; RITSKES-HOITINGA, 2010; MOGIL; MACLEOD, 2017).

Ao ser avaliado a descrição e o conhecimento acerca das espécies e linhagens dos animais utilizadas nos estudos, cerca de 92% dos pesquisadores brasileiros e 99% dos trabalhos publicados descreviam tais informações. De fato, segundo Damy e colaboradores (2010), a escolha da espécie animal utilizada nos estudos como modelo de doenças humanas, deve conter similaridade biológica, anatômicas e fisiológicas ao observado na clínica. Os guias internacionais para avaliação de toxicidade oriundos da *OECD* e *ICH* (do inglês, *International Conference on Harmonization*) descrevem a importância da escolha da espécie animal mais relevante para que os ensaios de segurança sejam os mais fiéis possíveis ao que possivelmente ocorrerá em humanos quando expostos à mesma substância. Da mesma forma, é importante que seja descrita a linhagem dos animais utilizados nos ensaios, pois existem dezenas de linhagens de camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus*), coelhos, macacos, cobaias, etc. Como por exemplo, se a linhagem utilizada no estudo é heterogênica (*outbred*) ou isogênica (*inbred*). É conhecido que animais isogênicos geralmente são mais uniformes fenotípicamente do que os não isogênicos (*outbred*), e experimentos que utilizam animais *inbred* são mais fáceis de detectar pequenas respostas nos ensaios (FESTING, 1999). Além disso, outras características são importantes, como recombinações, mutagêneses e transgênese de animais. Portanto, tais informações são necessárias em um estudo científico para que haja o entendimento e a possibilidade de reprodução do estudo (DAMY, 2010).

Embora a descrição das espécies e das linhagens sejam importantes para a confiabilidade e a reprodução dos ensaios, a qualidade sanitária dos animais tem influência direta nos estudos. Neste sentido, os animais livres de patógenos especificados ou *SPF* (do inglês, *Specific Pathogen Free*), são desprovidos de determinados patógenos

que podem levar a algum tipo de doença. Os animais *SPF* são criados e alojados necessariamente em ambientes de alto controle sanitário, sendo portanto, os animais mais indicados para o desenvolvimento de pesquisa não clínica pela sua alta qualidade higiênica (BAR HARBOR, 2016). Por outro lado, animais convencionais, os quais são criados em condições de menor rigor sanitário são mais susceptíveis a microrganismos patogênicos que podem comprometer os resultados dos estudos, e assim a reprodutibilidade dos ensaios (DAMY, 2010).

Através dos dados oriundos do questionário, foi observado que 37% dos pesquisadores afirmaram utilizar animais *SPF* em seus experimentos. Ao contrário, foi constatado que apenas 3% das publicações realizadas pelos pesquisadores brasileiros informaram utilizar animais *SPF*. As agências internacionais como *OCDE*, *ICH*, *FDA*, etc. preconizam a utilização de animais *SPF* nos estudos não clínicos visando evitar interferência de patógenos nos resultados dos estudos.

O entendimento por parte dos pesquisadores sobre a importância da qualidade sanitária dos animais utilizados nos estudos, assim como a divulgação destas informações nas descrições dos trabalhos científicos, é um requisito fundamental para o processo de desenvolvimento científico com animais de experimentação. Há diversos fatores relacionados à criação dos animais utilizados em ensaios não clínicos que podem alterar o comportamento natural, e conseqüentemente comprometer a análise dos dados gerados nos estudos (DAMY, 2010). Segundo as diretrizes *ARRIVE*, é fundamental relatar o tipo de maravalha, higienização periódica das gaiolas, o material de nidificação, o número de animais por gaiola, enriquecimento ambiental, ciclos de luz claro e escuro, temperatura, umidade, qualidade e acesso a água e comida (KILKENNY et al., 2010). Em relação ao tipo de maravalha utilizada para a acomodação e nidificação dos animais, é importante notar que alguns materiais podem conter irritantes químicos e podem causar alguma alteração nos animais, como por exemplo o carolo de milho, que pode promover a inibição da sinalização hormonal de estrogênio. Este hormônio está relacionado a homeostase do organismo, ou seja, ao equilíbrio fisiológico e metabólico, principalmente em ratos e camundongos fêmeas (DAMY, 2010). Além disso, alguns tipos de maravalha podem conter substâncias químicas como óleos essenciais, inseticidas ou fungicidas, que podem promover a alteração na atividade de algumas enzimas hepáticas responsáveis pelo metabolismo de drogas (SERVICK, 2016). Além disso, um estudo mostrou que nas gaiolas que foram utilizados a maravalha do tipo

Aspen, houve maior incidência de doenças respiratórias nos animais quando comparado com as gaiolas onde o tipo de material utilizado foi apenas papel (DAMY, 2010). Portanto, é nítida a importância dos cuidados com os animais quanto ao tipo e a qualidade do material utilizado como nidificação.

A limpeza e a higienização das gaiolas devem fazer parte de uma rotina do laboratório, e suas negligências podem resultar em problemas de saúde para os animais e conseqüentemente gerar resultados inconclusivos ou inconsistentes. De fato, a falta de periodicidade de higienização das gaiolas pode comprometer a saúde dos animais, e com isso os resultados dos ensaios experimentais (DAMY, 2010). Em um estudo realizado por Burn e colaboradores (2006), foi observado que a periodicidade da higienização das gaiolas dos animais diminui a concentração de amônia, e conseqüentemente a irritabilidade e o estresse provocado nos animais. Em relação a higienização das gaiolas, foi observado através do questionário que 80% dos pesquisadores brasileiros relataram tais informações, enquanto que apenas 1% dos trabalhos publicados descreveram na íntegra tal informação. Como descrito anteriormente, uma das conseqüências de intervalos prolongados da limpeza das gaiolas é o acúmulo de amônia. A taxa de produção de amônia é influenciada também pela temperatura, umidade, tipo de cama e quantidade de animais por gaiola (GAMBLE; CLOUGH, 1976; SCHAERDEL et al., 1983). A exposição à amônia tem sido implicada em muitas doenças em roedores, incluindo mucosa traqueal espessada e opacidades da córnea, e pode interagir sinergicamente com patógenos como *Mycoplasma* e *Bordatella*, causando doenças nos animais (SCHAERDEL et al., 1983; VAN WINKLE; BALK, 1986).

Ainda com relação ao local de manutenção dos animais, o enriquecimento ambiental é outro fator importante, pois fornece elementos para os animais interagirem, como tubos que servem de refúgio, ninhos, roldanas, pedaços de madeiras, brinquedos, entre outros. Estes acessórios são fundamentais, pois promovem o bem-estar físico e evitam o estresse, facilitando as necessidades espécie-específica dos roedores, e conseqüentemente, a diminuição do estresse e da agressividade dos animais utilizados nos ensaios (DAMY, 2010). A utilização de enriquecimento ambiental parece ser utilizada por 48% dos pesquisadores brasileiros que responderam o questionário. Porém, em somente 1% dos trabalhos publicados pelas universidades e instituições brasileiras avaliadas mencionaram esse cuidado com os animais. Fica portanto, bastante claro uma marcante discrepância entre as informações

fornecidas através dos questionários com aquelas existentes nos artigos científicos publicado pelos pesquisadores brasileiros.

Em um estudo conduzido por Meijer e colaboradores (2007), foi avaliado o nível de estresse de roedores através da análise da frequência cardíaca, temperatura e concentrações plasmáticas de corticosterona. De fato, os níveis de corticosterona têm sido amplamente utilizados como um parâmetro fisiológico que reflete a saúde e o bem-estar dos animais e são usados para medir as reações às rotinas de criação padrão (GODFREY; SILVERMAN, 2009; MÖSTL; PALME, 2002). Assim, ao ser analisado o comportamento de animais alojados em gaiolas com ambiente enriquecido e sem ambiente enriquecido, foi observada menor resposta ao estresse em animais alojados em gaiolas contendo enriquecimento ambiental. É importante salientar que animais agressivos e estressados comprometem seriamente a interpretação dos resultados e a validade do estudo científico (MEIJER et al., 2007). Além dos fatores estressores acima mencionados, outros parâmetros como ruído, umidade, luminosidade e temperatura da sala podem gerar desconforto aos animais e comprometer os resultados. De acordo com Damy e colaboradores (2010), as condições ambientais do biotério de criação e manutenção dos animais devem conter procedimentos padronizados referentes a luminosidade, temperatura e umidade, pois, alterações nestes parâmetros podem acarretar uma série de complicações na atividade hemodinâmica e comportamental, refletindo diretamente nos resultados experimentais obtidos.

As diretrizes atuais indicam que a umidade relativa do microambiente para roedores deve permanecer dentro de 45% a 55% (OECD, 2014). A exposição a grandes variações de temperatura e umidade ou extremos pode resultar em alterações comportamentais, fisiológicas e morfológicas, o que pode afetar negativamente o bem-estar dos animais e o desempenho da pesquisa, bem como os resultados gerados (GARRARD; HARRISON; WEINER, 1974). A umidade abaixo de 40%, pode ocasionar a diminuição do fluxo sanguíneo periférico, e em alguns casos, até a necrose tecidual (DAMY, 2010; GASKILL; GARNER, 2017). Em camundongos, tanto baixa quanto alta umidade podem aumentar a mortalidade de neonatos (CLOUGH, 1982). Em ratos, a baixa umidade relativa, especialmente em combinação com temperaturas extremas, pode levar à necrose isquêmica da cauda (DAMY, 2010).

Segundo os guias internacionais para a manutenção de animais de experimentação, deve-se mantê-los em ambientes com ciclos periódicos de luminosidade e ciclos de escuridão (OECD, 2014).

Através da análise dos dados oriundos do questionário ou da pesquisa dos trabalhos publicados pelos pesquisadores brasileiros, pôde-se verificar que em ambos os grupos de análise foi constatado conhecimento da maioria a respeito da importância do controle de iluminação para os animais. De fato, a iluminação pode afetar a fisiologia, a morfologia e o comportamento de animais de experimentação (AZAR; SHARP; LAWSON, 2008). Em geral, a iluminação deve ser difundida em toda a área em que os animais estão alocados, em intensidade adequada, para proporcionar o bem-estar e evitar possíveis alterações fisiológicas (PRESCOTT; LIDSTER, 2017). Em um estudo realizado recentemente foi observado que os animais alojados nos biotérios na parte superior das prateleiras, são mais propícios a desenvolverem degeneração de retina devido a intensidade da luz, em comparação aos animais alojados na parte inferior. No entanto, animais alojados na parte inferior das prateleiras são mais propícios e desenvolverem alguns tipos de tumores e doenças respiratórias (SERVICK, 2016). A luminosidade do biotério influencia o sistema hipotalâmico-pituitário através da estimulação do nervo óptico, levando a estimulação e secreção hormonal para várias atividades regulatórias do organismo dos animais. Além disso, o ritmo circadiano pode influenciar a atividade imunológica dos roedores, desta forma, ratos e camundongos podem apresentar perfis de respostas inflamatórias distintas no período diurno e noturno, o que compromete a análise dos experimentos (SERVICK, 2016).

Segundo os critérios estabelecidos pelo *ARRIVE*, o controle da temperatura onde os animais estão alojados é crítico para a manutenção do ciclo circadiano, integridade e bem-estar dos animais (KILKENNY et al., 2013). Os mamíferos possuem a chamada zona termoneutra, que é a faixa de temperatura onde há termoregulação corporal sem a necessidade de aumentar a produção de calor corporal ou acionar mecanismos de evaporação para a perda de calor (KANOSUE et al., 2010). Segundo Gordon (1993), a faixa termoneutra para camundongos pode variar entre 26 °C e 34 °C e para ratos de 26 °C a 30 °C. As temperaturas abaixo da faixa termoneutra requerem materiais nas gaiolas para que os animais possam produzir ninhinhos para manter-se confortáveis (GORDON, 1993). Além disso, foi observado que variações na temperatura do biotério podem comprometer a perfusão de sangue para os órgãos e prejudicar a atividade enzimática do fígado, além de deixar os animais propensos ao desenvolvimento de doenças respiratórias e tumores (DAMY, 2010).

Através da análise dos dados oriundos do questionário ou da pesquisa dos trabalhos publicados pelas equipes brasileiras, pôde-se verificar que em ambos os grupos o conhecimento e o controle a respeito da temperatura da sala de manutenção dos animais são realizados por mais de 70% dos pesquisadores. Embora o conhecimento a respeito do controle de temperatura esteja elevado, não foi possível verificar se a temperatura das salas de manutenção ou biotérios são ajustadas automaticamente no decorrer do dia. Este ponto é importante, uma vez que camundongos têm preferência por temperaturas abaixo da termoneutra nos períodos onde está em repouso, enquanto que preferem temperaturas mais elevadas no período onde está em atividade (GORDON, 2004; GORDON; BECKER; ALI, 1998).

A qualidade da colônia depende também do conhecimento dos bioteristas e pesquisadores em relação a água e ração ofertada aos animais. Em um estudo recente, foi observado que algumas rações podem conter a presença de hormônios como o estrógeno, entre outros, que comprometem a atividade cardiovascular, respiratória, do sistema nervo central, e a atividade hepática, e com isso podem comprometer os resultados de experimentos realizados com estes animais (ROGERS et al., 2014). Neste contexto, algumas dietas podem conter ingredientes de origem vegetal ou animal, com substâncias ativas, como por exemplo as micotoxinas, pesticidas, metais pesados, entre outras, que prejudicam seriamente a saúde dos animais (DAMY, 2010). Além disso, a quantidade de ração fornecida aos animais deve ser padronizada em porções, de forma a não prejudicar a saúde dos animais.

O fornecimento de ração em grandes quantidades e sem controle (*ad libitum*), somado a baixa atividade física dos animais, contribuem para o desenvolvimento de obesidade, diabetes do tipo 2, hipertensão, entre outras doenças metabólicas. Estas doenças podem consequentemente prejudicar o desenvolvimento de estudos *in vivo*, onde são utilizados modelos experimentais para mimetizar doenças metabólicas (MARTIN et al., 2010). Assim, questões importantes relacionadas à qualidade da ração e da água oferecida aos animais nos biotérios brasileiros também foram avaliadas. Primeiro, foi verificado a realização da esterilização da ração anteriormente a reposição aos animais. A esterilização é um processo importante, pois elimina muitos patógenos que podem eventualmente estar presentes na ração, uma vez que estas ficam estocadas por um período de tempo em ambientes não estéreis, podendo desenvolver patógenos e apresentarem em sua composição, bactérias e fungos (SERVICK, 2016). Neste sentido, nenhum trabalho publicado pelos pesquisadores brasileiros informou

sobre a esterilização da ração ou da água ofertada aos animais, enquanto que 53% dos pós-graduandos haviam informado realizar tais procedimentos. Além da esterilização, o conhecimento a respeito da composição da ração também é importante, uma vez que substâncias farmacologicamente ativas podem estar presentes na formulação das rações. Apenas 3% dos trabalhos publicados avaliados afirmaram verificar a composição da ração utilizada, enquanto que 39% dos pesquisadores informaram realizar tal procedimento. Novamente, pôde ser constatada discrepância importante entre as informações contidas nos questionários e aquelas descritas nos artigos científicos publicados. O conhecimento a respeito da composição da ração é importante, pois a microbiota intestinal residente nos animais pode sofrer mudanças substanciais conforme a formulação das rações consumida (ROGERS et al., 2014). Segundo Servick (2016), a microbiota influencia a resposta fisiológica dos animais na formação e reabsorção óssea, além de influenciar no perfil de respostas inflamatórias. Recentemente, tem sido demonstrado uma forte correlação entre a microbiota intestinal de roedores com a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças como a asma, a obesidade e doenças metabólicas (SERVICK, 2016). Além disso, é cada vez mais comum na literatura artigos científicos mostrando que a microbiota intestinal pode comprometer a resposta do metabolismo a diversos medicamentos (FOND et al., 2016; GIMENEZ-BASTIDA et al., 2017). Desta forma, há necessidade de um consenso entre os cuidados prestados por bioteristas das instituições de pesquisa brasileiras e também dos cuidados realizados aos animais pelos pesquisadores responsáveis pelo laboratório. O consenso entre estes profissionais quanto a análise e a esterilização dos alimentos disponibilizados aos animais, assim como as descrições destas informações nos estudos não clínicos publicados, são de grande relevância para facilitar a qualidade e a reprodutibilidade de trabalhos científicos.

Os parâmetros acima mencionados são importantes para que um ensaio seja realizado de forma correta e gere resultados robustos e mais próximos a realidade, porém, para que os dados oriundos do estudo sejam cientificamente relevantes, se faz necessário conhecer a conduta do pesquisador frente a um dado bruto gerado e a utilização de métodos estatísticos adequados para as análises dos dados (LEEK; PENG, 2015; MCGRATH; CURTIS, 2015; MULLANE et al., 2015). Assim, o conhecimento a respeito das atitudes do pesquisador frente aos resultados gerados nos trabalhos são importantes para a integridade do estudo (HOOIJMANS; LEENAARS; RITSKES-HOITINGA, 2010).

Interessante notar que, ao observar que um dado oriundo do estudo não apresenta significância estatística frente a outro grupo experimental, 63% dos pesquisadores que responderam o questionário informaram que aumentam o número experimental, mesmo acima do cálculo do tamanho da amostra realizado anteriormente. Ainda mais importante e preocupante para a questão da confiabilidade e reprodutibilidade do estudo, foi a resposta descrita por 50% dos pesquisadores brasileiros, que sua conduta frente a tal problema seria retirar o resultado das análises, daqueles animais que distanciaram da média do grupo experimental. Por fim, 44% dos pesquisadores informaram, que para atingir a significância estatística esperada pelo pesquisador, lançam mão de outro método estatística disponível e/ou transformam os dados em porcentagem para verificar a possibilidade de diferença estatística entre grupos experimentais. Tal procedimento é incorreto e gera com frequência, resultados que jamais são confirmados por pesquisadores independentes. O método estatístico deve ser definido por ocasião do planejamento experimental e jamais pode ser modificado para forçar a obtenção de diferença estatisticamente significativa (BEGLEY; IOANNIDIS, 2015; FESTING; ALTMAN, 2002; HOOIJMANS et al., 2011; MCGRATH; CURTIS, 2015).

Estas atitudes vão em total desencontro ao preconizado pelas recomendações do *ARRIVE*, uma vez que este guia preconiza a realização do delineamento experimental previamente a realização dos ensaios, justamente para evitar intervenções ou modificações de resultados. Neste sentido, antes da condução dos ensaios, é extremamente necessário que haja um plano de estudo detalhado, com a descrição do número de animais por grupo, consistente e definido a partir do cálculo do tamanho da amostra, baseado no desvio padrão da média de experimentos pilotos (FESTING; ALTMAN, 2002). A definição prévia, adequada e equilibrada do tamanho da amostra por grupo experimental é indispensável no planejamento do estudo, pois irá definir a robustez e em consequência a confiabilidade dos resultados gerados e a relevância estatística dos dados obtidos. Desta forma, qualquer modificação realizada nos resultados do trabalho, deve ser justificada cientificamente pelo responsável do estudo (MCGRATH; CURTIS, 2015).

Além disso, é indispensável que seja realizado a escolha do método estatístico de acordo com os objetivos do estudo, ou seja, previamente a condução dos ensaios, e não após a geração dos dados (FESTING; ALTMAN, 2002). Os resultados gerados no estudo devem ser avaliados por uma análise estatística apropriada, mesmo que

eventualmente sejam tão evidentes que a escolha do método estatística não interfira na interpretação dos resultados. Segundo Motulsky (2014), a escolha da análise estatística deverá ser definida de acordo com o objetivo do estudo e não a partir dos resultados obtidos no trabalho (MOTULSKY, 2014). Uma definição sobre a escolha prévia do método estatístico foi descrita por Fisher (1925), que, segundo ele, "*Chamar o especialista em Estatística depois que o experimento foi feito, seria o mesmo que chamar o médico para realizar um exame post mortem*".

Assim, a escolha inadequada da metodologia estatística, associada a busca pelo místico valor de  $p < 0.05$ , que significa que existe 95% de chance do resultado obtido ser realmente o verdadeiro, inviabiliza o processo de reprodutibilidade dos trabalhos científicos publicados em periódicos (MARINO, 2014). Além disso, os resultados dos ensaios só apresentam validade estática se os dados forem estocásticos, ou seja, determinado a partir de um processo aleatório derivado de um estudo que foi utilizado randomização (MCGRATH; CURTIS, 2015). Logo, o intuito de um experimento de confirmação é testar uma ou algumas hipóteses pré-estabelecidas. No entanto, o objetivo geral consiste em extrair todas as informações relevantes encontradas nos resultados de forma que as mesmas possam ser interpretadas, levando-se em conta as variações biológicas e erros de medição (FESTING; ALTMAN, 2002).

A impossibilidade de se observar dados relevantes estatisticamente também pode ser devido diretamente a escolha da linhagem animal utilizada, bem como a idade e o sexo dos animais que farão parte do estudo (FLÓREZ-VARGAS et al., 2016). Assim, fica evidente a necessidade de uma compreensão mais aprofundada de fatores relacionados a idade e o sexo dos animais utilizados nos ensaios (JACKSON et al., 2016; MILLER et al., 2016). A idade dos animais é um ponto crítico para a execução de experimentos, uma vez que normalmente se utiliza animais com uma faixa etária de 8 a 12 semanas de vida, no caso de roedores. De fato, a maioria dos pesquisadores que constituem a comunidade científica, utilizam ratos e camundongos dentro da faixa etária de 8 a 12 semanas, por acreditarem que estes animais se encontram em uma fase adulta ou adulto jovem. Além disso, estes pesquisadores também acreditam que a definição de adulto ou adulto jovem, refere-se a roedores que atingem a sua maturidade sexual. Entretanto, os roedores são sexualmente maduros e capazes de se reproduzir entorno de 5 semanas de idade. Além disso, na faixa etária de 8 a 12 semanas, diversos processos anatômicos e fisiológicos estão em pleno curso de desenvolvimento (JACKSON et al., 2016). De fato, a

massa óssea de ratos e camundongos só atinge sua completa formação após 26 semanas, o sistema imunológico, especificamente os linfócitos T e B, amadurecem até 8 semanas de idade, porém só atingem sua completa produção ao logo de 26 semanas. O crescimento do cérebro, suas estruturas límbicas, a mielinização do sistema nervoso central, o hipocampo, estruturas olfativas e a medula espinhal de ratos, estão em pleno desenvolvimento até as primeiras 12 semanas de idade, assim como o sistema cardiovascular, pulmonar e hepático, os quais estão em pleno processo de desenvolvimento morfofuncional com 12 semanas de idade (JACKSON et al., 2016; WAUTHIER; VERBEECK; CALDERON, 2007). Desta forma, fica nítido que a escolha da idade adequada dos animais para reproduzir em modelos experimentais doenças encontradas em humanos, se torna imprescindível.

Além da idade, o sexo dos animais também pode influenciar no resultado final da pesquisa. Interessante notar que a grande maioria dos trabalhos não clínicos envolvendo animais de experimentação são realizados preferencialmente em ratos ou camundongos do sexo masculino. Desta forma, a prevalência de estudos realizados com ratos e camundongos machos e a negligência de trabalhos com roedores do sexo feminino, prejudica o desenvolvimento científico voltados para a saúde da mulher (BEERY; ZUCKER, 2012; LANDIS et al., 2013). Doenças como, por exemplo, o transtorno de ansiedade, tem incidência maior sobre o sexo feminino, sendo 2,25 vezes mais frequentes em mulher que em homens, no entanto, os modelos experimentais não clínicos utilizam preferencialmente animais do sexo masculino (BEKKER; VAN MENS-VERHULST, 2007).

Outras doenças humanas como o Acidente Vascular Encefálico (AVE) apresentam maior prevalência em mulheres ao longo da vida, principalmente após a menopausa. No entanto, o AVE é preferencialmente estudado em modelos experimentais realizados em machos (REEVES et al., 2008). Igualmente a dor crônica, que acomete cerca de 1,5 vezes mais mulheres do que homens (ROSEN; HAM; MOGIL, 2017). Entretanto, a grande maioria dos trabalhos não clínicos são realizados utilizando modelos experimentais com roedores machos. Portanto, é nítido a falta de correlação entre estudos não clínicos com animais de experimentação com a realidade clínica em seres humanos (FILLINGIM et al., 2009).

A translação de estudos não clínicos *in vivo*, em clínicos em humanos, depende de uma coerência entre animais e humanos no que se refere a anatomia, fisiologia e a doença que será estudada. Para isso, deve-se conhecer o processo fisiopatológico da doença em questão, a

prevalência de incidência da mesma em homens ou em mulheres, as faixas etárias mais acometidas, etc (PERRIN, 2014). Além disso, o entendimento por parte do pesquisador sobre os animais que serão utilizados nos ensaios é indispensável para reduzir os vieses e, com isso, tornar os trabalhos mais robustos, confiáveis e reprodutíveis (PUSZTAI; HATZIS; ANDRE, 2013).

Dentre um contexto de ações que devem ser tomadas pelos pesquisadores, as quais em sua grande maioria estão descritas nos guias *ARRIVE*, o conhecimento acerca da anatomia, fisiologia, comportamento e a adequada manipulação dos animais, são aspectos importantes que devem ser levados em consideração (HENDERSON et al., 2013). Os camundongos e ratos apresentam o olfato altamente desenvolvido, detectam alimentos e predadores, assim como diferenciam seus manipuladores facilmente pelo cheiro. Interessante notar que os roedores liberam mais hormônios ligados ao estresse após uma manipulação nociva realizada por homens do que por mulheres. Por outro lado, em modelos de nocicepção foi observado que os animais apresentam uma resposta de maior intensidade quando são manipulados por mulheres (SERVICK, 2016). Sendo assim, o sexo ou a forma com que o manipulador realiza o ensaio, terá influência direta nos resultados finais do estudo.

Ainda, a manipulação inadequada dos animais por parte dos pesquisadores pode gerar estresse e dor, caracterizado em muitos casos pela vocalização dos animais (CARBONE; AUSTIN, 2016). A manipulação inadequada destes roedores além de provocar o estresse físico, induz o estresse sonoro aos outros animais da gaiola. A vocalização destes roedores gera diferentes frequências sonoras, tanto em ondas com frequência auditiva ao ouvido humano quanto não auditivas. Entretanto, as ondas com frequências auditivas imperceptíveis ao ouvido humano, são audíveis ao ouvido do animal, gerando assim o estresse através da liberação de hormônios estressores, o que pode alterar o comportamento do animal e com isso prejudicar a análise dos resultados do estudo (TAKAHASHI; KASHINO; HIRONAKA, 2010).

Finalmente, os reagentes utilizados nos estudos devem ser validados antes de serem utilizados nos ensaios. Assim, os anticorpos largamente utilizados em experimentação científica, reconhecem frequentemente proteínas além das que são especificadas pela empresa fornecedora do produto. Além dos anticorpos, as inúmeras linhagens celulares de células imortalizadas, incluindo os tumores humanos, utilizados em modelos experimentais de tumores singênico e xenográficos de câncer, em muitos casos, são vendidas erroneamente

pelos fornecedores (FREEDMAN, 2015). Desta forma, linhagens celulares de melanoma podem ser vendidas como linhagem celular para câncer de pulmão por exemplo (BAKER, 2015). Portanto, a validação dos reagentes previamente a condução dos estudos se torna um procedimento importante, pois pode-se gerar resultados inconsistentes e com baixa confiabilidade científica (BEGLEY; BUCHAN; DIRNAGL, 2015).

Além da transparência e da conduta ético-científica por parte dos pesquisadores, financiadores de pesquisa, revisores e editores de periódicos, a evolução da ciência corrobora diretamente com a troca de informações e experiências entre cientistas (ASAY; BARON, 2014). Neste sentido, as colaborações científicas realizadas entre centros de pesquisas nacionais e internacionais podem diminuir as diversas dificuldades existentes no meio científico, e assim, promover o desenvolvimento de uma ciência de maior qualidade, confiabilidade, robustez e reprodutibilidade (COLLINS; TABAK, 2014). Neste sentido, foi analisado nos trabalhos publicados pelos pesquisadores brasileiros, o grau de parcerias científicas realizadas entre universidades e instituições nacionais com centros de pesquisas internacionais. Entretanto, foi observado que os estudos não clínicos desenvolvidos no país, apresentaram baixa incidência de colaborações com centros de pesquisa internacionais.

Um dos grandes objetivos de autores de trabalhos não clínicos desenvolvidos em academias e outras instituições de pesquisa, são as publicações de seus estudos em periódicos nacionais e internacionais. As revistas científicas são divididas por áreas de pesquisa assim como são classificadas pelos seus fatores de impacto correspondentes. O fator de impacto dos periódicos está diretamente relacionado ao número de citações que um trabalho recebe após sua publicação. Logo, revistas com alto fator de impacto apresentam maior visibilidade no meio científico, o que gera a cobiça de autores em publicar seus estudos nestes periódicos (SHEN; BJÖRK, 2015). No entanto, uma pesquisa realizada recentemente mostrou que trabalhos publicados tanto em revistas de alto como de baixa visibilidade científica, apresentam precárias descrições quanto ao planejamento experimental, sobre as características e a qualidade dos animais utilizados nos ensaios, assim como ausência de informações quanto a utilização de guias internacionais para condução de estudos não clínicos *in vivo* (FANELLI; COSTAS; IOANNIDIS, 2017). Em outras palavras, o fator de impacto das revistas não influencia na transparência dos artigos científicos publicados (VASILEVSKY et al., 2013). Neste contexto, ao ser

analisado o grau de visibilidade dos periódicos em que os pesquisadores brasileiros publicam seus trabalhos, foi observado que em 62% dos artigos publicados, a faixa de fator de impacto das revistas variou entre 2 a 3,99, o que parece não influenciar no grau de transparência dos trabalhos, quando comparado aos trabalhos publicados acima ou abaixo daquela faixa.

## 8. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, ficou evidente que as pesquisas não clínicas envolvendo animais de experimentação realizadas em universidades e instituições de pesquisa na área biomédica do Brasil, ainda carecem de maior transparência para garantir a rastreabilidade, robustez e confiabilidade científica dos resultados gerados. Estes dados corroboram com os resultados obtidos por instituições de prestígio como *NIH*, *NC3Rs*, *FDA*, *OECD* a partir da análise de trabalhos não clínicos *in vivo* publicados em revistas de alto impacto científico. Portanto, é de suma importância que financiadores de pesquisa, dirigentes de universidades e institutos de pesquisa, revisores e editores de periódicos científicos, coordenadores de programas de pós-graduação, chefes de laboratórios e pesquisadores (iniciação científica, mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos), invistam mais tempo no planejamento experimental de seus projetos e procurem implementar novas atitudes ético-científicas visando não somente melhorar a qualidade dos artigos publicados, mas também para permitir a robustez e a reprodutibilidade da pesquisa nacional.



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. Self-correction in science at work. **Science**, v. 348, p. 1420–22, 2015.

ALLISON, D. B. et al. A Tragedy of Errors. **Nature**, v. 530, n. Feb 4, p. 27–29, 2016.

ALQURAIISHI, M.; SORGER, P. K. Reproducibility will only come with data liberation. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 339, p. 339ed7, 2016.

ANDERSEN, M. L. et al. Ética na Experimentação Animal. In: **Princípios Éticos e Práticos do uso de Animais de Experimentação**. São Paulo: UNIFESP, 2004. p. 2–15.

ANDRADE, E. L. et al. Estudos Pré-Clínicos. In: MASSUD FILHO, João. **Medicina Farmacêutica Conceitos e Aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2016. p. 31–66.

ASAY, J.; BARON, S. The hard road to presentism. **Pacific Philosophical Quarterly**, v. 95, n. 3, p. 314–335, 2014.

AZAR, T. A.; SHARP, J. L.; LAWSON, D. M. Effect of housing rats in dim light or long nights on heart rate. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 47, n. 4, p. 25–34, 2008.

BAKER, D. et al. Two Years Later: Journals Are Not Yet Enforcing the ARRIVE Guidelines on Reporting Standards for Pre-Clinical Animal Studies. **PLoS Biology**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2014.

BAKER, M. Blame it on the Antibodies. **Nature**, v. 521, p. 274–275, 2015.

BAKER, M. Is there a reproducibility crisis? **Nature**, v. 533, p. 452–454, 2016.

BAR HARBOR, M. The world's favourite lab animal has been found wanting, but there are new twists in the mouse's tale. **The Economist**, v. 12, p. 1–3, 2016.

BEBARTA, V.; LUYTEN, D.; HEARD, K. Erratum: Emergency medicine animal research: Does use of randomization and blinding affect the results? **Academic Emergency Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1410, 2003.

BEERY, A. K.; ZUCKER, I. Sex Bias in Neuroscience and Biomedical Research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 100, n. 2, p. 130–134, 2012.

BEGLEY, C. G. Reproducibility: Six red flags for suspect work. **Nature**, v. 497, n. 7450, p. 433–434, 2013.

BEGLEY, C. G.; BUCHAN, A. M.; DIRNAGL, U. Institutions must do their part for reproducibility part for reproducibility. **Nature**, v. 525, p. 5–7, 2015.

BEGLEY, C. G.; ELLIS, L. M. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. **Nature**, v. 483, n. 7391, p. 531–3, 2012.

BEGLEY, C. G.; IOANNIDIS, J. P. A. Reproducibility in science: Improving the standard for basic and preclinical research. **Circulation Research**, v. 116, n. 1, p. 116–126, 2015.

BEKKER, M. H. J.; VAN MENS-VERHULST, J. Anxiety disorders: sex differences in prevalence, degree, and background, but gender-neutral treatment. **Gender Medicine**, v. 4 Suppl B, p. S178-93, 2007.

BENDER, B. G. A bootstrap approach to implementation science. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 117, n. 3, p. 213–216, 2016.

BESPALOV, A. et al. Failed trials for central nervous system disorders do not necessarily invalidate preclinical models and drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 7, p.516-516, 2016.

BISHOP, D. et al. Call to action to improve the reproducibility of biomedical research. **Draft**, p. 1-4, 2016.

CAMPBELL, P. Sexism: Editor's note. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 483, 2014.

CARBONE, L.; AUSTIN, J. Pain and laboratory animals: Publication practices for better data reproducibility and better animal welfare. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. 1–24, 2016.

CASTRO, V. L. S. S. Uso de Animais de Experimentação e Legislação Correlata: orientações sobre estudos com peixes e roedores. **Embrapa Meio Ambiente**, v. 1, p. 27, 2013.

CHAKMA, J. et al. Asia's ascent--global trends in biomedical R&D expenditures. **The New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 1, p. 3–6, 2014.

CHALMERS, I. et al. How to increase value and reduce waste when research priorities are set. **The Lancet**, v. 383, n. 9912, p. 156–165, 2014.

CHAN, A. W. et al. Increasing value and reducing waste: Addressing inaccessible research. **The Lancet**, v. 383, n. 9913, p. 257–266, 2014.

CLOUGH, G. Environmental effects on animals used in biomedical research. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 57, p. 487–523, 1982.

COLLINS, F. S.; TABAK, L. A. NIH plans to enhance reproducibility. **Nature**, v. 505, n. 7485, p. 612–613, 2014.

CONCEA. Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal. **Ministério da Ciência e Tecnologia**, 2015.

CRESSEY, D. Web tool aims to reduce flaws in animal studies. **Nature**, v. 531, n. 7592, p. 128–128, 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **The Tuskegee Timeline**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/tuskegee/timeline.htm>>. Acesso em: 30 ago. 2017.

CENTERSFOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Thalidomide**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/healthcommunication/toolstemplates/entertaimented/tips/thalidomide.html>>. Acesso em: 30 ago. 2017.

DAMY, S. B. ET. AL. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103–111, 2010.

DE CASTILHO, E. A.; KALIL, J. Ética e pesquisa médica: Princípios, diretrizes e regulamentações. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 4, p. 344–347, 2005.

EDITOR. Announcement: Reducing our irreproducibility. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 398–398, 2013.

EDWARDS, M. A.; ROY, S. Academic Research in the 21st Century: Maintaining Scientific Integrity in a Climate of Perverse Incentives and Hypercompetition. **Environmental Engineering Science**, v. 34, n. 1, p. 1-12, 2016.

EICKEN, H. Six red flags for suspect work. **Nature**, v. 497, p. 433--434, 2013.

EISEN, J. A.; GANLEY, E.; MACCALLUM, C. J. Open Science and Reporting Animal Studies : Who's Accountable ? **PLoS Biology**, v. 12, n. 1, p. 1–3, 2014.

ENSERINK, M. Sloppy reporting on animal studies proves hard to change. **Science**, v. 357, n. 6358, p. 1337–1338, 2017.

EVERITT, J. I. The future of preclinical animal models in pharmaceutical discovery and development: a need to bring in cerebro to the in vivo discussions. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 1, p. 70–7, 2015.

ECNP NEUROSCIENCE OPPLIED. **ECNP Preclinical Network Data Prize**. Disponível em: <<https://www.ecnp.eu/research-innovation/ECNP-Preclinical-Network-Data-Prize.aspx>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

FANELLI, D.; COSTAS, R.; IOANNIDIS, J. P. A. Meta-assessment of bias in science. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 14, p. 3714-3719, 2017.

FESTING, M. F. Warning: the use of heterogeneous mice may seriously damage your research. **Neurobiology of Aging**, v. 20, n. 2, p. 237-44-6, 1999.

FESTING, M. F. W.; ALTMAN, D. G. Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments Using Laboratory Animals. **ILAR Journal**, v. 43, n. 4, p. 244-258, 2002.

FILLINGIM, R. B. et al. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. **The Journal of Pain**, v. 10, n. 5, p. 447-85, 2009.

FLÓREZ-VARGAS, O. et al. Bias in the reporting of sex and age in biomedical research on mouse models. **eLife**, v. 5, n. 2016, p. 1-14, 2016.

FOND, G. et al. [The potential role of microbiota in major psychiatric disorders: Mechanisms, preclinical data, gastro-intestinal comorbidities and therapeutic options]. **Presse Medicale (Paris, France : 1983)**, v. 45, n. 1, p. 7-19, 2016.

FREEDMAN, L. P. Know Thy Cells: Improving Biomedical Research Reproducibility. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 294, p. 1, 2015.

FREEDMAN, L. P.; COCKBURN, I. M.; SIMCOE, T. S. The Economics of Reproducibility in Preclinical Research. **PLoS Biology**, v. 13, n. 6, p. 1-6, 2015.

FRYE, S. V et al. Tackling reproducibility in academic preclinical drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 1-2, 2015.

GAMBLE, M. R.; CLOUGH, G. Ammonia build-up in animal boxes and its effect on rat tracheal epithelium. **Laboratory Animals**, v. 10, n. 2, p. 93-104, 1976.

GARRARD, G.; HARRISON, G. A.; WEINER, J. S. Reproduction and survival of mice at 23 degrees and 32 degrees C. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 37, n. 2, p. 287-98, 1974.

GASKILL, B. N.; GARNER, J. P. Stressed out: providing laboratory animals with behavioral control to reduce the physiological effects of

stress. **Lab Animal**, v. 46, n. 4, p. 142–145, 2017.

GIMENEZ-BASTIDA, J. A. et al. Pharmacological efficacy/toxicity of drugs: A Comprehensive update about the dynamic interplay of microbes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2017.

GLASZIOU, P. et al. Reducing waste from incomplete or unusable reports of biomedical research. **The Lancet**, v. 383, n. 9913, p. 267–276, 2014.

GODFREY, D.; SILVERMAN, J. Effects of a fire alarm strobe light on fecal corticosterone metabolite concentrations in mice. **Lab Animal**, v. 38, n. 2, p. 61–8, 2009.

GORDON, C. J. Twenty-four hour rhythms of selected ambient temperature in rat and hamster. **Physiology & Behavior**, v. 53, n. 2, p. 257–63, 1993.

GORDON, C. J. Effect of cage bedding on temperature regulation and metabolism of group-housed female mice. **Comparative Medicine**, v. 54, n. 1, p. 63–8, 2004.

GORDON, C. J.; BECKER, P.; ALI, J. S. Behavioral thermoregulatory responses of single- and group-housed mice. **Physiology & Behavior**, v. 65, n. 2, p. 255–62, 1998.

GREIF, S.; TRÉZ, T. A VERDADEIRA FACE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL Sua Saúde em perigo. **Sociedade Educacional Fala Bicho**, v. 6, p. 1–81, 2000.

GUIMARAES, J. A. A pesquisa médica e biomédica no Brasil. Comparações com o desempenho científico brasileiro e mundial. **Red de Revistas Científicas de America Latina**, p. 303–327, 2004.

HACKAM, D. G.; REDELMEIER, D. A. Translation of research evidence from animals to humans. **Journal of the American Medical Association**, v. 296, n. 14, p. 1731–2, 2006.

HAYES, Ann. Key role of publication of clinical data for target validation. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 3, n. 4, p.1-3, 2015.

HENDERSON, V. C. et al. Threats to validity in the design and conduct of preclinical efficacy studies: a systematic review of guidelines for in vivo animal experiments. **PLoS Medicine**, v. 10, n. 7, p. 1-14, 2013.

HIRST, J. A. et al. The need for randomization in animal trials: an overview of systematic reviews. **PloS One**, v. 9, n. 6, p. 1-11, 2014.

HOCHMAN, B. et al. Desenhos de pesquisa. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 2-9, 2005.

HOOIJMANS, C. R. et al. Improving planning, design, reporting and scientific quality of animal experiments by using the Gold Standard Publication Checklist, in addition to the ARRIVE guidelines. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1259-1260, 2011.

HOOIJMANS, C. R.; LEENAARS, M.; RITSKES-HOITINGA, M. A Gold Standard Publication Checklist to Improve the Quality of Animal Studies, to Fully Integrate the Three Rs, and to Make Systematic Reviews More Feasible. **Alternatives to Laboratory Animals**, p. 167-182, 2010.

HUGHES, J. et al. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239-1249, 2011.

IOANNIDIS, J. P. A. Why most published research findings are false. **PLoS Medicine**, v. 2, n. 8, p. 0696-0701, 2005.

JACKSON, S. J. et al. Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes. **Laboratory Animals**, p. 1-9, 2016.

JARVIS, M. F.; WILLIAMS, M. Irreproducibility in Preclinical Biomedical Research: Perceptions, Uncertainties, and Knowledge Gaps. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 37, n. 4, p. 290-302, 2016.

JOSÉ, C. et al. Artigo SOCIO-ANTROPOLOGIA DE UM FENÔMENO TECNO-CIENTÍFICO-POLÍTICO TRANSNACIONAL : O USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO CIENTÍFICA Artigo. **Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Sociedade**, v. 2, p. 58-99, 2011.

KANOSUE, K. et al. Concepts to utilize in describing thermoregulation

and neurophysiological evidence for how the system works. **European Journal of Applied Physiology**, v. 109, n. 1, p. 5–11, 2010.

KILKENNY, C. et al. Survey of the Quality of Experimental Design, Statistical Analysis and Reporting of Research Using Animals. **PLoS One**, v. 4, n. 11, 2009.

KILKENNY, C. et al. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. **PLoS Biology**, v. 8, n. 6, p. e1000412, 2010.

KILKENNY, C. et al. Improving bioscience research reporting: The arrive guidelines for reporting animal research. **Animals**, v. 4, n. 1, p. 35–44, 2013.

KOL, A. et al. Companion animals: Translational scientist's new best friends. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 308, p. 308ps21, 2015.

LANDIS, S. C. et al. A call for transparent reporting to optimize the predictive value of preclinical research. **Nature**, v. 490, n. 7419, p. 187–191, 2013.

LEEK, J. T.; PENG, R. D. Statistics: P values are just the tip of the iceberg. **Nature**, v. 520, n. 7549, p. 612–612, 2015.

LLOVERA, G.; LIESZ, A. The next step in translational research: Lessons learned from the first preclinical randomized controlled trial. **Journal of Neurochemistry**, p. 1–9, 2016.

LUBELL, M. S. AAAS Report XXXVIII: Research and Development FY 2014 - Chapter 8. **American Association for the Advancement of Science**, n. 1, p. 91–99, 2013.

MACLEOD, M. R. et al. Hypothermia for Stroke: call to action 2010. **International Journal of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society**, v. 5, n. 6, p. 489–92, 2010.

MACLEOD, M. R. Preclinical research: Design animal studies better. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 35, 2014.

MARQUES, R. G. et al. Rumo à regulamentação da utilização de animais no ensino e na pesquisa científica no Brasil. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 262–267, 2005.

MARTIN, B. et al. “Control” laboratory rodents are metabolically morbid: why it matters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 14, p. 6127–33, 2010.

MASSUD FILHO, João. PESQUISA CLÍNICA. In: MASSUD FILHO, João. **Medicina Farmacêutica Conceitos e Aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2016. p. 85-86.

MCGRATH, J. C.; CURTIS, M. J. BJP is changing its requirements for scientific papers to increase transparency. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 11, p. 2671–2674, 2015.

MCGRATH, J. C.; LILLEY, E. Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 13, p. 89–93, 2015.

MCNUTT, M.; NEREM, R. M. Research integrity revisited. **Science**, v. 356, n. 6334, p. 115–115, 2017.

MEIJER, M. K. et al. Influence of environmental enrichment and handling on the acute stress response in individually housed mice. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 2, p. 161–173, 2007.

MILLER, L. R. et al. Considering sex as a biological variable in preclinical research. **FASEB Journal**, v. 31, n. 1, p. 29-34, 2016.

MIZIARA, I. D. et al. Research ethics in animal models. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 78, n. 2, p. 128–131, 2012.

MOGIL, J. S.; MACLEOD, M. R. No publication without confirmation. **Nature**, v. 542, n. 7642, p. 409–411, 2017.

MONNIER, L. et al. Translation of Research Evidence From Animals to Humans. **RESEARCH LETTER Translation**, v. 296, n. 14, 2013.

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 33–36, 2008.

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1–2, p. 67–74, 2002.

MULLANE, K. et al. Guidelines for manuscript submission in the peer-reviewed pharmacological literature. **Biochemical Pharmacology**, v. 97, n. 3, p. 225–235, 2015.

MULLANE, K.; WILLIAMS, M. Unknown unknowns in biomedical research: Does an inability to deal with ambiguity contribute to issues of irreproducibility? **Biochemical Pharmacology**, v. 97, n. 2, p. 133–136, 2015.

MOTULSKY, Harvey J. Common misconceptions about data analysis and statistics. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 8, p.2126–2132, 2014.

MARINO, Michael J. The use and misuse of statistical methodologies in pharmacology research. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p.78–92, 2014.

ODGAARD-JENSEN, J. et al. Randomisation to protect against selection bias in healthcare trials. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, p. MR000012, 2011.

OECD. **OECD Science, Technology and Industry Outlook 2014**. [s.l.: s.n.].

PEERS, I. S. et al. Can you trust your animal study data? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 12, p. 560, 2014.

PEREL, P. et al. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. **BMJ: British Medical Journal**, v. 334, n. 7586, p. 197, 2007.

PERRIN, S. Make mouse studies work. **Nature**, v. 507, p. 423, 2014.

PRESCOTT, M. J.; LIDSTER, K. Improving quality of science through

better animal welfare: the NC3Rs strategy. **Lab Animal**, v. 46, n. 4, p. 152–156, 2017.

PRINZ, F.; SCHLANGE, T.; ASADULLAH, K. Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 9, p. 712, 2011.

PUSZTAI, L.; HATZIS, C.; ANDRE, F. Reproducibility of research and preclinical validation: problems and solutions. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, n. 12, p. 720–724, 2013.

REARDON, S. A mouse's house may ruin experiments. **Nature**, v. 530, n. 7590, p. 264–264, 2016.

REEVES, M. J. et al. Sex differences in stroke: epidemiology, clinical presentation, medical care, and outcomes. **The Lancet. Neurology**, v. 7, n. 10, p. 915–26, 2008.

RENNIE, D. Let's make peer review scientific. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 31–3, 2016.

ROGERS, G. B. et al. Functional divergence in gastrointestinal microbiota in physically-separated genetically identical mice. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–5, 2014.

ROSEN, S.; HAM, B.; MOGIL, J. S. Sex differences in neuroimmunity and pain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 1–2, p. 500–508, 2017.

ROSENBLATT, M. et al. An incentive-based approach for improving data reproducibility. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 336, p. 336ed5, 2016.

SAVOVIĆ, J. et al. Influence of reported study design characteristics on intervention effect estimates from randomized, controlled trials. **Annals of Internal Medicine**, v. 157, n. 6, p. 429–38, 2012.

SALMAN, RUSTAM AL-SHAHI et al. Increasing value and reducing waste in biomedical research regulation and management. **The Lancet**, v. 383, n. 9912, p.176-185, 2014.

SCHAERDEL, A. D. et al. Localized and systemic effects of environmental ammonia in rats. **Laboratory Animal Science**, v. 33, n. 1, p. 40–5, 1983.

SCHNAIDER, T. B; SOUZA, C. Aspectos éticos da experimentação animal. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 53, n. 2, p. 278–285, 2003.

SCHRAMM, F. R. A moralidade da prática de pesquisa nas ciências sociais: aspectos epistemológicos e bioéticos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9, n. 3, p. 773–784, 2004.

SCHULZ, K. F. et al. Empirical evidence of bias. Dimensions of methodological quality associated with estimates of treatment effects in controlled trials. **Journal of the American Medical Association**, v. 273, n. 5, p. 408–12, 1995.

SCHULZ, K. F.; ALTMAN, D. G.; MOHER, D. WITHDRAWN: CONSORT 2010 statement: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. **International Journal of Surgery**, v. 115, n. 5, p. 1063–1070, 2010.

SERVICK, K. Of mice and microbes. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 741–743, 2016.

SEINSTRÁ, Elena Zudilova. **How new article types help make science more reproducible**. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/authors-update/home/featured-article/How-new-article-types-help-make-science-more-reproducible>>. Acesso em: 28 nov. 2017.

SHEN, C.; BJÖRK, B.-C. Open access: a longitudinal study of article volumes and market characteristics. **BMC Medicine**, p. 1–15, 2015.

SMALDINO, P. E.; MCELREATH, R. the Natural Selection of Bad Science. **Royal Society Open Science**, v. 3, p. 1–17, 2016.

STERN, A. M. et al. Financial costs and personal consequences of research misconduct resulting in retracted publications. **eLife**, v. 3, p. e02956, 2014.

SOUTHWARK, B. P. et al. The ethics of research involving animals.

**Nuffield Council on Bioethics**, p. 1-323, 2005.

TAKAHASHI, N.; KASHINO, M.; HIRONAKA, N. Structure of rat ultrasonic vocalizations and its relevance to behavior. **PloS One**, v. 5, n. 11, p. e14115, 2010.

TANNENBAUM, J.; BENNETT, B. T. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 54, n. 2, p. 120–132, 2015.

VAN WINKLE, T. J.; BALK, M. W. Spontaneous corneal opacities in laboratory mice. **Laboratory Animal Science**, v. 36, n. 3, p. 248–55, 986.

VASCONCELOS, S. Brazilian Science and Research Integrity: Where are We? What Next? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 1259–1269, 2015.

VASILEVSKY, N. A. et al. On the reproducibility of science: unique identification of research resources in the biomedical literature. **PeerJ**, v. 1, p. e148, 2013.

WARE, J. Reproducibility pro. **Nature**, v. 530, p. 2016, 2016.

WAUTHIER, V.; VERBEECK, R. K.; CALDERON, P. B. The effect of ageing on cytochrome p450 enzymes: consequences for drug biotransformation in the elderly. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 7, p. 745–57, 2007.



## 10. APÊNDICE A

O objetivo deste questionário será auxiliar no levantamento de dados para a Dissertação de Mestrado Profissional do aluno Edir Rezende Júnior, matriculado no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC, orientado pelo Prof. Dr. João Batista Calixto.

Esta dissertação pretende realizar um levantamento junto aos alunos de pós-graduação nas diversas áreas das ciências biológicas, para avaliar a rastreabilidade, confiabilidade e reprodutibilidade das pesquisas não clínicas realizadas no país, que utilizam animais de experimentação, em especial quanto aos requisitos propostos nas diretrizes do *ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments)*. \*

### **Nota do Autor da Pesquisa**

Não é necessário a identificação do aluno. Apenas solicitamos que seja preenchido o nome da instituição em que o mesmo está matriculado, o sexo, o departamento onde está sendo desenvolvido o projeto científico e o atual grau acadêmico (mestrado, doutorado ou pós-doutorado).

\* Para saber mais sobre o *ARRIVE*, ver referência na última página do questionário.

<b>Instituição:</b> _____		
<b>Departamento:</b> _____		
<b>Sexo:</b> Masculino [ ] Feminino [ ]		
<b>Aluno:</b> Mestrando [ ] Doutorando [ ] Pós-Doutorando [ ]		
<b>Introdução</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
1. O autor tem conhecimento a respeito das diretrizes <i>ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments)</i> ?	[ ]	[ ]
2. As diretrizes <i>ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments)</i> foram ou serão utilizadas no seu estudo?	[ ]	[ ]
<b>Com relação aos Animais usados em seu projeto</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
3. Em seu projeto de pesquisa, está previsto o uso de animais?	[ ]	[ ]
4. Você tem evidências de que a espécie/modelo experimental utilizada em seu estudo é a mais preditiva para possível translação em humanos?	[ ]	[ ]
5. Os animais são criados na instituição onde você trabalha?	[ ]	[ ]
6. Independente da fonte dos animais utilizados em sua pesquisa, você tem informações periódicas e precisas sobre os mesmos quanto:		
a) A procedência das matrizes?	[ ]	[ ]
b) A linhagem dos animais?		
c) A espécie dos animais?	[ ]	[ ]
d) Ao número de cruzamentos das matrizes?		
e) Aos critérios utilizados para a realização dos acasalamentos?	[ ]	[ ]
f) A avaliação sanitária quanto a presença de vírus, bactérias, fungos e helmintos?	[ ]	[ ]
g) A avaliação da análise da água que bebem?	[ ]	[ ]
h) A análise da composição dos ingredientes que compõem a ração?		
i) A qualidade da maravalha utilizada na gaiola dos animais?	[ ]	[ ]
j) A realização da esterilização das gaiolas, caixas, maravalha, ração e água?	[ ]	[ ]
k) Ao número de trocas semanais de maravalha das		

gaiolas?	[ ]	[ ]
<b>l)</b> Ao enriquecimento ambiental utilizado nas gaiolas dos animais?	[ ]	[ ]
<b>m)</b> A curva de crescimento desses animais nas condições onde estão sendo criados?	[ ]	[ ]
<b>n)</b> A realização de exames bioquímicos, como variação glicêmica, colesterol, bilirrubina, creatinina, TGO/TGP?	[ ]	[ ]
<b>o)</b> Aos resultados dos exames bioquímicos, como variação glicêmica, colesterol, bilirrubina, creatinina, TGO/TGP?	[ ]	[ ]
<b>p)</b> Ao número de animais por gaiola?	[ ]	[ ]
<b>q)</b> Ao biotério de manutenção (setorial), os animais são mantidos em estantes ou raques que possibilitam a filtragem e a troca de ar do interior das gaiolas?	[ ]	[ ]
<b>r)</b> Ao biotério de criação (central), os animais são mantidos em estantes ou raques que possibilitam a filtragem e a troca de ar do interior das gaiolas?	[ ]	[ ]
<b>s)</b> Ao biotério de manutenção (setorial), há controle de temperatura?	[ ]	[ ]
<b>t)</b> Ao biotério de manutenção (setorial), há controle de umidade?	[ ]	[ ]
<b>u)</b> Ao biotério de manutenção (setorial), há controle de luminosidade?	[ ]	[ ]
<b>v)</b> Aos aspectos genotípicos e fenotípicos dos animais transgênicos utilizados no projeto?	[ ]	[ ]
	[ ]	[ ]
	[ ]	[ ]
	[ ]	[ ]

	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Delineamento experimental e análise estatística</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
7. No desenho experimental, você determina previamente:		
a) Número de grupos experimentais e os grupos controles negativo e positivo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b) A randomização dos animais em grupos experimentais?		
c) Iniciativas para minimizar distorções (viés) que podem ocorrer no processo de distribuição aleatória (randomização) dos animais nos grupos experimentais?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Foi ou será desenvolvido um diagrama ou fluxograma para facilitar a compreensão e a realização dos experimentos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Como você estima o tamanho da amostra (número de animais por grupo) em seus experimentos:		
a) Com base em dados da literatura?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b) Utilizando metodologia estatística com base na variação do desvio padrão da média em experimentos pilotos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c) Utilizando informações de colegas que trabalharam no mesmo modelo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. Em seus experimentos, você costuma realizar os ensaios de forma cega, sem conhecer os grupos experimentais?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. Em todos os grupos experimentais há o mesmo número de amostra experimental?		
12. Quando o número de amostra experimental é	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

grande, seus experimentos são realizados em etapas (dias distintos)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>13.</b> Se realizado em etapas, você utiliza grupos controles ao longo de todas as etapas (a cada dia)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>14.</b> Quando os dados obtidos não são estatisticamente significantes, apresentando apenas uma tendência, você:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
a) Aumenta o número de amostra experimental?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b) Retira alguns dados mais discrepantes?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c) Usa outro método estatístico disponível?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>15.</b> Os dados brutos obtidos no desenvolvimento do estudo, mesmo os resultados considerados negativos, foram ou serão apresentados na dissertação/tese?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Declaração de ética</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>16.</b> Você teve algum tipo de treinamento em manipulação de animais por alguém capacitado?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>17.</b> A equipe do laboratório na qual você está inserido teve treinamento em manipulação de animais por alguém capacitado?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>18.</b> Você tem conhecimento de quantos animais foram e/ou serão utilizados em sua pesquisa?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>19.</b> Você já realizou ou realizaria um determinado experimento mesmo sabendo que tal ensaio não está ou não estaria previsto no CEUA do seu projeto de pesquisa?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>20.</b> Você já publicou ou publicaria resultados de ensaios que não estava ou não estaria previsto no CEUA do seu projeto de pesquisa?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>21.</b> Em seus trabalhos vocês declaram com frequência se há um potencial conflito de interesse?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

<b>22.</b> Em seu local de trabalho há técnicos de laboratório que participam dos projetos científicos?	[ ]	[ ]
<b>23.</b> Na hora da publicação do trabalho quem entra como autor/co-autor:		
<b>a)</b> Aqueles que doaram os animais?	[ ]	[ ]
<b>b)</b> Aqueles que doaram materiais (anticorpos etc.)?	[ ]	[ ]
<b>c)</b> Aqueles que cederam a estrutura do laboratório?	[ ]	[ ]
<b>d)</b> Todos que realizaram os experimentos, excluindo os técnicos de laboratório?	[ ]	[ ]
<b>e)</b> Os técnicos de laboratório participam tanto manualmente quanto intelectualmente do desenvolvimento do estudo?	[ ]	[ ]
<b>f)</b> Somente os experimentadores que realizaram ensaios cujos dados foram de acordo com a hipótese testada, que entraram no trabalho?	[ ]	[ ]
<b>g)</b> O orientador?	[ ]	[ ]
<b>24.</b> Qual o fator de impacto da revista científica que você publicou ou almeja publicar seu trabalho científico:	[ ]	[ ]
<b>a)</b> De 1.0 a 2.0	[ ]	[ ]
<b>b)</b> De 2.1 a 5.0	[ ]	[ ]
<b>c)</b> De 5.1 a 10.0	[ ]	[ ]
<b>d)</b> Maior que 10.0	[ ]	[ ]

<p><b>25.</b> Você acredita que os dados gerados pelo seu trabalho são, de fato, relevantes para a ciência e/ou sociedade?</p>	[ ]	[ ]
<p><b>26.</b> Se você está no mestrado responda: Você acredita que os custos totais (mão de obra, insumos, instalação, etc.) da sua dissertação de mestrado enquadrariam em que valores:</p>	[ ]	[ ]
<p><b>a)</b> Menos de 50 mil reais</p>	[ ]	[ ]
<p><b>b)</b> De 51 a 100 mil reais</p>	[ ]	[ ]
<p><b>c)</b> Entre 101 e 200 mil reais</p>	[ ]	[ ]
<p><b>d)</b> Maior que 200 mil reais</p>	[ ]	[ ]
<p><b>27.</b> Se você está no doutorado ou pós-doutorado responda: Você acredita que os custos totais (mão de obra, insumos, instalação, etc.) da sua tese de doutorado enquadrariam em que valores:</p>	[ ]	[ ]
<p><b>a)</b> Entre 100 e 150 mil reais</p>	[ ]	[ ]
<p><b>b)</b> De 151 a 300 mil reais</p>	[ ]	[ ]
<p><b>c)</b> De 301 a 500 mil reais</p>	[ ]	[ ]
<p><b>d)</b> Maior que 500 mil reais</p>	[ ]	[ ]
<p><b>28.</b> Analisando o contexto geral de seus trabalhos/teses e levando-se em conta os pontos levantados acima, você acha que seus dados são reprodutíveis por outros laboratórios independentes?</p>	[ ]	[ ]
	[ ]	[ ]
	[ ]	[ ]

**QUESTIONÁRIO DESENVOLVIDO PARA AVALIAR A RASTREABILIDADE, CONFIABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DAS PESQUISAS CIENTÍFICAS QUE UTILIZAM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.**

**Pergunta aberta**

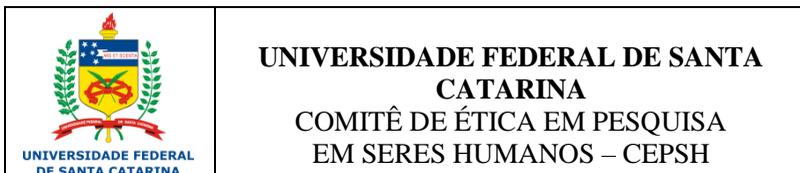
**29.** Qual a hipótese do seu trabalho?

**Caso queira fazer alguma consideração, por favor, fique à vontade, gostaria de saber sua opinião!**

O sistema *ARRIVE* envolve guias desenvolvidos através de uma iniciativa do NC3Rs (National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research), para melhorar a reprodutibilidade dos dados gerados enfatizando a qualidade sanitária dos animais usados, o desenho experimental, o cálculo do tamanho da amostra, a análise estatística correta dos dados, entre outros aspectos. As diretrizes têm o intuito de maximizar as informações coletadas principalmente *in vivo* e minimizar a utilização desnecessária de animais. Os guias *ARRIVE* foram inicialmente publicados no periódico internacional PLOS Biology em 2010, e atualmente diversas revistas internacionais de elevado prestígio científico têm preconizado sua utilização na condução de ensaios *in vivo*.

Email do autor: [edir.rjr@gmail.com](mailto:edir.rjr@gmail.com) ou [edir.rezende@cienp.org.br](mailto:edir.rezende@cienp.org.br)

## 11. APÊNDICE B



### TERMO DE CONCORDÂNCIA

Através deste termo o participante estará ciente dos objetivos do estudo, e poderá decidir participar ou não da pesquisa acadêmica respondendo ao questionário denominado **“QUESTIONÁRIO DESENVOLVIDO PARA AVALIAR A RASTREABILIDADE, CONFIABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DAS PESQUISAS CIENTÍFICAS QUE UTILIZAM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO”**. Trata-se de coleta de dados referente ao projeto de pesquisa para a elaboração da dissertação de mestrado intitulado **“UMA ANÁLISE CRÍTICA SOBRE A CONFIABILIDADE, RASTREABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DOS ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DESENVOLVIDOS NO BRASIL NAS ÁREAS BIOMÉDICAS E PUBLICADOS EM REVISTAS CIENTÍFICAS NACIONAIS E INTERNACIONAIS”** que está sendo realizado pelo aluno de mestrado Edir Rezende Júnior, sob orientação do Professor Dr. João Batista Calixto, junto ao programa de pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Através deste documento o participante autoriza a utilização dos dados coletados para publicação e/ou apresentação pública do conteúdo, desde que sejam respeitados os princípios éticos preconizados na Resolução CNS 466/12, de 12/09/2012 do Conselho Nacional de Saúde. No questionário serão abordados assuntos relacionados ao conhecimento dos participantes a respeito das diretrizes do *ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments)*, bem como da qualidade do trabalho científico envolvendo animais de experimentação. Dentro desta linha de pensamento, o questionário irá abordar os seguintes aspectos: i) o planejamento experimental do projeto de pesquisa, ii) os aspectos metodológicos, iii) o padrão sanitário dos animais utilizados nos ensaios, iv) o conhecimento sobre possíveis vieses que podem ocorrer em experimentação envolvendo animais, v) a análise estatística dos dados etc. Além disso, também é objetivo deste estudo estimular os

pesquisadores e/ou pós-graduandos a utilizarem as diretrizes do *ARRIVE* para o desenvolvimento de estudos envolvendo animais de experimentação, com o intuito de aumentar a confiabilidade e reprodutibilidade dos trabalhos publicados em periódicos nacionais e internacionais.

Além dos pontos acima, abaixo seguem informações adicionais a respeito da utilização dos dados coletados:

- O nome do participante será mantido em absoluto sigilo em todos os registros da pesquisa;
- Não haverá nenhum tipo de contato pessoal entre o pesquisador e participante da pesquisa no momento do preenchimento do questionário;
- Mesmo após o participante ter concordado em participar da pesquisa, se ele desejar, poderá desistir da mesma a qualquer momento;
- Se houver necessidade, o participante poderá entrar em contato com os pesquisadores a qualquer momento para possíveis esclarecimentos desta pesquisa;
- Os dados obtidos na pesquisa serão utilizados para elaboração da dissertação de mestrado que será defendida em defesa pública nas dependências da UFSC;
- Os dados obtidos poderão ser divulgados em outros meios tais como em palestras e/ou publicados em periódicos;
- Não haverá remuneração para aqueles que decidirem participar desta pesquisa;
- O aceite do pesquisador e/ou pós-graduando será efetuado ao acessar o sítio eletrônico onde terá acesso ao questionário: <https://pt.surve.ymonkey.com/r/ERJ82HDLHM>

Desde já agradeço a sua colaboração,

Edir Rezende Júnior

## 12. APÊNDICE C

### QUESTIONÁRIO DESENVOLVIDO PARA AVALIAÇÃO E COLETA DE DADOS SOBRE AS DIRETRIZES *ARRIVE* EM TRABALHOS REALIZADOS NO BRASIL

#### Questões gerais sobre o trabalho a ser avaliado:

Título do Artigo ( ):

Número do Artigo ( ):

Número de Autores ( ):

Parcerias Internacionais (Sim/Não):

Fator de Impacto da Revista ( ):

**Questões específicas sobre o trabalho a ser avaliado. As respostas devem ser assinaladas (sim ou não) quando identificado o alvo da questão no texto do trabalho.**

#### Questões gerais relacionadas as diretrizes *ARRIVE*

No trabalho está descrito:

1 - Se a pesquisa foi realizada de acordo com as diretrizes *ARRIVE* (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*)?

( ) Sim ( ) Não

2 - A hipótese do trabalho? ( ) Sim ( ) Não

3 - O objetivo do estudo? ( ) Sim ( ) Não

#### Questões relacionadas aos animais, descritos nas diretrizes *ARRIVE*

No trabalho está descrito:

1 – Se o comitê de ética aprovou o estudo? ( ) Sim ( ) Não.

2 – A espécie animal utilizada? ( ) Sim ( ) Não.

3 – A linhagem animal utilizada? ( ) Sim ( ) Não.

4 – A idade dos animais utilizados? ( ) Sim ( ) Não.

5 – O sexo dos animais utilizados? ( ) Sim ( ) Não.

6 – O peso dos animais utilizados? ( ) Sim ( ) Não.

- 7 – A procedência das matrizes? ( ) Sim ( ) Não.
- 8 – O número de cruzamentos das matrizes? ( ) Sim ( ) Não.
- 9 – Os critérios de acasalamento? ( ) Sim ( ) Não.
- 10 – Se os animais usados são SPF? ( ) Sim ( ) Não.
- 11 – Se foi realizado a análise da composição da ração?  
( ) Sim ( ) Não.
- 12 – O tipo da maravalha utilizada? ( ) Sim ( ) Não.
- 13 – Se é realizado a esterilização das gaiolas ou caixas?  
( ) Sim ( ) Não.
- 14 – Se é realizado a esterilização da ração ou água?  
( ) Sim ( ) Não.
- 15 – O número de trocas semanais da maravalha? ( ) Sim ( ) Não.
- 16 – Se há enriquecimento ambiental na gaiola? ( ) Sim ( ) Não.
- 17 – Se há controle de temperatura no biotério? ( ) Sim ( ) Não.
- 18 – Se há controle de umidade no biotério? ( ) Sim ( ) Não.
- 19 – Se há controle de luminosidade no biotério? ( ) Sim ( ) Não.

**Questões relacionadas aos métodos, descritos nas diretrizes *ARRIVE***

No trabalho está descrito:

- 1 – Se foi realizado o cálculo no tamanho da amostra experimental?  
( ) Sim ( ) Não.  
Em caso positivo, os autores descrevem a forma como foi realizado o cálculo do tamanho da amostra? ( ) Sim ( ) Não.
- 2 – Se os grupos experimentais foram randomizados? ( ) Sim ( ) Não.  
Em caso positivo, os autores descrevem a forma de randomização?  
( ) Sim ( ) Não.

3 – Se os ensaios foram realizados de forma cega? ( ) Sim ( ) Não.

4 – O número de animais por grupo experimental? ( ) Sim ( ) Não.  
Em caso positivo, o número de animais por grupo é o mesmo em todos os grupos experimentais? ( ) Sim ( ) Não

5 – Se foi utilizado controle positivo em ao menos um experimento?  
( ) Sim ( ) Não

6 – Se foi utilizado controle negativo em ao menos um experimento?  
( ) Sim ( ) Não

7 – A dose dos compostos? ( ) Sim ( ) Não

8 – A via de administração dos compostos? ( ) Sim ( ) Não

9 – A frequência de administração dos compostos? ( ) Sim ( ) Não

10 – Se os autores realizam método cirúrgico? ( ) Sim ( ) Não.

11 - Em caso positivo, os autores descrevem a utilização do (s) anestésico usado? ( ) Sim ( ) Não.

12 – Está descrita o método estatística utilizado? ( ) Sim ( ) Não.  
Em caso positivo, nas legendas estão descritas o tipo de teste utilizado?  
( ) Sim ( ) Não.

13 – Se os ensaios foram realizados em etapas? ( ) Sim ( ) Não.  
Em caso positivo, os autores mencionam se nas etapas continham todos os grupos experimentais ( ) Sim ( ) Não.

14 - Qual foi a medida de precisão dos resultados ex. desvio padrão, erro padrão da média? ( ) Sim ( ) Não.

15 – A procedência dos reagentes utilizados? ( ) Sim ( ) Não

16. Os autores descrevem a fonte dos reagentes usados?  
( ) Sim ( ) Não



## **13. ANEXO**

### **1. Título do manuscrito (ou relatório):**

- ✓ Deve-se fornecer uma descrição precisa e concisa do conteúdo do artigo ou relatório.

### **2. Resumo ou “abstract”:**

- ✓ Escrever um resumo exato incluindo o tema do estudo ou o estado da arte, os objetivos da investigação (incluindo detalhes sobre as espécies ou linhagens animais), principais métodos e resultados e conclusões do estudo.

### **Introdução**

#### **3. Contexto:**

- ✓ **a.** Incluir informação científica suficiente (incluindo referências relevantes de trabalhos anteriores) para entender a motivação e contexto para o estudo e explicar a abordagem experimental;
- ✓ **b.** Explicar como e por que as espécies e modelos animais escolhidos podem tratar os objetivos científicos e, se for o caso, a relevância do estudo para a biologia humana;

#### **4. Objetivos:**

- ✓ Descrever claramente os objetivos do estudo ou as hipóteses específicas que estão sendo testadas.

### **Métodos**

#### **5. Declaração de ética:**

- ✓ Indicar a natureza das permissões éticas e licenças pertinentes (por exemplo, animais e procedimentos científicos), diretrizes nacionais e/ou institucionais para o cuidado e uso de animais, que cobrem a investigação.

#### **6. Plano de estudo:**

- ✓ De acordo com cada experiência, fornecer informações suficientes do desenho do estudo que inclua:
- ✓ **a.** Fornecer os grupos experimentais e os grupos controles.
- ✓ **b.** Para cada experimento, fazer uma breve descrição do desenho experimental, incluindo o número de grupos experimentais e grupo (s) controle (s). Quaisquer medidas tomadas para minimizar os efeitos de vieses subjetivos devem ser descritas, por exemplo, ao distribuir os animais para tratamento (procedimento de randomização) e na avaliação de resultados (cegamento, descrever quem foi cegado e quando).
- ✓ **c.** Nunca esquecer de descrever a unidade experimental (se foi utilizado um único animal, um grupo, uma caixa, etc.).
- ✓ **d.** Uma linha do tempo ou diagrama de fluxo pode ser útil para ilustrar o quão complexo são os desenhos experimentais do estudo realizado.

## **7. Procedimentos experimentais:**

- ✓ Fornecer detalhes precisos de todos os procedimentos realizados, para cada grupo experimental, incluindo os grupos controles.
- ✓ **a.** Como (exemplo: formulação e dose do fármaco, local e via de administração, analgesia e anestesia utilizadas (incluindo o monitoramento), procedimento cirúrgico, método de eutanásia, etc. Sempre informar os detalhes de todos os equipamentos utilizados, incluindo fornecedor (es);
- ✓ **b.** Quando (exemplo: hora do dia);
- ✓ **c.** Onde (exemplo: laboratório, gaiola, labirinto aquático, etc.);
- ✓ **d.** Por que? (Exemplo: a lógica para a escolha do anestésico específico, a via de administração, a dose da droga utilizada, etc.)

## **8. Animais**

### **Animais experimentais:**

- ✓ **a.** Fornecer detalhes dos animais utilizados, incluindo espécie, sexo, estágio do desenvolvimento (faixa de idade) e peso.
- ✓ **b.** Outras informações também são relevantes, tais como a origem dos animais, a nomenclatura internacional de linhagens,

modificações genéticas (knock-out, knock-in, transgênicos, etc), genótipo, perfil imunológico, saúde, utilização de drogas ou testes naíves, procedimentos anteriores, etc.

### **9. Instalações e cuidados com os animais:**

- ✓ **a.** Sempre detalhar o tipo de biotério (SPF ou convencional), tipos de caixas, material utilizado nas camas (maravalha, sabugo de milho, papel, etc.), número de animais por caixa. No caso de peixes, tipo e material do aquário ou tanque.
- ✓ **b.** Dar informações sobre as condições de criação (programa de melhoramento genético, ciclo claro/escuro, temperatura, qualidade da água, etc). Para os peixes, descrever o tipo de alimento e enriquecimento ambiental.
- ✓ **c.** Não se pode esquecer de descrever as avaliações e intervenções, relacionados com o bem-estar animal, que foram realizadas antes, durante ou depois do experimento (exemplo: cama aquecida após procedimento cirúrgico, utilização de analgésicos ou antibióticos, entre outros).

### **10. Tamanho da amostra:**

- ✓ **a.** Especificar o número total de animais utilizados em cada experimento e o número de animais em cada grupo experimental.
- ✓ **b.** Explicar como foi definida a quantidade de animais por grupo (número amostral), detalhando qualquer cálculo utilizado para o tamanho da amostra. Se relevante, indicar o número de replicações independentes de cada experimento.

### **11. Distribuição dos animais nos grupos experimentais:**

- ✓ **a.** Fornecer detalhes completos de como os animais foram distribuídos nos grupos experimentais, incluindo randomização.
- ✓ **b.** Descrever a ordem em que os animais dos diferentes grupos experimentais foram tratados e avaliados.

### **12. Resultado experimental:**

- ✓ **a.** Definir claramente os resultados experimentais primários e secundários (exemplo: morte celular, marcadores moleculares, alterações comportamentais, etc.).

### **13. Métodos estatísticos:**

- ✓ **a.** Informar detalhes dos métodos estatísticos utilizados para cada análise.
- ✓ **b.** Especificar a unidade de análise para cada conjunto de dados (exemplo: um único animal, um grupo de animais, uma única célula, etc.).
- ✓ **c.** Descrever quaisquer métodos utilizados para avaliar se os dados cumprem os pressupostos da abordagem estatística escolhida.

### **14. Resultados:**

#### **Dados de base (baseline):**

- ✓ **a.** Para cada grupo experimental, mencionar características relevantes e estado de saúde dos animais (exemplo: peso, estado microbiológico, etc.) antes do tratamento ou teste (estas informações podem ser tabuladas).

### **15. Números analisados:**

- ✓ **a.** Informar o número de animais em cada grupo, incluído em cada análise, utilizando números absolutos (exemplo: 10/20, e não 50%).
- ✓ **b.** Se qualquer animal ou dado não for incluído na análise, explicar o porquê.

### **16. Resultados e estimativas:**

- ✓ **a.** Informar os resultados de cada análise realizada, com uma medida de precisão (exemplo: erro padrão ou intervalo de confiança).

**17. Eventos adversos:**

- ✓ **a.** Fornecer detalhes de todos os eventos adversos (contrários, antagonísticos, desconformes) importantes em cada grupo experimental. Descrever qualquer modificação nos protocolos experimentais que tenham sido realizadas para reduzir os eventos adversos.

**18. Discussão****Interpretação e implicações científicas:**

- ✓ **a.** Interpretar os resultados, levando em consideração os objetivos do estudo, as hipóteses, a teoria atual, e outros estudos relevantes da literatura.
- ✓ **b.** Comentar sobre as limitações do estudo, incluindo todas as fontes potenciais de viés, as limitações dos modelos animais e a imprecisão associada com os resultados.
- ✓ **c.** Descrever todas as implicações dos métodos e resultados experimentais para a substituição, aperfeiçoamento ou redução (3Rs) do uso de animais em pesquisa.

**19. Generalização/ translação:**

- ✓ **a.** Comentar se e como os resultados do estudo são susceptíveis de serem traduzidos (translação) para outras espécies ou sistemas, incluindo qualquer relevância para a biologia humana.

**20. Apoio financeiro/ financiamento:**

- ✓ **a.** Listar todas as fontes de financiamento (incluindo número de concessão) e o papel do (s) financiador (es) no estudo (Kilkenny et al, 2010).