

**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO DE MEDICINA**

MARIA EDUARDA KOBAYASHI TEIXEIRA

**QUALIDADE METODOLÓGICA DE ESTUDOS EXPERIMENTAIS COM
CANABINÓIDES NA DOENÇA DE ALZHEIMER: UMA REVISÃO
SISTEMÁTICA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

SALVADOR – BA

2023

MARIA EDUARDA KOBAYASHI TEIXEIRA

**QUALIDADE METODOLÓGICA DE ESTUDOS EXPERIMENTAIS COM
CANABINÓIDES NA DOENÇA DE ALZHEIMER: UMA REVISÃO
SISTEMÁTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Graduação de Medicina da Escola Bahiana de
Medicina & Saúde Pública como requisito para
aprovação discente no quarto ano do curso.
Orientador(a): Dr. Thiago de Faria Junqueira.

SALVADOR – BA

2023

Dedico este texto para a minha querida avó, Angélica Maria Filgueiras da Fonseca. Serei eternamente grata por todo seu apoio e amor. Obrigada por ser a bússola moral e ética da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Thiago de Faria Junqueira, pela confiança no trabalho desenvolvido e pela orientação formidável ao longo da escrita dessa tese.

À Prof.^a Alcina Andrade, pelas correções rigorosas e pelas cobranças compreensivas.

À minha família – mãe, Cati, Clara e João. Agradeço por todos os sacrifícios que foram feitos nos últimos anos, para que eu pudesse continuar o curso e me dedicar aos estudos.

Aos colegas da turma B2, do 8º semestre do Curso de Medicina. Obrigada pelos ombros amigos, pelas escutas ativas e por protegerem a minha sanidade ao longo do processo.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A doença de Alzheimer é uma condição neurodegenerativa que causa deterioração cognitiva e perda de memória, afetando a qualidade de vida dos indivíduos. Os tratamentos disponíveis incluindo inibidores de colinesterase e memantina foram previamente validados em modelos experimentais, sendo estes importantes para descoberta de novas modalidades terapêuticas. Logo, a investigação da disparidade experimental e clínica para o seu tratamento da Doença de Alzheimer por meio do uso de canabinoides poderá elucidar ou suscitar hipóteses inovadoras para as aplicações medicinais. **OBJETIVO:** Avaliar a qualidade metodológica dos modelos experimentais da Doença de Alzheimer com roedores, que empregaram os canabinoides como intervenção terapêutica. **MÉTODOS:** Esta revisão sistemática foi guiada pelo Protocolo PRISMA. As buscas bibliográficas foram realizadas nas plataformas MEDLINE/Pubmed, Scielo e LILACS, respeitando os descritores (“NOME DO MODELO EXPERIMENTAL COM ROEDORES”) AND (“CANABINÓIDES”). Extraíu-se dos artigos selecionados informações referentes ao tipo de modelo experimental, à intervenção terapêutica com canabinóides e à avaliação dos déficits cognitivos dos roedores. Ademais, aplicou-se o Protocolo ARRIVE para avaliação da qualidade metodológica, assim como a Ferramenta SYRCLE’s RoB para averiguar o risco de viés. **RESULTADOS:** Um total de cinco artigos foram incluídos na análise da revisão. Destes, todos apresentaram moderada qualidade de evidência. Apenas um apresentou baixo risco de viés, enquanto três obtiveram a classificação de moderado risco e um de alto risco de viés. Vale ressaltar que foi identificada uma importante heterogeneidade entre os estudos. **CONCLUSÃO:** Os estudos analisados demonstraram uma qualidade metodológica pouco satisfatória. Logo, os experimentos de bancada devem ser reavaliados antes de serem aplicados clinicamente em seres humanos. Assim, haja vista os resultados desta revisão, o uso de canabinoides para tratamento do Alzheimer requer ainda mais estudos experimentais que venham a embasar a pesquisa clínica em humanos.

Palavras-chave: Pesquisa Básica; Estudos Experimentais; Canabinoides; Doença de Alzheimer; Revisão Sistemática.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Alzheimer's disease is a neurodegenerative condition that causes cognitive deterioration and memory loss, affecting the quality of life of individuals. Available treatments, including cholinesterase inhibitors and memantine, have previously been validated in experimental models, which are important for the discovery of new therapeutic modalities. Therefore, investigating the experimental and clinical disparity for the treatment of Alzheimer's disease through the use of cannabinoids may elucidate or generate innovative hypotheses for its medical applications. **OBJECTIVE:** To evaluate the methodological quality of experimental studies utilizing rodent models of Alzheimer's Disease, that employed cannabinoids as a therapeutic intervention. **METHODS:** This systematic review followed the PRISMA Protocol. Literature searches were conducted on MEDLINE/Pubmed, Scielo, and LILACS platforms, using the descriptors ("RODENT EXPERIMENTAL MODEL NAME") AND ("CANNABINOIDS"). Selected articles provided information on the type of experimental model, therapeutic intervention with cannabinoids and evaluation of cognitive deficits in rodents. Additionally, the ARRIVE Protocol was applied to assess methodological quality and the SYRCLE's RoB Tool was used to investigate the risk of bias. **RESULTS:** A total of five articles were included in the review analysis. All of them exhibited moderate quality of evidence. Only one had a low risk of bias, while three were classified as having a moderate risk, and one as having a high risk of bias. It's important to note that significant heterogeneity was identified among the studies. **CONCLUSION:** The analyzed studies demonstrated unsatisfactory methodological quality. Thus, in light of the results of this review, the use of cannabinoids for Alzheimer's treatment still requires further experimental studies to support clinical research in humans.

Key-words: Basic Research; Experimental Studies; Cannabinoids; Alzheimer Disease; Systematic Review.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVO.....	12
3 REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 Fisiopatologia da Doença de Alzheimer e farmacologia dos canabinoides....	13
3.2 Modelos experimentais para a doença de alzheimer – avanços, tipos, vantagens e desvantagens	15
3.3 Críticas para a divergência entre estudos experimentais e clínicos	20
4 METODOLOGIA	21
4.1 Desenho do estudo	21
4.2 Estratégia de busca.....	21
4.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	24
4.4 Identificação e seleção de artigos	24
4.5 Variáveis de interesse	24
4.6 Avaliação da qualidade metodológica	25
4.7 Avaliação do risco de viés	25
4.8 Extração e análise de dados	26
4.9 Aspectos éticos	26
5 RESULTADOS.....	27
5.1 Fluxograma PRISMA	27
5.2 Variáveis de interesse	28
5.3 Avaliação da qualidade metodológica	33
5.4 Avaliação do risco de viés	33
6 DISCUSSÃO.....	35

6.1	Modelos Experimentais da Doença de Alzheimer.....	35
6.2	Heterogeneidade na Avaliação da Neurodegeneração & dos Déficits Cognitivos	37
6.3	Avaliação da Qualidade Metodológica & do Risco de Viés	38
6.4	Considerações Finais	39
7	CONCLUSÃO	40
8	REFERÊNCIAS	41
	APÊNDICE A	45
	APÊNDICE B.....	48

1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 1960 o Brasil vivencia uma transição populacional importante, caracterizada inicialmente pela redução da mortalidade, seguida pela diminuição das taxas de natalidade.(1) Ao mesmo tempo, os avanços científicos na área da saúde propiciaram um aumento significativo na expectativa e na qualidade de vida dos cidadãos – por mais que ainda haja uma evidente disparidade entre classes.(2)

Inclusive, de acordo com o censo do IBGE realizado em 2020, têm-se que a população idosa brasileira engloba em torno de 30 milhões de indivíduos. Vale ressaltar que 80,4% desse público – apesar das dificuldades – desfruta de certo grau de independência e autonomia.(2) Por isso, o envelhecimento de uma população deve ser compreendido não apenas como uma mudança demográfica, mas também como uma transformação socioeconômica, política e cultural protagonizada pelos idosos.

Ademais, tais alterações demográficas refletem de forma direta na epidemiologia das doenças que acometem a população do país. Acredita-se que nos últimos 50 anos o perfil de morbimortalidade brasileiro apresentou uma coexistência entre doenças infecciosas e aquelas que não são transmissíveis – majoritariamente representadas pelas doenças crônicas e neurodegenerativas.(3)

Nesse contexto, 13,6% dos idosos manifestam alguma dependência social, já que apresentam demências – sendo a Doença de Alzheimer a mais prevalente - ou outras deficiências cognitivas.(2) Isto posto, é preciso frisar que a redução das capacidades funcionais do indivíduo – fisiológica ou patologicamente – culmina em diversos problemas, que vão desde a limitação da qualidade de vida até a sobrecarga financeira e emocional dos cuidadores.(2–4)

Logo é possível prever que com o crescimento do grupo etário da terceira idade a sociedade brasileira enfrentará tanto desafios previdenciários, quanto assistenciais – a fim de garantir o acesso adequado dos idosos aos serviços sociais.(3) A Doença de Alzheimer (DA), em especial, tem como principal fator de risco a idade avançada (a taxa de incidência é duplicada a cada 5 anos após os 65 anos de idade), sendo que inúmeros pacientes apresentam outras comorbidades que elevam o número – absoluto ou relativo – de internações hospitalares.(5)

Sobretudo, o tratamento atual da Doença de Alzheimer busca somente o alívio sintomatológico, sem representar melhoras nas taxas de sobrevida nem no retardamento do declínio das capacidades cognitivas.(5) Diante dessa ineficácia terapêutica, a gravidade e

sintomatologia do distúrbio acabam por seguir seus cursos naturais, o que aumenta a ocorrência e o custo das emergências derivadas da agudização episódica da doença.(6)

Contextualizando alguns indicadores têm-se que, para a Doença de Alzheimer, a taxa de hospitalização em cada 100 mil habitantes é a maior dentre as doenças crônicas. (6) E no ano de 2016, considerando-se o cenário internacional, as demências foram a quinta principal causa de óbito do mundo – segundo o Estudo da Carga Global de Doenças executado naquele ano. (7) Porém, mesmo antes do falecimento dos pacientes, a Doença de Alzheimer já ostenta gastos notáveis – que envolvem os cuidados domiciliares informais ou institucionais e profissionais.(8)

Enquanto isso, no universo farmacológico, carecem intervenções que sejam capazes de frear o déficit cognitivo dos pacientes. De acordo as recomendações da Academia Brasileira de Neurologia (ABN) – publicadas em 2005 – os únicos tratamentos padronizados aplicavam inibidores da acetilcolinesterase (ex: Rivastigmina) e/ou medicamentos glutamatérgicos (ex: Memantina).(9) Simultaneamente, poucas evidências normativas propõem o controle dos sintomas neuropsiquiátricos da doença – por mais que benzodiazepínicos e antipsicóticos sejam utilizados com bastante frequência.(9,10) Portanto, na prática clínica, o tratamento medicamentoso da Doença de Alzheimer tende a possuir riscos relacionados à polifarmácia – seja pelas comorbidades dos pacientes ou pelas demandas do quadro.(11) Isso implica também em um menor custo-benefício, já que poucos medicamentos específicos são disponibilizados pelo SUS.(12)

Devido a tais contextos, por sua vez, há uma demanda por tratamentos que possam alterar o curso da doença ou amenizar os sintomas com menos efeitos colaterais. Nesse sentido, a experimentação com o uso de medicamentos que atuem sobre novos alvos terapêuticos - como o relativamente recém-descoberto sistema endocanabinoide - pode representar uma alternativa promissora. Este sistema atua em diversas funções cognitivas – desde a memória até as regulações emocionais, estando presente em todos os animais, incluindo vertebrados (mamíferos, aves, répteis e peixes) e invertebrados.(13) Assim, diferentes testes farmacêuticos podem ser realizados – inclusive utilizando substâncias como os canabinoides.

Contudo, mesmo diante de considerável literatura sobre as potencialidades neurobiológicas dos derivados da *Cannabis sativa* (fitocannabinoides), é preciso salientar a escassez de evidências clínicas de moderada-alta qualidade que embasem a aplicação terapêutica dessas substâncias, como será abordado adiante. (14)

Tal enfática discrepância clínica e experimental suscita algumas reflexões. Apesar da grande diversidade de modelos experimentais – in vitro ou in vivo – para o estudo de possíveis terapêuticas para a doença, a maioria deles utiliza padrões da Doença Familiar do Alzheimer de Início Precoce (FAD) que possui propriedades diferentes e menor prevalência na população do que a Doença de Alzheimer Esporádica de Início Tardio (SAD).(15,16) É importante frisar que os modelos com roedores transgênicos são, atualmente, os mais viáveis e que os animais não possuem a Doença de Alzheimer *per se*, mas sim expressam certas características fisiopatológicas desse distúrbio após terem seus materiais genéticos modificados. Dentre eles, o que mais se aproxima dos atributos humanos é o modelo 3xTg.(16)

Entretanto, é difícil comparar os modelos de experimentos, já que cada fenótipo patológico depende do tipo de mutação FAD induzida, do promotor bioquímico utilizado e da espécie e linhagem dos roedores que servirão de “cobaias”. (16) Ainda é necessário considerar certos fatores como a proximidade genética e biológica das amostras com os seres humanos, o custo dos experimentos, questões éticas acerca da experimentação com animais e o tamanho dos grupos comparativos.(15,16)

Partindo-se da ampla utilização dos modelos FAD em animais, dúvidas sobre a validade dos modelos têm sido levantadas pela comunidade científica, pois há uma baixa taxa de sucesso na conversão dos achados para o desenvolvimento de conclusões clínicas. Tendo em mente tais limitações, ainda se faz necessário averiguar se os estudos experimentais existentes são capazes de responder às questões de interesse terapêutico propostas. Portanto, para melhor investigar esse tema, faz-se mister avaliar a qualidade metodológica dos estudos experimentais realizados até o momento.

A Doença de Alzheimer tem elevada prevalência na população idosa e relevante morbimortalidade no Brasil e no mundo, constituindo-se em crescente foco de atenção em saúde haja vista o envelhecimento populacional. Assim sendo, a investigação da disparidade experimental e clínica para o seu tratamento por meio do uso de canabinoides poderá elucidar ou suscitar hipóteses inovadoras para as aplicações medicinais, bem como contribuir para a evolução do estado da arte sobre o assunto. Desta forma, tanto a comunidade acadêmica quanto os pacientes acometidos pela doença poderiam se beneficiar das descobertas de evidências e da aplicabilidade desse recurso terapêutico.

2 OBJETIVO

Avaliar a qualidade metodológica dos modelos experimentais da Doença de Alzheimer com roedores, que empregaram os canabinoides como intervenção terapêutica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fisiopatologia da Doença de Alzheimer e farmacologia dos canabinoides

A fisiopatologia da Doença de Alzheimer (DA) é essencialmente explicada pelo acúmulo de proteínas desconfiguradas, que resulta em déficits energéticos por estresse oxidativo e disfunções sinápticas ocasionadas pela neuroinflamação (ativação persistente da micróglia). (17,18) *A priori*, tais danos são provocados pelas placas de peptídeos β -amiloides – subprodutos enzimáticos que apresentam efeitos citotóxicos devido ao ataque à citocromo C oxidase (carregadora de elétrons). Conseqüentemente, a diminuição da síntese de ATP e a superprodução de espécies reativas de oxigênio culminam no estímulo à apoptose.(17)

Com a evolução da doença, os emaranhados de proteína Tau passam a afetar os neurônios piramidais – localizados no córtex (cognição), no hipocampo (memória) e nas amígdalas (comportamento) – sinalizando uma piora no quadro. Por isso, os biomarcadores da proteína Tau são indicadores de gravidade da Doença de Alzheimer. Dessa forma, as células neuronais sofrem alterações sinápticas como a perda receptores nicotínicos da acetilcolina e a limitação da secreção pré-sináptica desse neurotransmissor.(17,19)

Concomitantemente, as lesões cerebrais freiam a biogênese de neurotransmissores em neurônios colinérgicos, o que restringe a neuroplasticidade.(17) Em razão disso, os inibidores da colinesterase só são eficazes nos estágios iniciais da Doença de Alzheimer, apresentando pouca aplicabilidade clínica nos casos moderados-graves. (17,19) Logo, tais pacientes possuem maior risco para desenvolvimento de complicações vasculares associadas ao quadro demencial, devido à angiopatia amiloide cerebral secundária.(11,16)

Sob essa perspectiva, a modulação do sistema endocanabinoide é, teoricamente, uma alternativa possível para a redução dos danos fisiopatológicos Doença de Alzheimer – pelo menos quando são consideradas as evidências experimentais que serão abordadas neste estudo.

Os fitocannabinoides mais empregados na prática clínica são o THC (Δ -9-tetrahydrocannabinol) e o CBD (Canabidiol) que demonstraram ter efeitos similares às substâncias produzidas pelo corpo humano – respectivamente, AEA (N-araquidoniletolamina) e 2-AG (2-araquinoilglicerol).(18) Tais substâncias, por sua vez, atuam sobre os receptores endocannabinoides CB1 e CB2. A transcrição e tradução dos receptores é regulada pelos genes CRN1 e CRN2, sendo que apresentam características específicas:

- Os receptores CB1 podem ser encontrados no Sistema Nervoso Central, nas células endoteliais e nos adipócitos, além de serem pré-sinápticos.

- Em contrapartida, os receptores CB2 estão – na maioria dos casos – dispostos nos órgãos e células imunes circulantes, bem como espalhados pelo Sistema Nervoso Periférico. Logo, são pós-sinápticos.

Ademais, ambos se correlacionam por meio de um mecanismo de regulação retrógrada (downregulation). Ao ser sensibilizado pelos endo ou fitocanabinoides, CB1 inibe a adenilato ciclase, interferindo no funcionamento dos canais de cálcio voltagem dependentes.(18) Por consequência, há o bloqueio da liberação dos neurotransmissores GABA (inibitório) e Glutamato (excitatório) – desencadeando alterações cognitivas, mnemônicas, executivas, sensoriais, motoras e emocionais. (18,20,21)

Sob outro ângulo, os receptores CB2 estão vinculados a imunomodulação e neuroproteção, já que reduzem a produção de fatores inflamatórios e evitam a degradação do AEA e do 2-AG, que são derivados do ácido araquidônico.(18,20,21) A propósito, o uso do THC com o CBD e os demais fitocanabinoides potencializa a ação destas substâncias, reduzindo os danos colaterais secundários ao consumo de doses elevadas – esse efeito é conhecido como “*entourage*” ou “comitiva”. (22)

Ainda é preciso ressaltar que o THC possui maior afinidade química pelos receptores CB1, então é capaz de articular as funções mnemônicas e cognitivas de acordo com um modelo bifásico dose-paciente-dependente: para indivíduos mais velhos, uma menor concentração é capaz de reduzir o declínio das capacidades funcionais, mas nos jovens as aplicações apresentam efeitos deletérios e adversos. (22)

Portanto, na Doença de Alzheimer, os receptores CB1 podem estar nitrosilados – tendo danos anexos às proteínas G – apresentando problemas sinápticos. Paralelamente, há uma “upregulation” da FAAH (amida-hidrolase de ácidos graxos) e da MAGL (monoacilglicerol-lipase), enzimas responsáveis pela degradação do AEA e do 2-AG, o que implica em uma maior neuroinflamação. (20,21)

Nesse sentido, estudos experimentais já foram capazes de demonstrar que o THC inibe competitivamente a acetilcolina – como na estratégia colinérgica – assim como previne o acúmulo de peptídeos β -amiloides. E, com a administração do CBD, é possível estimular a neuroproteção através da permeabilidade seletiva da barreira hemato-encefálica, da contenção da atividade microglial e do sequestro dos radicais livres (efeito *scavenger*). Ademais, os canabinoides também podem atuar sobre a regulação de outros receptores – $A_{2A}R$ e $PPAR_{\gamma}$ - promovendo efeitos anti-inflamatórios potentes.(20,21,23) Entretanto, devido à

heterogeneidade metodológica dos modelos experimentais, torna-se mais difícil concluir que esses resultados poderiam ser clinicamente significativos em seres humanos.

3.2 Modelos experimentais para a doença de alzheimer – avanços, tipos, vantagens e desvantagens

Os modelos experimentais são fundamentais para realizar testes pré-clínicos de intervenções terapêuticas inovadoras.(16) Em teoria, o experimento ideal precisa ser fisiopatologicamente similar à doença estudada, as cobaias devem apresentar sintomatologia parecida com os pacientes humanos e o estudo necessita de certa reprodutibilidade e poder. Para a Doença de Alzheimer, por sua vez, existem – segundo dados de 2021 – 189 modelos experimentais com camundongos e 16 com ratos, sendo que os roedores são os animais mais utilizados em estudos de bancada. (15) Todavia, a grande maioria desses modelos com roedores apresenta falhas importantes quanto à expressão de emaranhados da proteína Tau e de evolução da perda neuronal. Isso ocorre porque parte significativa dos modelos são transgênicos, além de simularem a FAD – que é menos prevalente em seres humanos. (16)

Apesar da transgenia ser o mecanismo de indução de doença mais aplicado, existem outros que também são relevantes, como os interventivos e os naturais.(15) Nos modelos interventivos, peptídeos β -amiloides sintéticos ou humanos - coletados de pacientes com Doença de Alzheimer – são injetados no encéfalo dos animais por meio de procedimentos minimamente invasivos. (15) Outras moléculas tendem a ser simultaneamente inoculadas, para simular de modo mais fidedigno a fisiopatologia do distúrbio. Além disso, quando esse método preferencial não pode ser realizado, os cientistas ainda podem recorrer ao “plano B” que requer uma bulbectomia parcial, a partir da remoção cirúrgica de ambos os bulbos olfatórios.(15) Através dessas intervenções, é possível replicar a neurodegeneração da Doença de Alzheimer, graças à neuroinflamação e ao estresse oxidativo. Contudo, os animais não apresentarão emaranhados fibrilares da proteína Tau e não produzirão placas amiloides extensas.(15,16)

Em contrapartida, os modelos naturais fundamentam-se na aceleração da senescência dos próprios animais. Os camundongos P8 (SAMP8), por exemplo, apresentam alterações neurodegenerativas espontâneas após serem submetidos à precipitação do quadro de vetustez.(15) Ademais, um segundo tipo de modelo natural, representado pelos ratos OXYS suscitou uma nova hipótese para o surgimento da patologia SAD: a cascata mitocondrial. Porém, esse modelo apresenta alguns fatores de confusão que precedem o quadro

característico da Doença de Alzheimer, por isso não tem um uso tão difundido no meio científico. (15,16)

Isto posto, os modelos com roedores transgênicos possuem maior verossimilhança com a FAD humana.(15) Entretanto, há uma evidente heterogeneidade entre os tipos de experimentos – desde a fisiopatologia até a aferição dos déficits cognitivos – que dificulta a comparação dos resultados de cada estudo.(16) Diversas subespécies de roedores transgênicos foram desenvolvidas ao longo dos anos, sendo que 12 são laboratorialmente relevantes (Tabela 1).(15,16)

TABELA 1 – Tipos de Modelos Experimentais com Roedores para a Doença De Alzheimer (Adaptação de Vignon *et al.* & Drummond *et al.*)

MODELO	MUTAÇÃO	CARACTERÍSTICAS
PDAPP (Camundongo)	APP ^{V717F} (Indiana)	Formação de placas β -amiloides difusas no córtex e no hipocampo. Há também um quadro de angiopatia amiloide cerebral secundária com sinais de gliose. E os animais apresentaram déficits sinápticos e cognitivos. <i>Não há neurodegeneração evidente em exames de imagem nem formação de emaranhados de proteína Tau.</i>
Tg2576 (Camundongo)	APP ^{K670N,M671L} (Swedish Doble)	Inicialmente, há formação de placas β -amiloides focais em regiões do córtex (frontal, temporal e entorrinal). Posteriormente, ocorre a formação de placas difusas no hipocampo e no cerebelo. Há também um quadro de angiopatia amiloide cerebral secundária com sinais de gliose. E os animais apresentaram déficits sinápticos e cognitivos. <i>Não há neurodegeneração evidente em exames de imagem nem formação de emaranhados de proteína Tau.</i>
APP23 (Camundongo)	APP ^{K670N,M671L} (Swedish Doble)	Formação de poucas placas β -amiloides no córtex e subcórtex, porém maior presença de emaranhados fibrilares de peptídeos β -amiloides no hipocampo, no tálamo e nas amígdalas. Os animais apresentam um quadro de angiopatia amiloide cerebral secundária mais proeminente, porém não têm

		<p>déficits sinápticos significativos – apesar dos déficits cognitivos estarem presentes.</p> <p><i>Há neurodegeneração hipocampal nos exames de imagem, mas não ocorre formação de emaranhados de proteína Tau.</i></p>
<p>J20 (Camundongo)</p>	<p>APP^{V717F} (Indiana)</p> <p>APP^{K670N,M671L} (Swedish Doble)</p>	<p>Formação de placas β-amiloides difusas no hipocampo e no córtex. Há também um quadro de angiopatia amiloide cerebral secundária com sinais de gliose e neuroinflamação mediada por astrócitos. E os animais apresentaram déficits sinápticos e cognitivos.</p> <p><i>Há neurodegeneração hipocampa nos exames de imagem, mas não ocorre formação de emaranhados da proteína Tau.</i></p>
<p>APP/PS1 (Camundongo)</p>	<p>APP^{K670N,M671L} (Swedish Doble)</p> <p>PSEN1^{L166P}</p>	<p>Formação de emaranhados fibrilares de peptídeos β-amiloides nas regiões do córtex, do hipocampo, do tálamo, do núcleo estriado e do tronco cerebral. Os animais raramente apresentam angiopatia amiloide cerebral secundária, mas desenvolvem déficits cognitivos e sinápticos.</p> <p><i>Há neurodegeneração na área do giro denteado, mas não ocorre formação de emaranhados de proteína Tau.</i></p>
<p>5xFAD (Camundongo)</p>	<p>APP^{K670N,M671L} (Swedish Doble)</p> <p>APP^{V717I} (Londres)</p> <p>APP^{1716V} (Florida)</p> <p>PSEN1^{M146L}</p> <p>PSEN1^{L286V}</p>	<p>Formação de placas β-amiloides na região do córtex, subcórtex, hipocampo, bulbo olfatório e tronco cerebral. Os animais não apresentam angiopatia amiloide cerebral secundária, mas desenvolvem déficits cognitivos e sinápticos significativos.</p> <p><i>Há neurodegeneração focal no córtex e subcórtex, mas não ocorre formação de emaranhados de proteína Tau.</i></p>
<p>3xTg (Camundongo)</p>	<p>APP^{K670N,M671L} (Swedish Doble)</p>	<p>Formação de placas β-amiloides difusas na região do córtex e do hipocampo. Os animais apresentam</p>

	<p>PSEN1^{M146V}</p> <p>MAPT^{P301L}</p>	<p>angiopatia amiloide cerebral secundária com sinais de gliose e também desenvolvem déficits sinápticos e cognitivos.</p> <p><i>Há neurodegeneração cortical e formação de emaranhados fibrilares de proteína Tau no hipocampo (primário) e no córtex (secundário).</i></p>
<p>Tg-SwDI (Camundongo)</p>	<p>APP^{K670N,M671L} (Swedish Doble)</p> <p>APP^{E693Q} (Dutch)</p> <p>APP^{D694N} (Iowa)</p>	<p>Formação de placas β-amiloides difusas e perivasculares, que estão presentes na região do córtex, subcórtex, hipocampo, tálamo e bulbo olfatório. Os animais desenvolvem uma angiopatia amiloide cerebral secundária relevante, que acomete principalmente o tálamo e as meninges. Também apresentam déficits cognitivos e sinápticos.</p> <p><i>Há neurodegeneração colinérgica focal, mas não ocorre a formação de emaranhados da proteína Tau.</i></p>
<p>APPE693Δ-Tg (Camundongo)</p>	<p>APP^{E693Δ}</p>	<p>Os animais não apresentam a formação de placas β-amiloides, nem desenvolvem angiopatia amiloide cerebral secundária. Porém, apresentam déficits cognitivos e sinápticos.</p> <p><i>Há neurodegeneração hipocampal, mas não ocorre formação de emaranhados de proteína Tau.</i></p>
<p>APP knock in NL-GF (Camundongo)</p>	<p>APP^{K670N,M671L} (Swedish Doble)</p> <p>APP^{E693G}</p> <p>APP^{1716F}</p>	<p>Formação de placas β-amiloides nas regiões do córtex e do hipocampo. Os animais não desenvolvem angiopatia amiloide cerebral secundária e apresentam poucos déficits sinápticos e cognitivos.</p> <p><i>Não há neurodegeneração evidente nem formação de emaranhados de proteína Tau.</i></p>
<p>McGill-R-Thy1-APP (Rato)</p>	<p>APP^{V717F} (Indiana)</p> <p>APP^{K670N,M671L} (Swedish Doble)</p>	<p>Formação de placas β-amiloides difusas na região do córtex (principalmente entorrinal) e hipocampo. Os animais não desenvolvem angiopatia amiloide cerebral secundária, nem déficits sinápticos. Contudo, apresentam alguns déficits cognitivos.</p>

		<i>Há neurodegeneração focal no subcórtex, mas não ocorre a formação de emaranhados de proteína Tau.</i>
TgF344-AD (Rato)	APP ^{K670N,M671L} (Swedish Doble) PSEN1 ^{AE9}	Formação de placas β-amiloides no hipocampo, no córtex, no núcleo estriado e no cerebelo. Os animais apresentam angiopatia amiloide cerebral secundária e também déficits cognitivos – apesar da ausência de déficits sinápticos. <i>Há neurodegeneração cortical e hipocampal, mas não ocorre a formação de emaranhados de proteína Tau.</i>

Complementando-se as informações contidas na tabela, têm-se que:

- A maioria dos modelos com camundongos laboratorialmente relevantes apresenta como característica fisiológica a formação de placas β-amiloides – concentradas no córtex e hipocampo. Ademais, tendem a cursar com danos cognitivos referentes à memória espacial. Contudo, esses modelos são limitados na medida em que não exemplificam a neurodegeneração nem a atrofia neuronal típicas da Doença de Alzheimer.(15,16)
- Ainda quanto aos modelos experimentais com camundongos, apenas o tipo 3xTg desenvolve emaranhados de proteína Tau. Porém, os animais evoluem com déficits motores consideráveis que interferem na testagem cognitiva. E, a coexistência entre placas β-amiloides e proteína Tau ocorre apenas em fases tardias, o que exige uma observação temporal dos experimentos mais extensa.(15,16)
- Existem modelos atípicos com camundongos – como o Tg-SwDI e o APPE693Δ-Tg – que buscam elucidar características específicas da Doença de Alzheimer. Logo, são úteis para testar a aplicabilidade terapêutica de tratamentos voltados para o controle dos sintomas ou melhora do quadro de angiopatia amiloide cerebral secundária.(15,16)
- Atualmente, os modelos “knock-in” representam uma aposta promissora para a criação de modelos fisiologicamente mais verossímeis à Doença de Alzheimer. Isso é possível por meio da ativação genômica de certas mutações APP e também graças a alteração da composição dos peptídeos β-amiloides dos camundongos, que se tornam similares aos humanos.(15,16)

- Enfim, os modelos experimentais com ratos apresentam algumas vantagens extras ao serem comparados com os de camundongos. Por exemplo, os exames de imagem para avaliação dos danos morfológicos são realizados com maior facilidade. Além disso, os ratos apresentam fenótipos comportamentais ricos em diversidade, o que possibilita a utilização de testes cognitivos complexos para averiguar o declínio da cognição dos animais. (15,16)

Ao escolher o modelo experimental a ser utilizado no estudo é preciso levar em conta o fato de que nenhum dos modelos existentes é capaz de replicar todas as características fisiopatológicas da Doença de Alzheimer. Por consequência, por mais que os modelos transgênicos sejam os mais difundidos, poucos resultam na síntese de placas β -amiloides e de emaranhados de proteína Tau – que são pré-requisitos para a confirmação do diagnóstico e estratificação da gravidade da Doença de Alzheimer em humanos. (15)

É necessário ressaltar que até os testes para averiguar os déficits cognitivos dos animais ainda não foram padronizados. Portanto, é provável que parte da heterogeneidade dos resultados se deva a erros de aferição.(16) Dessa forma, a melhor alternativa é realizar experimentos com mais de um modelo, de forma que as conclusões sejam complementares, até que um tipo de modelo fidedigno surja.

3.3 Críticas para a divergência entre estudos experimentais e clínicos

De acordo com uma revisão sistemática recentemente publicada na plataforma Cochrane, que tomou como base quatro estudos com tamanhos amostrais relativamente pequenos, de curta duração e heterogêneos, não foi possível inferir se os canabinoides possuem, de fato, efeitos benéficos para o tratamento das demências.(24)

De forma similar, o mapeamento de evidências sobre o uso terapêutico dos canabinoides produzido por Montero-Oleas et al. concluiu que, por causa de limitações e falhas metodológicas, grande parte das evidências clínicas possuíam baixa-moderada qualidade. Logo, os estudos relacionados com a Doença de Alzheimer e outras demências seriam em grande parte inconclusivos. (25) Por fim, é preciso que a transição experimental-clínica ocorra de forma mais suave e que novos estudos, com maior poder e significância estatística, sejam realizados.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

O presente estudo trata-se de uma revisão sistemática da literatura, guiada pelo protocolo *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analysis* (PRISMA).

4.2 Estratégia de busca

As buscas bibliográficas ocorreram durante o período de 30 de Abril de 2023 até 30 de Maio de 2023 – totalizando a duração de 1 mês para a coleta de artigos. Concomitantemente, as bases de dados eletrônicas utilizadas foram a MEDLINE/PubMed, a Scielo e a LILACS. Quanto as estratégias de busca, têm-se que transcorreram individualmente, respeitando os seguintes descritores: (“NOME DO MODELO EXPERIMENTAL COM ROEDORES”) AND (“CANABINÓIDES”). Os termos empregados possuíam relação com os tipos de estudo de interesse e com a intervenção a ser investigada. Vale ressaltar que foram inclusos os sinônimos pertinentes identificados na plataforma DeCS e que, por isso, a pesquisa inicial alcançou publicações escritas em inglês e português. As estratégias de busca utilizadas foram descritas considerando o número de resultados encontrados (Tabela 2).

TABELA 2 – Estratégias de Busca empregadas nas Bases de Dados (MEDLINE/PubMed, Scielo e LILACS).

MODELO EXPERIMENTAL	ESTRATÉGIA DE BUSCA	Nº DE RESULTADOS
Camundongos PDAPP	(((((("Cannabis" OR ("Cannabis sativa")) OR ("Cannabinoids")) OR ("Cannabinoid")) OR ("Cannabidiol")) OR ("Epidiolex")) OR ("Cannabinol")) OR ("Dronabinol")) OR ("delta(9)-THC")) OR ("THC")) OR ("delta(9)-Tetrahydrocannabinol")) OR ("Tetrahydrocannabinol")) OR ("Marinol")) AND ("PDAPP mice")	0
Camundongos Tg2576	(((((("Cannabis" OR ("Cannabis sativa")) OR ("Cannabinoids")) OR ("Cannabinoid")) OR ("Cannabidiol")) OR ("Epidiolex")) OR ("Cannabinol")) OR ("Dronabinol")) OR ("delta(9)-THC")) OR	2

	("THC") OR ("delta(9)-Tetrahydrocannabinol") OR ("Tetrahydrocannabinol") OR ("Marinol")) AND ("Tg2576 mice")	
Camundongos APP23	(((((("Cannabis" OR ("Cannabis sativa")) OR ("Cannabinoids")) OR ("Cannabinoid")) OR ("Cannabidiol")) OR ("Epidiolex")) OR ("Cannabinol")) OR ("Dronabinol")) OR ("delta(9)-THC")) OR ("THC") OR ("delta(9)-Tetrahydrocannabinol") OR ("Tetrahydrocannabinol") OR ("Marinol")) AND ("APP23 mice")	1
Camundongos J20	(((((("Cannabis" OR ("Cannabis sativa")) OR ("Cannabinoids")) OR ("Cannabinoid")) OR ("Cannabidiol")) OR ("Epidiolex")) OR ("Cannabinol")) OR ("Dronabinol")) OR ("delta(9)-THC")) OR ("THC") OR ("delta(9)-Tetrahydrocannabinol") OR ("Tetrahydrocannabinol") OR ("Marinol")) AND ("J20 mice")	0
Camundongos APP/PS1	(((((("Cannabis" OR ("Cannabis sativa")) OR ("Cannabinoids")) OR ("Cannabinoid")) OR ("Cannabidiol")) OR ("Epidiolex")) OR ("Cannabinol")) OR ("Dronabinol")) OR ("delta(9)-THC")) OR ("THC") OR ("delta(9)-Tetrahydrocannabinol") OR ("Tetrahydrocannabinol") OR ("Marinol")) AND ("APP/PS1 mice")	13
Camundongos 5xFAD	(((((("Cannabis" OR ("Cannabis sativa")) OR ("Cannabinoids")) OR ("Cannabinoid")) OR ("Cannabidiol")) OR ("Epidiolex")) OR ("Cannabinol")) OR ("Dronabinol")) OR ("delta(9)-THC")) OR ("THC") OR ("delta(9)-Tetrahydrocannabinol") OR ("Tetrahydrocannabinol") OR ("Marinol")) AND ("5xFAD mice")	4

	Tetrahydrocannabinol")) OR ("Tetrahydrocannabinol")) OR ("Marinol")) AND ("5xFAD mice")	
Camundongos 3xTg	((((((((((("Cannabis") OR ("Cannabis sativa")) OR ("Cannabinoids")) OR ("Cannabinoid")) OR ("Cannabidiol")) OR ("Epidiolex")) OR ("Cannabinol")) OR ("Dronabinol")) OR ("delta(9)-THC")) OR ("THC")) OR ("delta(9)-Tetrahydrocannabinol")) OR ("Tetrahydrocannabinol")) OR ("Marinol")) AND ("3xTg mice")	0
Camundongos Tg-SwDI	((((((((((("Cannabis") OR ("Cannabis sativa")) OR ("Cannabinoids")) OR ("Cannabinoid")) OR ("Cannabidiol")) OR ("Epidiolex")) OR ("Cannabinol")) OR ("Dronabinol")) OR ("delta(9)-THC")) OR ("THC")) OR ("delta(9)-Tetrahydrocannabinol")) OR ("Tetrahydrocannabinol")) OR ("Marinol")) AND ("Tg-SwDI mice")	0
Camundongos APPE693Δ-Tg	((((((((((("Cannabis") OR ("Cannabis sativa")) OR ("Cannabinoids")) OR ("Cannabinoid")) OR ("Cannabidiol")) OR ("Epidiolex")) OR ("Cannabinol")) OR ("Dronabinol")) OR ("delta(9)-THC")) OR ("THC")) OR ("delta(9)-Tetrahydrocannabinol")) OR ("Tetrahydrocannabinol")) OR ("Marinol")) AND ("APPE693Δ-Tg mice")	0
Ratos McGill-R-Thy1-APP	((((((((((("Cannabis") OR ("Cannabis sativa")) OR ("Cannabinoids")) OR ("Cannabinoid")) OR ("Cannabidiol")) OR ("Epidiolex")) OR ("Cannabinol")) OR ("Dronabinol")) OR ("delta(9)-THC")) OR ("THC")) OR ("delta(9)-Tetrahydrocannabinol")) OR ("Tetrahydrocannabinol")) OR ("Marinol")) AND ("R-Thy1-APP mice")	0

	("Tetrahydrocannabinol") OR ("Marinol")) AND ("McGill-R-Thy1-APP rat")	
Ratos TgF344-AD	(((((("Cannabis" OR "Cannabis sativa") OR ("Cannabinoids") OR ("Cannabinoid") OR ("Cannabidiol") OR ("Epidiolex") OR ("Cannabinol") OR ("Dronabinol") OR ("delta(9)-THC") OR ("THC") OR ("delta(9)-Tetrahydrocannabinol") OR ("Tetrahydrocannabinol") OR ("Marinol")) AND ("TgF344-AD rat"))	0

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

Os artigos inclusos foram encontrados nas bases de dados anteriormente especificadas, sendo estudos experimentais *in vivo* com roedores – camundongos e/ou ratos – transgênicos ou fisiopatológicos que expressam características da Doença de Alzheimer. Além disso, fez-se necessário que a intervenção terapêutica tenha envolvido a administração de canabinoides. E, para filtrar os resultados, apenas artigos em inglês ou português que tivessem sido publicados entre 2012 e 2023 foram pré-selecionados.

Em contrapartida, os artigos excluídos foram os estudos com dados secundários – como revisões –, ensaios clínicos realizados em humanos e também aqueles que fizeram o uso dos canabinoides como fármacos coadjuvantes, ou seja, associados a outras substâncias.

4.4 Identificação e seleção de artigos

A identificação e seleção dos estudos aconteceu por meio do screening dos títulos e resumos dos trabalhos pré-selecionados a partir das buscas bibliográficas iniciais para que fossem escolhidos somente aqueles que preenchessem corretamente os critérios de inclusão e exclusão. Em seguida, os artigos foram lidos em sua íntegra, a fim de assegurar o respeito aos critérios da revisão. Tanto a identificação quanto a seleção dos artigos foram executadas por pares, ou seja, por dois revisores respeitando o cegamento entre as avaliações. Para isso, foi utilizada a plataforma Rayyan, que conta com uma inteligência artificial que auxilia na triagem.

4.5 Variáveis de interesse

As variáveis de interesse abrangeram: o tipo de modelo experimental utilizado no estudo (espécie e idade dos animais, mutações genéticas induzidas e a avaliação da neurodegeneração por exames de imagem ou laboratório), informações referentes ao tratamento com o uso de canabinoides (grupos de intervenção, placebo e controle; forma farmacêutica, via de administração, posologia, dose/dosagem e tempo de duração da terapia) e as metodologias de avaliação dos déficits cognitivos dos roedores (testes mentais e/ou comportamentais).

4.6 Avaliação da qualidade metodológica

Para executar a avaliação da qualidade metodológica dos artigos selecionados, foi utilizado como referência o Protocolo ARRIVE para estudos experimentais *in vivo*. Essa ferramenta foi adaptada no formato de uma lista de checagem, contendo 10 pré-requisitos essenciais e 11 adicionais, que qualificam os elementos desde o título até a conclusão dos trabalhos (Apêndice A). Com esses 21 itens, estabeleceu-se uma pontuação máxima de 100 unidades, sendo 67 destinadas aos pré-requisitos essenciais e 33 aos adicionais. Para serem classificados como estudos de alta qualidade de evidência, os artigos deverão obter uma nota igual ou superior a 80. Caso as pontuações sejam inferiores a 80, porém iguais ou superiores a 50, os estudos serão considerados como de moderada qualidade de evidência. Por fim, os artigos com notas inferiores a 50 serão rotulados como de baixa qualidade de evidência (Tabela 3).

TABELA 3 – Classificação dos Estudos Quanto à Avaliação da Qualidade Metodológica segundo o Protocolo ARRIVE.

PONTUAÇÕES DOS ESTUDOS	CLASSIFICAÇÃO DOS ESTUDOS
Pontuação \geq 80 Unidades	Evidência de Alta Qualidade
80 Unidades > Pontuação \geq 50 Unidades	Evidência de Moderada Qualidade
Pontuação < 50 Unidades	Evidência de Baixa Qualidade

4.7 Avaliação do risco de viés

Para executar a avaliação do risco de viés dos artigos selecionados, foi utilizada como referência a ferramenta SYRCLE's RoB, desenvolvida pela Cochrane Collaboration para a análise de tendenciosidades em estudos experimentais *in vivo*. Essa ferramenta foi adaptada no formato de uma lista de checagem, contendo 10 critérios avaliativos (Apêndice B) e estabeleceu-se uma pontuação máxima de 100 unidades, que foram distribuídas igualmente para cada quesito. Assim, os estudos com nota igual ou superior a 60 serão considerados como evidências com baixo risco de viés e, caso as pontuações sejam inferiores a 60, porém iguais ou superiores a 40, os artigos serão classificados como evidências de moderado risco de viés. Por fim, aqueles com notas inferiores a 40 serão rotulados como evidências de alto risco de viés (vide Tabela 4).

TABELA 4 - Classificação dos Estudos Quanto à Avaliação do Risco de Viés segundo a Ferramenta SYRCLE's RoB.

PONTUAÇÕES DOS ESTUDOS	CLASSIFICAÇÃO DOS ESTUDOS
Pontuação \geq 60 Unidades	Baixo Risco de Viés
60 Unidades > Pontuação \geq 40 Unidades	Moderado Risco de Viés
Pontuação < 40 Unidades	Alto Risco de Viés

4.8 Extração e análise de dados

Os dados das variáveis de interesse foram extraídos e sintetizados em tabelas do Excel, que apresentam um modelo pré-estabelecido pelos autores. Além disso, as pontuações dos estudos – referentes às avaliações de qualidade metodológica e de risco de viés – foram calculadas de acordo com os critérios previamente estabelecidos, bem como descritas através de tabelas. Essa descrição tem como intuito expor as características dos modelos experimentais averiguados e ilustrar um panorama sobre o estado da arte considerado.

4.9 Aspectos éticos

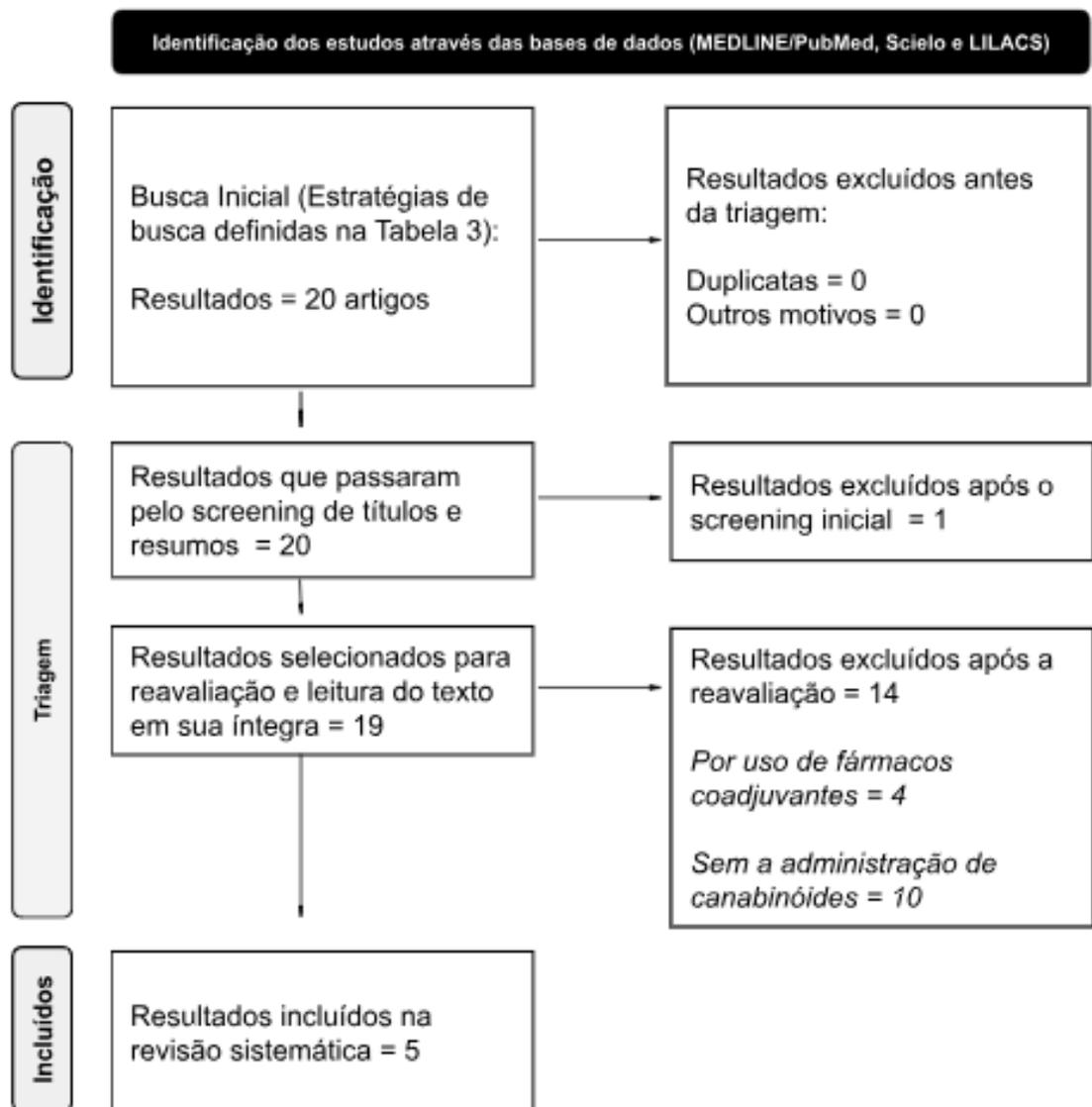
A aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa é dispensada por se tratar de uma revisão sistemática de literatura, de acordo com a resolução 466/12 do Ministério da Saúde.

5 RESULTADOS

5.1 Fluxograma PRISMA

A partir da aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, 5 artigos foram incluídos na presente revisão sistemática. Durante a busca inicial por referências, foram encontrados 20 resultados. Após a triagem inicial, feita por meio do screening de títulos e resumos, 1 dos resultados foi excluído. Por fim, depois da leitura dos 19 artigos em sua íntegra, foi possível excluir 14 resultados devido a incompatibilidades com os delimitadores previamente definidos (Figura 1).

FIGURA 1 – Seleção dos Estudos a partir das Bases de Dados (MEDLINE/PubMed, Scielo e LILACS).



Consequentemente, apenas 5 estudos foram incluídos na revisão sistemática. Todos foram publicados entre o período de 2012 e 2023, no idioma inglês. Além disso, mais da

metade dos artigos são provenientes de pesquisas americanas, enquanto os demais são resultantes de estudos chineses ou israelitas (Tabela 5).

TABELA 5 – Artigos Incluídos na Revisão Sistemática.

AUTOR & ANO:	PAÍÍS:	TIPO DE ESTUDO:
Khodadadi et al. ⁽²⁶⁾ , 2021.	EUA.	Estudo experimental com camundongos 5xFAD.
Nitzan et al. ⁽²⁷⁾ , 2022.	Israel.	Estudo experimental com camundongos 5xFAD.
Wang et al. ⁽²⁸⁾ , 2022.	EUA.	Estudo experimental com camundongos APP/PS1.
Fihurka et al. ⁽²⁹⁾ , 2022.	EUA.	Estudo experimental com camundongos APP/PS1.
Hao et al. ⁽³⁰⁾ , 2020.	China.	Estudo experimental com camundongos APP/PS1.

5.2 Variáveis de interesse

No estudo de Khodadadi et al. (26), foram utilizados os camundongos 5xFAD do sexo masculino (9 à 12 meses de idade) e outros animais selvagens como grupo controle. Como intervenção terapêutica, os camundongos 5xFAD receberam o THC isolado (tetrahydrocannabinol livre, Canabidiol Ltd., Dublin, Irlanda). A via de administração foi intraperitoneal e a posologia foi de 10 mg/kg – o peso dos animais não foi informado - em dias alternados para que fossem aplicadas 8 doses durante 2 semanas de tratamento (Tabela 6).

Para a avaliação da neurodegeneração fez-se o uso de exames histológicos e imunofluorescência de tecidos neuronais e sanguíneos. Os tecidos cerebrais foram tingidos com anticorpos fluorescentes que identificariam β -amiloides, IL-33, IBA1 (avaliação da atividade microglial), TREM2 e GFAP (avaliação da atividade astrocítica). O tratamento das lâminas foi feito com o contraste DAPI e as imagens foram observadas em Microscópios Zeiss. Além disso, realizou-se a imunofenotipagem por citometria de fluxo, quantificando a presença de astrócitos (GFAP + células), IL-33, células mieloides (CD11b+) e TREM2 no cérebro, bem como leucócitos (CD45+) e IL-6 no sangue. Os dados foram analisados pelo programa FlowJo V10.(26)

Para avaliar as mudanças comportamentais secundárias aos déficits cognitivos, foram utilizados 2 testes: o Open Field (OF) e o Novel Object Recognition (NOR). No OF, os camundongos foram colocados em uma caixa quadrada (40cm X 40cm X 40cm) por 10 minutos. Nesse período, a atividade dos animais foi gravada por um software de rastreamento – Ethovision XT. Avaliou-se a distância percorrida, a velocidade média e o tempo gasto no centro da área disponível. No NOR, os camundongos foram colocados em uma caixa com 2 objetos idênticos dentro de um perímetro de 10cm de diâmetro, ao centro da caixa. Depois

trocou-se um dos brinquedos por outro - com diferenças de tamanho, forma e textura. Então, calculou-se a habilidade do camundongo em distinguir os objetos usando a seguinte fórmula: $DI = (T_n - T_f)/(T_n + T_f)$. Sendo T_n o tempo de interação com o objeto novo e T_f com o objeto familiar. (26)

Similarmente, o estudo de Nitzan et al. (27) também utilizou os camundongos 5xFAD, com a diferença de que adotaram animais de ambos os sexos e em uma faixa etária distinta (6 ou 12 meses de idade). Foram realizados 2 experimentos distintos, então o estudo apresentou 2 grupos de intervenção e dois grupos placebos. No experimento 1, o grupo de intervenção possuía 8-10 camundongos 5xFAD-tg do sexo feminino com 6 meses de idade, enquanto o grupo placebo tinha 8-10 camundongos selvagens do sexo feminino com 6 meses de idade (que pertenciam a ninhada 1, assim como as cobaias transgênicas). No experimento 2, o grupo intervenção era composto por 8-9 camundongos 5xFAD-tg de ambos os sexos com 12 meses de idade. Em contrapartida, o grupo controle era formado por 8-9 camundongos selvagens de ambos os sexos com 12 meses de idade (que pertenciam a ninhada 2, assim como as cobaias transgênicas).

Os grupos de intervenção foram tratados com Δ^9 -THC (doado pelo Prof. Mechoulam, Universidade Hebraica, Jerusalém e pela NIDA dos EUA) diluído em uma solução de etanol. Os controles receberam uma diluição diferente, composta por etanol, cremophor e solução salina na proporção 1:1:18. A via de administração do canabinoide foi intraperitoneal, porém sua aplicação teve uma dose única de 0,002 mg/kg – novamente, o peso dos animais não foi informado (Tabela 6). (27)

A fim de avaliar o grau de neurodegeneração dos camundongos, Nitzan et al. executou um RT-PCR para analisar os biomarcadores inflamatórios presentes em amostras de RNA extraídas do tecido hipocampal dos animais após o sacrifício das cobaias. Além disso, quantificou-se a expressão – não a tradução - de TrkB/TrkB.T1, TIPM-3, SGK1, Nfkbia, Aif1 e Gfap com o auxílio de uma centrífuga de indução magnética para separar os primers de interesse e calcular os deltas das expressões gênicas.(27)

Com o intuito de averiguar os déficits cognitivos dos animais, foram utilizados 4 testes: Morris Water Maze (MWM), Y-Maze (YM), Object Place Recognition (OPR) e Open Field (OF). No MWM, o camundongo tem 60 segundos para encontrar uma plataforma submersa em uma piscina redonda, partindo de pontos de largada diferentes a cada tentativa. O tempo levado e as rotas que o animal percorre são registradas, sendo que ele possui 4 testes/dia ao longo de 3 dias de avaliação. Em seguida, há o momento probatório do quarto dia, quando a plataforma é removida e registra-se o tempo que o animal passou na zona de

localização da plataforma. Esse teste avalia o aprendizado e a memória espacial de longo prazo dos animais. No YM, o camundongo é inserido em um labirinto com o formato de um "Y" com 3 corredores de 30cm de comprimento e 120° de angulação entre si. Os roedores têm 5 min para explorar o local de partida, sendo que os dois outros corredores são bloqueados. Depois de 2 minutos de repouso, o animal é reinserido no labirinto com todos corredores abertos e ele deve explorar novamente o espaço. O tempo gasto em cada corredor é quantificado, pois esse teste serve para avaliar padrões comportamentais segundo as preferências e caminhos adotados pelos animais. No OPR, o camundongo é colocado em um recipiente com dois objetos idênticos e é estimulado a interagir com ambos por 5 minutos. Na segunda sessão – 24 horas depois da primeira - um dos objetos é posicionado em outro local do recipiente e afere-se o tempo que o animal leva para identificar a mudança. Esse teste avalia a memória espacial de longo prazo. Por fim no OF, os camundongos foram colocados em uma caixa quadrada (40cm x 40 cm x 40cm) por 5 minutos, tendo seus comportamentos gravados e a distância percorrida aferida pelo 13° Noldus Ethovision. Esse teste avalia as funções motoras e os padrões comportamentais.(27)

Em contrapartida, Wang et al. (28) optou por testar suas intervenções em camundongos APP/PS1 provenientes de um cruzamento entre duas cepas de animais: Tg2576 e 5.1PS1. Foram selecionados roedores de ambos os sexos e com uma idade mais avançada (14 meses). O estudo apresentou 2 grupos controles e 2 grupos de intervenção. O primeiro grupo controle era composto por 7 camundongos selvagens de ambos os sexos com 14 meses de idade. Simultaneamente, o segundo grupo controle era formado por 6 camundongos transgênicos APP/PS1 de ambos os sexos com 14 meses de idade. O primeiro grupo de intervenção era composto por 8 camundongos APP/PS1 que receberam o tratamento com 0,02 mg/kg de THC (Tabela 6). O segundo grupo de intervenção é composto por 6 camundongos APP/PS1 que receberam o tratamento com 0,2 mg/kg de THC (Tabela 6). Realizou-se a estratificação dos roedores quanto ao gênero, ao nível plasmático de β -amiloide e ao peso corporal.

Os animais foram tratados com o THC (CAS No. 1972-08-3, lote D9101515-01) fabricado pela Austin Pharma, LLC (Round Rock, TX, EUA). Inicialmente, a solução pura apresentava 0,5 mg/mL. Ela foi diluída em etanol e administrada pela via intraperitoneal. Os dois grupos de intervenção receberam injeções de THC dia-sim-dia-não, durante 3 meses (Tabela 6). (28)

Quanto a avaliação da neurodegeneração, utilizou-se a histopatologia de lâminas do córtex, seguida por uma imunotransferência com análise semiquantitativa por “western-

blotting”, densitometria e quimiluminescência. Os biomarcadores investigados foram: GSK-3 β normal e fosforilada, proteína tau normal e fosforilada, TFAM, CKMT1 e MFF. Em seguida, as lâminas foram coradas com a coloração vermelha alcalina do Congo, a fim de quantificar e identificar as zonas de acúmulo de β -amiloide. Também foi feita a análise imunohistoquímica para proteínas β -amiloides, tau (fosforilada e normal), GSK-3 β , Ifa-1 e CB1.(28)

Para avaliar os déficits mnemônicos, utilizou-se o teste Radial Arm Water Maze (RAWM). Nesse teste o camundongo era colocado em um labirinto de seis braços, entre os quais um seria a “entrada” e os demais apresentariam plataformas de saída submersas. Cada animal teve 60 segundos para encontrar uma plataforma, que seria posteriormente removida nas próximas tentativas. Toda plataforma previamente utilizada pelos camundongos seria removida. A memória espacial e o aprendizado seriam avaliados da seguinte forma: se o camundongo lembrasse da rota anterior, perceberia que a plataforma foi retirada e deveria buscar uma alternativa. Quantificou-se o tempo levado para encontrar uma saída alternativa (latência) e o número de erros (entradas em braços sem saída) por minuto. (28)

No artigo de Fihurka et al.(29), foram utilizados camundongos APP/PS1 com background genético próximo aos C57BL/6J e camundongos selvagens não-transgênicos de sexo indeterminado, com 12 meses de idade. O estudo apresentou 1 grupo controle, 1 grupo placebo e 2 grupos de intervenção. O grupo controle apresentava 6 camundongos selvagens não-transgênicos de 12 meses de idade enquanto o placebo apresentava 5 camundongos APP/PS1. Os grupos de intervenção apresentavam 7 camundongos APP/PS1, mas um deles recebia THC na dosagem de 0,002 mg/Kg, enquanto o outro recebia na dosagem de 0,02 mg/Kg (Tabela 6).(29) No total, 25 animais participaram do estudo, mas apenas 20 foram considerados nos resultados – não foram dadas explicações sobre a perda de seguimento.

O THC (CAS No. 1972-08-3, lote D9101515-01) foi fabricado pela Austin Pharma, LLC (Round Rock, TX, EUA) e foi dissolvido em uma solução estoque com uma concentração de 7,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ com etanol. A via de administração escolhida foi a intranasal, sendo que os animais eram anestesiados com isoflurano (irritativo para as vias aéreas) e recebiam a aplicação do spray diariamente ao longo dos 3 meses de tratamento (Tabela 6). (29)

Para avaliar a neurodegeneração, amostras histopatológicas foram coletadas do hipocampo e do córtex, enquanto amostras sanguíneas foram coletadas primeiramente através da punção da veia submandibular e depois pela via endocárdica. Os níveis de concentração dos peptídeos A β 1-40 e A β 1-42 foram aferidos nas amostras do plasma, do hipocampo e do

córtex utilizando o método ELISA. Também se realizou uma imunotransferência para a identificação das seguintes proteínas nos tecidos: GSK3 β , p-GSK3 β , tau, p-tau, MFF, TFAM, CKMT1 e β -actina. Ainda houve a pesquisa magnética por citocinas plasmáticas como IL-22 e TNF- α e, por fim, realizou-se a isotipagem das imunoglobulinas e a imunofenotipagem com citometria de fluxo. (29)

Com o objetivo de avaliar os déficits mnemônicos, utilizou-se o teste Radial Arm Water Maze (RAWM). Os animais foram colocados em uma piscina circular de 100 cm, com seis braços. O corredor de largada e a localização da plataforma de escape mudavam de lugar diariamente, em um padrão semi-aleatório e os camundongos possuíam 5 tentativas (4 de teste e uma probatória) para encontrar a saída. Foi aferida a latência, ou seja, o tempo de encontrar a plataforma, e também os erros (escolhas de corredores sem saída). Se o animal não entrasse em nenhum braço e ficasse apenas na piscina circular, isso contabilizava uma latência de 60 segundos. Se o animal não fizesse escolhas de braços, um erro extra era computado. (29)

Por outro lado, o estudo de Hao et al.(30) foi o único que não realizou testes mentais ou comportamentais com os animais. O estudo apresentou 3 grupos: 1 grupo de intervenção, 1 grupo placebo e 1 grupo controle. O grupo intervenção era composto por 6 camundongos APP/PS1 que receberiam o tratamento com o CBD (Tabela 6). O grupo placebo também era composto por 6 camundongos APP/PS1, mas eles seriam tratados com uma solução veículo. Por fim, o grupo controle era composto por 6 camundongos C57B6/J. Vale ressaltar que não houve menção à estratificação dos animais e que o grupo controle apresenta animais de outra espécie transgênica, quando comparado aos placebos e à intervenção.

O CBD (comprado da Bio-purify, Chengdu, China) foi dissolvido em 5% de DMSO e misturado em suspensão com 0,5% CMC-Na. Os camundongos tratados com CBD receberam 5 mg/kg/dia durante 1 mês de tratamento (Tabela 6).

O artigo avaliou apenas critérios bioquímicos e histopatológicos. A sequenciação genética das amostras foi realizada após a coleta de tecidos do hipocampo e a expressão de placas β -amiloides foi quantificada pela imuno-histoquímica. Além disso, as atividades autofágicas foram observadas na eletromicroscopia. Utilizou-se o método Western Blot para identificação de proteínas ligadas à autofagia. (30)

TABELA 6 – Variáveis de Interesse | Intervenções.

VARIÁVEIS:	Khodadadi et al. (26), 2021.	Nitzan et al. (27), 2022.	Wang et al. (28), 2022.	Fihurka et al. (29), 2022.	Hao et al. (31), 2020.
Forma Farmacêutica.	Intervenção: Solução de THC isolado.	Intervenção: Δ^9 -THC diluído em uma solução de etanol. Placebo: etanol, cremophor e solução salina na proporção 1:1:18.	Intervenção: Solução de THC à 0,5 mg/mL (CAS No. 1972-08-3, lote D9101515-01) fabricado pela Austin Pharma, LLC (Round Rock, TX, EUA), diluída em etanol.	Intervenção: Solução de THC à 7,5 μ g/ μ L (CAS No. 1972-08-3, lote D9101515-01), fabricado pela Austin Pharma, LLC (Round Rock, TX, EUA), diluído em etanol.	Intervenção: Solução de CBD (comprado da Bio-purify, Chengdu, China), dissolvido em 5% de DMSO e misturado em suspensão com 0,5% CMC–Na.
Via de Administração.	Via intraperitoneal (injeção).	Via intraperitoneal (injeção).	Via intraperitoneal (injeção).	Via intranasal.	Via intraperitoneal (injeção).
Posologia.	10 mg/kg em dias alternados para 8 doses durante 2 semanas.	0,002 mg/kg (dose única).	0,02 OU 0,2 mg/kg em dias alternados por três meses.	0,002 mg/Kg OU 0,02 mg/Kg diariamente por três meses.	5 mg/kg diariamente por 1 mês.
Dose/Dosagem.	10 mg/kg.	0,002 mg/kg (dose única).	0,02 OU 0,2 mg/kg.	0,002 mg/Kg OU 0,02 mg/Kg.	5 mg/kg
Duração da Terapia.	2 semanas.	1 dia (dose única).	3 meses.	3 meses.	1 mês.

5.3 Avaliação da qualidade metodológica

Dos 5 artigos avaliados, 5 foram classificados como evidências de moderada qualidade (Tabela 7) (26–30). As principais falhas metodológicas encontradas envolviam a amostragem, o cegamento e randomização dos animais que participaram dos estudos (Apêndice A). Ademais, nenhum estudo relatou quais cuidados foram ofertados aos camundongos ou efeitos adversos do tratamento, o que diminui a capacidade de generalização dos experimentos (Apêndice A).

TABELA 7 – Avaliação da Qualidade Metodológica | Protocolo ARRIVE.

PONTUAÇÃO NO CHECK-LIST DO PROTOCOLO ARRIVE:	Khodadadi et al. (26), 2021.	Nitzan et al. (27), 2022.	Wang et al. (28), 2022.	Fihurka et al. (29), 2022.	Hao et al. (31), 2020.
Nota da qualidade metodológica.	59,70 (Moderada)	64,025 (Moderada)	74,63 (Moderada)	71,835 (Moderada)	56,905 (Moderada)

5.4 Avaliação do risco de viés

Dos 5 artigos avaliados, 1 foi classificado como evidência com alto risco de viés (26), 3 foram definidos como de moderado risco de viés (27,29,30) e apenas 1 apresentou um baixo risco de viés (28) (Tabela 8). As principais problemáticas envolviam novamente à

randomização e alocação dos animais nos experimentos e o cegamento dos avaliadores (Apêndice B).

TABELA 8 – Avaliação do Risco de Viés | Ferramenta SYRCLE's RoB.

PONTUAÇÃO NO CHECK-LIST DA FERRAMENTA SYRCLE's ROB:	Khodadadi et al. (26), 2021.	Nitzan et al. (27), 2022.	Wang et al. (28), 2022.	Fihurka et al. (29), 2022.	Hao et al. (31), 2020.
Nota do risco de viés.	25 (Risco Alto)	40 (Risco Moderado)	60 (Risco Baixo)	45 (Risco Moderado)	40 (Risco Moderado)

6 DISCUSSÃO

6.1 Modelos Experimentais da Doença de Alzheimer

Como mencionado anteriormente, existem cerca de 205 modelos experimentais com roedores que são utilizados para o estudo da fisiopatologia do Alzheimer.(15) Entretanto, o modelo que mais se assemelha à apresentação humana da doença é o dos camundongos 3xTg, uma vez que são os únicos capazes de expressar emaranhados da proteína Tau – que é um marcador bioquímico importante para avaliar a gravidade do Mal de Alzheimer. (15,16)

Dentre os 5 artigos analisados por esta revisão, nenhum baseou-se no modelo experimental com camundongos 3xTg: 2 estudos executaram seus testes em camundongos 5xFAD e 3, em camundongos do tipo APP/PS1. Os camundongos 5xFAD apresentam a deposição de placas β -amiloides na região do córtex, subcórtex, hipocampo, bulbo olfatório e tronco cerebral. Além disso, há neurodegeneração focal no córtex e subcórtex, sendo que os animais desenvolvem déficits cognitivos e sinápticos significativos. (15,16)

Em contrapartida, os camundongos APP/PS1 cursam com a formação de emaranhados fibrilares de peptídeos β -amiloides – ou seja, **não** possuem a deposição de placas - nas regiões do córtex, do hipocampo, do tálamo, do núcleo estriado e do tronco cerebral. O foco central da neurodegeneração se faz presente na área do giro denteado, contudo poucos déficits cognitivos conseguem ser mensurados. Vale ressaltar que ambos modelos – 5xFAD e APP/PS1 – não possuem expressão da proteína Tau. (15,16)

Por consequência, é possível inferir que tais modelos apresentam limitações fisiopatológicas que dificultam a testagem de novas intervenções terapêuticas. Tais deficiências serão discutidas adiante.

6.1.1 Limitações do Modelo 5xFAD

À priori, é necessário mencionar que os camundongos 5xFAD podem expressar fenótipos diferentes caso sejam homo ou heterozigotos. Segundo Richard *et al.*, os animais transgênicos derivados da homozigotia possuem déficits motores e mnemônicos mais expressivos, assim como exibem tais sintomas de forma precoce em relação aos heterozigotos. (31)

Logo, as informações genéticas de base – além das mutações induzidas – são importantes para a avaliação de fatores de confusão em potencial. Por exemplo, se os animais possuírem problemas de locomoção graves, poderão ser prejudicados nas avaliações comportamentais e neurocognitivas, já que a maioria dos testes envolve algum tipo de deslocamento – seja através de um labirinto ou por um campo aberto. (31,33)

Outra problemática relevante envolve a expressão drástica e agressiva da amiloidose. Por causa dessa deposição excessiva de β -amiloide, os animais podem desenvolver deficiências de processamento temporal auditivo – que também são encontradas nos estágios iniciais da Doença de Alzheimer. Isso pode parecer positivo ao considerarmos a semelhança fisiopatológica entre os animais e os seres humanos, todavia não se sabe ao certo qual seria a origem desses déficits nem qual a magnitude da interferência no comportamento dos roedores.(32) Consequentemente, eles podem ser insignificantes ou ainda representarem um risco maior para que os camundongos apresentem surdez neurossensorial.

Diversos fatores interferem nas manifestações neurológicas da transgenia induzida nos camundongos 5xFAD. Animais mais jovens (3 a 9 meses de idade) tendem a exibir dificuldades de aprendizado porém não têm problemas mnésicos. Por outro lado, camundongos mais velhos (a partir dos 12 meses de idade) cursam com uma queda exponencial na performance dos testes cognitivos. (33,34) No entanto, é difícil afirmar se a causa para esse dano é de fato o declínio da cognição dos animais, uma vez que eles também desenvolvem sintomas motores – como a discinesia ou a diminuição da coordenação motora. Assim, quanto mais velhos forem os camundongos, maior é a probabilidade dos distúrbios de movimento se tornarem um fator de confusão importante. (33,34) As diferenças entre os sexos feminino e masculino também foram estudadas por O’leary *et al.*, mas os resultados foram pouco conclusivos. (33,34)

Infelizmente, essas limitações prejudicam a fidedignidade dos estudos experimentais desenvolvidos com o modelo 5xFAD e, para agravar a situação, nenhum dos estudos analisados nesta revisão sequer mencionou os fatores de confusão citados.

6.1.2 Limitações do Modelo APP/PS1

Além das alterações típicas da Doença de Alzheimer, os camundongos APP/PS1 tendem a desenvolver alterações na concentração e na atenção.(35) Então, os animais podem estar mais dispersos durante os testes cognitivos e as avaliações clínicas. Razoavelmente, isso também resulta em um aumento dos comportamentos impulsivos, ou seja, diminui a capacidade de tomada de decisões dos animais.(35) Tais alterações são mais frequentes em roedores mais idosos, que apresentaram uma deposição de β -amiloide lenta. E, associados aos comportamentos impulsivos, os camundongos podem também possuir “compulsões”: passam a escolher os mesmos objetos ou caminhos, pela “obsessão” com a escolha.

Essas características inconsequentes também foram identificadas por Legadec *et al.*, porém foram estudadas sob outra ótica: a memória temporal de curto prazo. Nesse estudo, os animais não conseguiam aguardar os 10s de inatividade entre a primeira e a segunda tentativa

da execução de uma tarefa. Ademais, eles não se lembravam das escolhas feitas. (37) Em um teste como o Radial Arm Water Maze (RAWM) descrito por Nitzan *et al.* (27) esses animais passariam por sérias dificuldades.

Dessa forma, é possível concluir que apesar de apresentarem deficiências cognitivas relacionadas ao hipocampo e ao córtex, os camundongos APP/PS1 possuem uma maior expressão dos sintomas neuropsiquiátricos do Alzheimer, que podem ser importantes fatores de confusão, pois alteram consideravelmente o comportamento dos animais. E, ao contrário do modelo 5xFAD, os camundongos raramente evoluem com alterações motoras. (36)

6.1.3 Considerações sobre os Modelos Transgênicos com Roedores

Devido à natureza artificial dos modelos transgênicos com roedores, espera-se certa inconsistência ao compará-los com a fisiopatologia humana. Entretanto, existem modelos mais verossímeis do que o 5xFAD e o APP/PS1. Por mais que sejam modelos com múltiplas mutações – 5 e 2, respectivamente – a perda neuronal extensa só pode ser observada no hipocampo. E, mesmo assim, os fenótipos são diferentes demais para serem propriamente comparados. (38)

Entre algumas limitações dos modelos transgênicos com roedores, têm-se (39):

- As diferenças entre SAD e FAD.
- A potencial interferência das características de base dos animais (idade, espécie, sexo e etc).
- As dificuldades de estadiamento da doença.

6.2 Heterogeneidade na Avaliação da Neurodegeneração & dos Déficits Cognitivos

Ao longo da redação deste trabalho, foi levantada a possibilidade de realização de uma meta-análise dos dados. Contudo, a ideia foi rapidamente descartada haja vista a significativa heterogeneidade entre os estudos. Parte dessas disparidades são decorrente das diversas estratégias utilizadas para avaliar o grau de neurodegeneração dos animais e os déficits cognitivos subsequentes.

Por exemplo, 3 dos 5 estudos realizaram análises histológicas e imuno-histoquímicas de amostras teciduais coletadas no período post-mortem dos animais.(26,28,29) Sob outra perspectiva, Nitzan *et al.* utilizou apenas um RT-PCR para avaliar e quantificar primers inflamatórios e Hao *et al.* executou a sequenciação genética para aferir a expressão de genes associados à resposta imune.(30,27) Logo, é difícil extrapolar e interpelar os achados dos dois trabalhos mencionados com os demais.

Ao averiguarmos os testes cognitivos, a heterogeneidade fica ainda mais clara. Khodadadi *et al.* e Nitzan *et al.* executaram um teste cognitivo comum: o Open Field (OF).

Mesmo assim, Khodadadi *et al.* avaliou 3 variáveis a partir desse exercício (distância percorrida pelo animal, velocidade média e tempo de permanência na zona central), enquanto Nitzan *et al.* considerou apenas a distância percorrida pelo camundongo. (26,27)

Wang *et al.* e Fihurka *et al.* aplicaram o Radial Arm Water Maze (RAWM) de formas diferentes: no primeiro caso, as plataformas de escape encontradas eram retiradas nas tentativas seguintes; no segundo, tanto a entrada quanto a saída do labirinto mudavam diariamente, de forma semi-aleatória. (28,29) E Hao *et al.* não aplicou nenhum teste cognitivo. Portanto, é praticamente impossível comparar os resultados de cada estudo.

Assim, urge que haja uma padronização tanto da avaliação da neurodegeneração (por exames de imagem, histológicos e/ou laboratoriais), quanto dos déficits cognitivos apresentados pelos animais (com testes comportamentais e exercícios cognitivos).

6.3 Avaliação da Qualidade Metodológica & do Risco de Viés

De acordo com a avaliação da qualidade metodológica feita através da aplicação do Protocolo ARRIVE (Apêndice A), todos os 5 artigos incluídos nessa revisão apresentaram um nível moderado de evidência. Quanto ao risco de viés (Apêndice B), apenas 1 artigo apresentou baixo risco, enquanto 3 apresentaram moderado risco e 1 demonstrou alto risco de viés.

Os principais problemas metodológicos envolveram:

- A amostragem dos estudos – não trouxeram explicações sobre o cálculo amostral, se a amostra foi definida por conveniência; quais foram os critérios de inclusão ou exclusão de animais (unidades experimentais); se houve, ou não, perda de seguimento e etc.
- Randomização e cegamento – apenas um estudo mencionou que realizou a estratificação dos animais, porém nenhum citou como foi feito o cegamento dos avaliadores.
- Cuidados oferecidos aos animais – os artigos não mencionaram a analgesia ou quais técnicas foram utilizadas para fazer a eutanásia dos animais; não houve menção à dieta, ao alojamento e à rotina dos camundongos (somente mencionaram e descreveram as atividades referentes aos testes comportamentais e cognitivos).
- Capacidade de generalização – nenhum dos estudos comparou seus resultados com aqueles encontrados em artigos que utilizaram outros modelos experimentais.

Sobre os vieses:

- O viés de seleção da amostra e da perda de seguimento era bem evidente.
- Como não houve menção à randomização, subentende-se que há um viés de alocação dos animais.
- A ausência de cegamento pode ter favorecido vieses de aferição.

Dos 5 estudos, o artigo Wang *et al.* foi o que obteve os melhores resultados. Esse trabalho conta com uma qualidade metodológica moderada e um baixo risco de viés. Entretanto, ainda assim, é um estudo que pode ser considerado apenas como levantador de novas hipóteses terapêuticas e não como um determinador de condutas.

6.4 Considerações Finais

Em suma, as principais limitações dessa revisão estão atreladas ao pequeno número de estudos analisados: mesmo nas buscas bibliográficas iniciais - antes da triagem - foram encontrados somente 20 artigos. Ademais, a temática do uso terapêutico dos canabinoides perpassa por inúmeras controvérsias dentro do contexto médico-assistencial. Não é à toa que quatro artigos foram excluídos devido à utilização de fármacos coadjuvantes. Outro ponto observado foi a falta da padronização das posologias e vias de administração dos fármacos, pois cada estudo incluído utilizou uma metodologia terapêutica distinta.

Então, é preciso reforçar que, de acordo com as conclusões dessa revisão, os estudos experimentais com roedores sobre o uso terapêutico dos canabinoides para o tratamento da Doença de Alzheimer não justificam a execução de ensaios clínicos randomizados ou outras pesquisas envolvendo seres humanos, sendo necessários mais estudos pré-clínicos. Vale ressaltar que, por conta da qualidade metodológica duvidosa e pelo potencial risco de viés, esses estudos não são suficientemente fortes para demonstrar qualquer plausibilidade biológica que associe o uso de canabinoides a melhora da performance cognitiva ou comportamental dos animais.

Tendo isso em mente, é interessante pensar em possibilidades de padronizações procedimentais para os estudos futuros, como a determinação de testes e exames específicos para a aferição da neurodegeneração e das mudanças cognitivo-comportamentais. E, se viável, estimular a o uso dos modelo experimental com camundongos 3xTg, já que é o modelo transgênico mais verossímil e fidedigno à fisiopatologia da Doença de Alzheimer humana.

7 CONCLUSÃO

Em síntese, a presente revisão sistemática pode evidenciar que a qualidade metodológica e o risco de viés dos estudos experimentais com canabinoides para tratamento da Doença de Alzheimer estão aquém do desejado: dos 5 estudos analisados, nenhum recebem uma boa avaliação de acordo com o Protocolo ARRIVE e somente 1 artigo foi classificado como de baixo risco de viés (pela ferramenta SYRCLE's ROB). Dessa forma, as pesquisas de bancada sobre esse tema precisam ser revistas antes de serem aplicadas nos contextos clínicos – ou seja, com a testagem em seres humanos. Por fim, a importante heterogeneidade entre os trabalhos nos leva a concluir que os resultados não podem ser comparados nem extrapolados e que, portanto, devem ser interpretados com cautela.

8 REFERÊNCIAS

1. Travassos, G. F., Coelho, A. B., & Arends-Kuenning, M. P. (2020). The elderly in Brazil: demographic transition, profile, and socioeconomic condition. *Revista brasileira de estudos de população*, 37.
2. Mendonça, J. M. B. D., Abigailil, A. P. D. C., Pereira, P. A. P., Yuste, A., & Ribeiro, J. H. D. S. (2021). The meaning of aging for the dependent elderly. *Ciência & Saúde Coletiva*, 26, 57-65.
3. Guimarães, R. M., Villardi, J. W. R., Sampaio, J. R. C., Eleuterio, T. A., Ayres, A. R. G., & Oliveira, R. A. D. D. (2021). Questões demográficas atuais e implicações para o modelo de atenção à saúde no Brasil. *Cadernos Saúde Coletiva*, 29, 3-15.
4. Rocha, M. L. C. D., Magalhães, C. M. C., Sampaio, E. C., Costa, E. F., & Ramos, M. F. H. (2019). Quality of life and cognition in elderly: A systematic review. *Estudos de Psicologia (Campinas)*, 36.
5. de Oliveira, F. F., de Almeida, S. S., Chen, E. S., Smith, M. C., Naffah-Mazzacoratti, M. D. G., & Bertolucci, P. H. F. (2018). Lifetime risk factors for functional and cognitive outcomes in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 65(4), 1283-1299.
6. Feter, N., Leite, J. S., Dumith, S. C., & Rombaldi, A. J. (2021). Ten-year trends in hospitalizations due to Alzheimer's disease in Brazil: a national-based study. *Cadernos de Saúde Pública*, 37, e00073320.
7. Melo, S. C. D., Champs, A. P. S., Goulart, R. F., Malta, D. C., & Passos, V. M. D. A. (2020). Dementias in Brazil: increasing burden in the 2000–2016 period. Estimates from the Global Burden of Disease Study 2016. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 78, 762-771.
8. Sontheimer, N., Konnopka, A., & Koenig, H. H. (2021). The excess costs of dementia: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Alzheimer's Disease*, 83(1), 333-354.
9. Engelhardt, E., Brucki, S. M., Cavalcanti, J. L. S., Forlenza, O. V., Laks, J., & Vale, F. A. (2005). Tratamento da Doença de Alzheimer: recomendações e sugestões do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, 63, 1104-1112.
10. Fink, H. A., Linskens, E. J., MacDonald, R., Silverman, P. C., McCarten, J. R., Talley, K. M., ... & Butler, M. (2020). Benefits and harms of prescription drugs and

supplements for treatment of clinical Alzheimer-type dementia: A systematic review and meta-analysis. *Annals of internal medicine*, 172(10), 656-668.

11. Forgerini, M., Herdeiro, M. T., Galduróz, J. C. F., & Mastroianni, P. D. C. (2020). Risk factors associated with drug therapy among elderly people with Alzheimer's disease: a cross-sectional study. *Sao Paulo Medical Journal*, 138, 216-218.

12. da Silva, L. R., Vianna, C. M., Mosegui, G. B., Peregrino, A. A., Marinho, V., & Laks, J. (2018). Cost-effectiveness analysis of the treatment of mild and moderate Alzheimer's disease in Brazil. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 41, 218-224.

13. SILVER, Robert J. The endocannabinoid system of animals. *Animals*, v. 9, n. 9, p. 686, 2019.

14. Bahji, A., Meyyappan, A. C., & Hawken, E. R. (2020). Cannabinoids for the neuropsychiatric symptoms of dementia: A systematic review and meta-analysis. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 65(6), 365-376.

15. Vignon, A., Salvador-Prince, L., Lehmann, S., Perrier, V., & Torrent, J. (2021). Deconstructing Alzheimer's Disease: How to Bridge the Gap between Experimental Models and the Human Pathology?. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8769.

16. Drummond, E., & Wisniewski, T. (2017). Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta neuropathologica*, 133(2), 155-175.

17. Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Mechanisms of disease. *N Engl J Med*, 362(4), 329-344.

18. Cristino, L., Bisogno, T., & Di Marzo, V. (2020). Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, 16(1), 9-29.

19. Watt, G., & Karl, T. (2017). In vivo evidence for therapeutic properties of cannabidiol (CBD) for Alzheimer's disease. *Frontiers in pharmacology*, 8, 20.

20. Gowran, A., Noonan, J., & Campbell, V. A. (2011). The multiplicity of action of cannabinoids: implications for treating neurodegeneration. *CNS neuroscience & therapeutics*, 17(6), 637-644.

21. dos Reis Rosa Franco, G., Smid, S., & Viegas, C. (2021). Phytocannabinoids: General Aspects and Pharmacological Potential in Neurodegenerative Diseases. *Current Neuropharmacology*, 19(4), 449-464.

22. Calabrese, E. J., & Rubio-Casillas, A. (2018). Biphasic effects of THC in memory and cognition. *European journal of clinical investigation*, 48(5), e12920.

23. Silvestro, S., Schepici, G., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2020). Molecular targets of cannabidiol in experimental models of neurological disease. *Molecules*, 25(21), 5186.

24. Kuharic, D. B., Markovic, D., Brkovic, T., Kegalj, M. J., Rubic, Z., Vukasovic, A. V., ... & Puljak, L. (2021). Cannabinoids for the treatment of dementia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (9).
25. Montero-Oleas, N., Arevalo-Rodriguez, I., Nuñez-González, S., Viteri-García, A., & Simancas-Racines, D. (2020). Therapeutic use of cannabis and cannabinoids: an evidence mapping and appraisal of systematic reviews. *BMC complementary medicine and therapies*, 20(1), 1-15.
26. Khodadadi H, Salles ÉL, Jarrahi A, Costigliola V, Khan M, Yu JC, et al. Cannabidiol Ameliorates Cognitive Function via Regulation of IL-33 and TREM2 Upregulation in a Murine Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2021 Apr 6;80(3):973–7.
27. Nitzan K, Ellenbogen L, Bentulila Z, David D, Franko M, Break EP, et al. An Ultra-Low Dose of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Alleviates Alzheimer's Disease-Related Cognitive Impairments and Modulates TrkB Receptor Expression in a 5XFAD Mouse Model. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2022 Aug 21;23(16):9449. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36012711/>
28. Wang Y, Hong Y, Yan J, Brown B, Lin X, Zhang X, et al. Low-Dose Delta-9-Tetrahydrocannabinol as Beneficial Treatment for Aged APP/PS1 Mice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Mar 2;23(5):2757.
29. Fihurka O, Hong Y, Yan J, Brown B, Lin X, Shen N, et al. The Memory Benefit to Aged APP/PS1 Mice from Long-Term Intranasal Treatment of Low-Dose THC. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2022 Apr 12 [cited 2023 May 30];23(8):4253. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35457070/>
30. Hao F, Feng Y. Cannabidiol (CBD) enhanced the hippocampal immune response and autophagy of APP/PS1 Alzheimer's mice uncovered by RNA-seq. *Life Sciences*. 2021 Jan;264:118624.
31. Richard BC, Kurdakova A, Baches S, Bayer TA, Weggen S, Wirths O. Gene Dosage Dependent Aggravation of the Neurological Phenotype in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 16];45(4):1223–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25697701/>
32. Kaylegian K, Stebritz AJ, Weible AP, Wehr M. 5XFAD Mice Show Early Onset Gap Detection Deficits. *Frontiers in Aging Neuroscience* [Internet]. 2019 [cited 2023 Oct 2];11:66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31001105/>

33. O’Leary TP, Brown RE. Visuo-spatial learning and memory impairments in the 5xFAD mouse model of Alzheimer’s disease: Effects of age, sex, albinism, and motor impairments. *Genes, Brain and Behavior*. 2022 Mar 3.
34. O’Leary TP, Mantolino HM, Stover KR, Brown RE. Age-related deterioration of motor function in male and female 5xFAD mice from 3 to 16 months of age. *Genes, Brain, and Behavior* [Internet]. 2020 Mar 1;19(3):e12538. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30426678/>
35. Shepherd A, May C, Churilov L, Adlard PA, Hannan AJ, Burrows EL. Evaluation of attention in APP/PS1 mice shows impulsive and compulsive behaviours. *Genes, Brain, and Behavior* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Oct 2];20(1):e12594. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31177612/#:~:text=APP%2FPS1%20mice%20showed%20n>
[o](#)
36. O’Leary TP, Hussin AT, Gunn RK, Brown RE. Locomotor activity, emotionality, sensori-motor gating, learning and memory in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer’s disease. *Brain Research Bulletin*. 2018 Jun;140:347–54.
37. Lagadec S, Rotureau L, Hémar A, Macrez N, Delcasso S, Jeantet Y, et al. Early temporal short-term memory deficits in double transgenic APP/PS1 mice. *Neurobiology of Aging*. 2012 Jan;33(1):203.e1–11.
38. Cavanaugh SE. Animal models of Alzheimer disease: historical pitfalls and a path forward. *ALTEX*. 2014;31(3):279–302.
39. Windisch M. We Can Treat Alzheimer’s Disease Successfully in Mice but Not in Men: Failure in Translation? A Perspective. *Neurodegenerative Diseases*. 2014 Jan 7;13(2-3):147–50.

APÊNDICE A

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE METODOLÓGICA (PROTOCOLO ARRIVE):	Khodadadi et al. (26), 2021.	Nitzan et al. (27), 2022.	Wang et al. (28), 2022.	Fihurka et al. (29), 2022.	Hao et al. (30), 2020.
PRÉ-REQUISITOS ESSENCIAIS:					
1. Sobre o desenho do estudo, é preciso incluir (Total = 6,7): a. A descrição dos grupos sendo comparados, incluindo grupos de controle. Se nenhum grupo de controle foi usado, a justificativa deve ser declarada (Pontuação = 3,35). b. Informações sobre a unidade experimental, por exemplo, se foi um único animal, uma ninhada ou uma gaiola de animais (Pontuação = 3,35).	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
2. Sobre o tamanho da amostra, é necessário (Total = 6,7): a. Especificar o número exato de unidades experimentais alocadas para cada grupo e o número total em cada experimento. É preciso indicar também o número total de animais utilizados (Pontuação = 3,35). b. Explicar como o tamanho da amostra foi decidido. Fornecer detalhes de qualquer cálculo amostral realizado a priori - se feito - ou da seleção por conveniência (Pontuação = 3,35).	3,35	6,7	6,7	3,35	3,35
3. Sobre os critérios de inclusão e exclusão, o artigo deve (Total = 6,7): a. Descrever quaisquer critérios usados para incluir e excluir animais (ou unidades experimentais) durante o experimento e durante coleta ou a análise de dados - além de especificar se esses critérios foram estabelecidos a priori. Se nenhum critério foi definido, essa informação precisa estar explicitamente registrada (Pontuação \cong 2,23). b. Para cada grupo experimental, relatar quaisquer animais, unidades experimentais ou dados não foram incluídos na análise e explicar o porquê. É importante declarar a ausência de exclusões caso esse seja o caso (Pontuação \cong 2,23). c. Para cada análise, o artigo precisa declarar o valor exato de <i>n</i> em cada grupo experimental (Pontuação \cong 2,23).	0	0	2,23	4,46	2,23
4. Sobre a randomização, é preciso (Total = 6,7): a. Declarar se a randomização foi usada para alocar as unidades experimentais para grupos de controle e tratamento. Se feito, devem fornecer o método usado para gerar a sequência de randomização (Pontuação = 3,35). b. Descrever a estratégia usada para minimizar possíveis fatores de confusão, como a ordem dos tratamentos e aferições ou a localização do animal/gaiola. Se os fatores de confusão não foram controlados, isso deve ser explicitado (Pontuação = 3,35).	3,35	0	0	3,35	0
5. Sobre o cegamento, é importante mencionar quem estava ciente da alocação dos grupos nas diferentes etapas do experimento - durante a própria alocação, a condução do experimento, a avaliação dos resultados e a análise dos dados (Total = 6,7).	6,7	0	0	0	0
6. Sobre a aferição dos desfechos (Total = 6,7): a. O artigo deve definir claramente todos os desfechos avaliados por exemplo, morte celular, marcadores moleculares ou alterações comportamentais (Pontuação = 3,35). b. Para estudos de teste de hipóteses, o artigo deve especificar qual o desfecho primário principal, ou seja, a medida de resultado que foi usada para determinar o tamanho da amostra (Pontuação = 3,35).	3,35	3,35	6,7	6,7	3,35
7. Sobre os métodos estatísticos (Total = 6,7): a. O artigo precisa fornecer detalhes sobre os métodos estatísticos usados para cada análise, incluindo o software usado (Pontuação = 3,35). b. É necessário descrever quaisquer métodos usados para avaliar se os dados atenderam às suposições da abordagem estatística e o que foi feito se as suposições não foram atendidas (Pontuação = 3,35).	3,35	3,35	6,7	6,7	6,7
8. Sobre os animais captados para os experimentos (Total = 6,7): a. O artigo deve fornecer detalhes apropriados sobre a espécie dos animais usados, incluindo linhagem e sublinhagem, sexo, idade ou estágio de desenvolvimento e, se relevante, peso (Pontuação = 3,35). b. Outras informações relevantes sobre a origem dos animais, estado de saúde/imunológico, status de modificação genética, genótipo e quaisquer procedimentos	3,35	6,7	6,7	3,35	3,35

interventivos anteriores, também devem ser incluídas (Pontuação = 3,35).					
9. Para cada grupo experimental, incluindo controles, é preciso descrever os procedimentos com detalhes suficientes para permitir que outros os repitam, incluindo (Total = 6,7): a. O que foi feito, como foi feito e o que foi usado (Pontuação = 1,675). b. Quando e com que frequência (Pontuação = 1,675). c. Onde, incluindo detalhes de quaisquer períodos de aclimação (Pontuação = 1,675). d. Por quê, ou seja a justificativa para os procedimentos (Pontuação = 1,675).	3,35	5,025	6,7	5,025	5,025
10. Para cada experimento realizado, incluindo replicações independentes, o artigo precisa relatar (Total = 6,7): a. Estatísticas resumidas/descriptivas para cada grupo experimental, com uma medida de variabilidade quando aplicável, por exemplo, média e desvio padrão, ou mediana e intervalo (Pontuação = 3,35). b. Se aplicável, o tamanho do efeito deve ser apresentado com um intervalo de confiança (Pontuação = 3,35).	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
PRÉ-REQUISITOS ADICIONAIS:					
11. O artigo deve fornecer um resumo preciso dos objetivos da pesquisa, das espécies de animais, linhagem e sexo, métodos principais, principais descobertas e conclusões do estudo (Total = 3,0).	3	3	3	3	3
12. Sobre o contexto e o estado da arte (Total = 3,0): a. Deve-se incluir embasamento científico suficiente para entender a lógica e o contexto do estudo, explicando a abordagem experimental (Pontuação = 1,5). b. Explicar como a espécie animal e o modelo usado atendem aos objetivos científicos e, quando apropriado, a relevância para a biologia humana (Pontuação = 1,5).	1,5	3	3	3	1,5
13. O artigo deve descrever claramente a questão da pesquisa, os objetivos da pesquisa e, quando apropriado, as hipóteses específicas que estão sendo testadas (Total = 3,0).	3	3	3	3	3
14. Deve-se fornecer o nome do comitê de revisão ética ou equivalente que aprovou o uso de animais neste estudo e qualquer número de licença ou protocolo relevante (se aplicável). Se a aprovação ética não foi solicitada ou concedida, é preciso fornecer uma justificativa (Total = 3,0).	3	3	3	3	3
15. É necessário fornecer detalhes das condições de alojamento e criação dos animais, incluindo qualquer enriquecimento ambiental (Total = 3,0).	0	3	3	3	1,5
16. Sobre os cuidados com os animais e a monitorização (Total = 3,0): a. Descrever quaisquer intervenções ou medidas tomadas nos protocolos experimentais para reduzir a dor, o sofrimento e a angústia (Pontuação = 1,0). b. Relatar quaisquer eventos adversos esperados ou inesperados (Pontuação = 1,0). c. Descrever os parâmetros humanitários estabelecidos para o estudo, os sinais que foram monitorados e a frequência do monitoramento. Se o estudo não teve desfechos humanitários, declare isso (Pontuação = 1,0).	0	0	0	0	0
17. Sobre as implicações científicas do estudo (Total = 3,0): a. Interpretar os resultados, tendo em conta os objetivos e hipóteses do estudo, a teoria corrente e outros estudos relevantes da literatura (Pontuação = 1,5). b. Comente sobre as limitações do estudo, incluindo potenciais fontes de viés, limitações do modelo animal e imprecisão associada aos resultados (Pontuação = 1,5).	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
18. Comentar se, e como, as descobertas do estudo podem ser generalizadas para outras espécies ou condições experimentais, incluindo qualquer relevância para a biologia humana, quando apropriado (Total = 3,0).	0	0	0	0	0
19. Fornecer uma declaração indicando se um protocolo (incluindo a questão de pesquisa, principais recursos de design e plano de análise) foi preparado antes do estudo e onde esse protocolo foi registrado (Total = 3,0).	3	3	3	3	1,5
20. Fornecer uma declaração descrevendo se e onde os dados do estudo estão disponíveis (Total = 3,0).	3	3	3	3	3
21. Sobre a declaração conflitos de interesse (Total = 3,0): a. Declarar quaisquer potenciais conflitos de interesse, incluindo financeiros e não financeiros. Se não existir, isso deve ser declarado (Pontuação = 1,5).	1,5	3	3	3	1,5

b. Liste todas as fontes de financiamento (incluindo identificadores de doação) e a função do(s) financiador(es) no desenho, análise e relatório do estudo (Pontuação = 1,5).					
TOTAL:	59,7	64,025	74,63	71,835	56,905
LEGENDA DE CORES:					
Verde = Alta qualidade metodológica.					
Amarelo = Moderada qualidade metodológica.					
Vermelho = Baixa qualidade metodológica.					

APÊNDICE B

AVALIAÇÃO DO RISCO DE VIÉS (SYRCLE's ROB):	Khodadadi et al. (26), 2021.	Nitzan et al. (27), 2022.	Wang et al. (28), 2022.	Fihurka et al. (29), 2022.	Hao et al. (30), 2020.
1. Sobre o viés de seleção: o artigo descreveu os métodos usados - se existirem - para gerar a sequência de alocação com detalhes suficientes para permitir uma avaliação sobre a produção de grupos comparáveis (Total = 10).	5	5	10	5	5
2. Sobre as características de base dos animais: o artigo descreve todos os possíveis fatores prognósticos ou particularidades das cobaias que são comparadas a fim de julgar se a intervenção e os grupos de controle eram semelhantes no início do experimento (Total = 10).	5	10	10	5	5
3. Sobre a alocação dos animais: o artigo descreve o método usado para ocultar a alocação com detalhes suficientes para determinar se as distribuições poderiam ter sido previstas antes ou durante a inscrição (Total = 10).	0	0	0	0	0
4. Sobre a habitação: o artigo descreve todas as medidas utilizadas - se existirem - para abrigar os animais aleatoriamente (Total = 10).	0	10	10	10	10
5. Sobre o cegamento: o artigo descreve todas as medidas usadas - se existirem - para cegar cuidadores e pesquisadores de saberem qual intervenção cada animal recebeu, assim como sobre a efetividade do cegamento (Total = 10).	0	0	0	0	0
6. Sobre a escolha dos animais avaliados: o artigo descreve se os animais foram - ou não - aleatoriamente selecionados para a avaliação de resultados e qual método foi utilizado (Total = 10).	0	0	0	10	0
7. Sobre o cegamento dos avaliadores: o artigo descreve todas as medidas usadas - se existirem - para o cegar os avaliadores dos resultados, a fim de prevenir que saibam qual intervenção cada animal recebeu, assim como fornece informações relativas a efetividade do cegamento (Total = 10).	0	0	0	0	0
8. Sobre dados incompletos: o artigo descreve a integridade dos dados para cada resultado principal, incluindo perdas de seguimento, exclusões e reinclusões da análise, além de relatá-las de acordo com seus respectivos motivos, comparando os números em cada grupo com o número total de animais randomizados (Total = 10).	5	5	10	5	5
9. Sobre os resultados: o artigo declara como o as variáveis de interesse foram selecionadas e examinadas, assim como o que foi encontrado (Total = 10).	10	10	10	10	10
10. Sobre outros potenciais riscos de viés: o artigo declara quaisquer preocupações importantes sobre viés, que não foram abarcadas pelos domínios do protocolo (Total = 10).	0	0	10	0	5
TOTAL:	25	40	60	45	40
LEGENDA DE CORES:					
Verde = Baixo risco de viés.					
Amarelo = Moderado risco de viés.					
Vermelho = Alto risco de viés.					