

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Maria de Fátima Torres Faria Viegas

Avaliação da qualidade de revisões sistemáticas sobre toxicidade de nanopartículas
de prata

Rio de Janeiro

2018

Maria de Fátima Torres Faria Viegas

Avaliação da qualidade de revisões sistemáticas sobre toxicidade de nanopartículas
de prata

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Saúde Pública. Área de concentração: Saúde, Trabalho e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. William Waissmann

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

P149a Viegas, Maria de Fátima Torres Faria.
Avaliação da qualidade de revisões sistemáticas sobre toxicidade de nanopartículas de prata / Maria de Fátima Torres Faria Viegas. -- 2018.
253 f. ; il. color. ; graf. ; tab.

Orientador: William Waissmann.
Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2018.

1. Revisão. 2. Controle de Qualidade. 3. Nanopartículas Metálicas. 4. Prata. 5. Toxicidade. I. Título.

CDD – 22.ed.

Maria de Fátima Torres Faria Viegas

Avaliação da qualidade de revisões sistemáticas sobre toxicidade de nanopartículas de prata

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Saúde Pública. Área de concentração: Saúde, Trabalho e Ambiente.

Aprovada em: 28 de março de 2018.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Ariane Leites Larentis

Fundação Oswaldo Cruz / Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof^a. Dr^a. Mônica Diuana Calasans Maia

Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. William Waissmann (Orientador)

Fundação Oswaldo Cruz / Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

Ano 2018

Aos meus pais, amor incondicional, a quem dedico todas as minhas vitórias.

Ao Ricardo, esposo dedicado e companheiro de todos os momentos, pelo amor, apoio e compreensão ao longo de todo o período de elaboração deste estudo.

À Renato de Moura Carvalho (*in memoriam*), amigo querido, pelo incentivo e orações para conclusão deste trabalho. Nunca será esquecido.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem Ele nada seria.

Ao orientador e amigo, Prof^o Dr^o. William Waissmann, pela competência e respeito com que conduziu este processo, do alvorecer da ideia até a sua síntese e por fazer da inteligência algo trivial.

Às Professoras Dr^a. Ariane Leites Larentis e Dr^a. Mônica Diuana Calazans Maia pelas valiosas contribuições no Exame de Qualificação.

À Professora Dr^a. Martha Silvia Martinez Silveira pelo inestimável apoio no decurso deste estudo.

A todos os docentes da Pós-Graduação, sobretudo os professores da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) e do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH), da Instituição FIOCRUZ, pela competência, empenho e generosidade no compartilhamento de seus conhecimentos.

Aos colegas de curso, desde seus primórdios, em especial a turma de Saúde, Trabalho e Ambiente e a turma da Disciplina de Apresentação Oral pelo imensurável apoio, companheirismo, compartilhamento de todos os momentos e por mostrarem que a diversidade é sempre profícua.

À Secretaria Acadêmica, pela eficiência e atenção durante todo o curso.

Ao Prof. Dr. Vittorio Moraschini, por apresentar tal metodologia com extrema competência.

À Katia Carbonell, pela valorosa contribuição ao final deste processo.

Aos colegas de trabalho (Ministério do Trabalho – Fundacentro/CERJ), por todo apoio e incentivo na realização desta pós-graduação.

A todos os familiares e amigos queridos que acompanharam minha trajetória desde muito e torceram por um auspicioso desfecho.

Todas as vitórias ocultam uma abdicação.

- *Toute réussite déguise une abdication.*

Simone de Beauvoir, 1958, pág. 243.

RESUMO

Introdução: Este estudo teve por objetivo realizar um amplo e premente levantamento dos riscos da matéria em escala nanométrica (10^{-9}), a luz da Nanotoxicologia, com ênfase no tamanho de 1 a 100 nm, em especial das nanopartículas de prata (AgNPs), empreendendo uma avaliação da qualidade de Revisões Sistemáticas (RS) sobre a toxicidade destes materiais a curto e longo prazo. O aumento recente da produção de nanomateriais (NMs) exige uma maior investigação sobre sua toxicidade potencial e efeitos adversos para a saúde após a exposição. A eleição da AgNP, dentre outras, se deve à relevância de tais potenciais efeitos adversos gerados, seu volume de produção mundial e ao contingente de literatura científica publicada. **Objetivos:** Avaliar a qualidade de RS sobre a toxicidade das AgNPs em células *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, em mamíferos, incluindo humanos, abrangendo metodologias e vieses potencialmente presentes, discutindo potenciais repercussões e necessidades de controle. **Método:** A metodologia escolhida foi a avaliação da qualidade (*Quality Assessment*) de RS que versam sobre a toxicidade dos NMs, sobretudo a nanop prata. Para tal, foi conduzida uma ampla pesquisa eletrônica sem restrições de data ou idioma, em vários bancos de dados. Os critérios de elegibilidade incluíram RS, com ou sem metanálise, focadas na toxicidade de nanopartículas de prata. Duas importantes ferramentas foram utilizadas para avaliar a qualidade destes estudos, quais sejam, AMSTAR 2, que avalia a qualidade metodológica de tais revisões, e ROBIS, para avaliação do risco de viés. Após o processo de seleção, 7 revisões sistemáticas foram incluídas. Cabe ressaltar que não foram encontrados *Quality Assessments* relacionados ao tema. **Resultados:** Dentre as sete revisões incluídas no estudo, especificamente, no que concerne à questão da pesquisa, pudemos observar diversidades no tema, evidenciando heterogeneidade. Cinco revisões incluíram estudos experimentais e duas abrangeram estudos observacionais em humanos. Nenhuma das avaliações incluídas contemplou todos os critérios da ferramenta AMSTAR 2, evidenciando predomínio de grau de confiança criticamente baixo. Através da ferramenta ROBIS, constatamos três revisões avaliadas como “baixo potencial de viés”, três revisões consideradas de “alto potencial de viés” e duas de classificação “incerta”. Em geral, houve consistência entre ROBIS e AMSTAR. **Conclusões:** No presente *Quality Assessment*, nenhuma das revisões alcançou todos os critérios nos *checklists* utilizados. Revela-se, portanto, uma irrefutável indicação da premência de padronização metodológica em futuras revisões.

Palavras-chave: revisão sistemática; avaliação da qualidade; nanop prata; AgNP; toxicidade.

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study was to carry out an extensive and urgent study of nanometric scale (10^{-9}), at the light of Nanotoxicology, with an emphasis on the size of 1 to 100 nm, especially silver nanoparticles (AgNPs), undertaking an evaluation of the quality of Systematic Reviews (SR) on the toxicity of these materials in the short and long term. The recent increase in the production of nanomaterials (NMs) requires further investigation into their potential toxicity and adverse health effects after exposure. The election of AgNP, among others, is due to the relevance of such potential adverse effects generated, its volume of world production and the contingent of published scientific literature. **Objectives:** To assess RS quality on the toxicity of AgNPs in cells *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo*, in mammals, including humans, covering potentially present methodologies and biases, discussing potential repercussions and control needs. **Method:** The methodology chosen was the Quality Assessment of RS, which deals with the toxicity of NMs, especially nanosilver. For this, an extensive electronic search was carried out without date or language restrictions, in the most diverse databases. Eligibility criteria included RS, with or without meta-analysis, focused on the toxicity of silver nanoparticles. Two important tools were used to evaluate the quality of these studies, namely AMSTAR 2, which evaluates the methodological quality of such reviews and ROBIS for bias risk assessment. After the selection process, 7 systematic reviews were included. It should be noted that Quality Assessments related to the theme were not found. **Results:** Among the seven reviews included in the study, specifically, regarding the research question, we could observe diversity in the theme, showing heterogeneity. Five reviews included experimental studies and two covered observational studies in humans. None of the included evaluations met all criteria of the AMSTAR 2 tool, evidencing a predominance of critically low degree of confidence. Through the ROBIS tool, we verified three reviews evaluated as "low bias potential", three reviews considered "high bias potential" and two "uncertain" rating. In general, there was consistency between ROBIS and AMSTAR. **Conclusions:** In the present Quality Assessment, none of the revisions met all the criteria in the checklists used. Therefore, there is an irrefutable indication of the urgency of methodological standardization in future reviews.

Key words: systematic review; quality assessment; nanosilver; AgNP; toxicity.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Conhecendo o tamanho.

Quadro 2 - Conhecendo o tamanho.

Quadro 3 - Efeitos e escala de tamanho.

Quadro 4 - Exemplos de aplicação de prata e nanop prata.

Quadro 5 - Distribuição nos tecidos das AgNPs segundo as várias vias de exposição.

Quadro 6 - Classificação da potencial exposição humana a nanop prata.

Quadro 7 - Lista de estudos excluídos e o motivo de sua exclusão.

Quadro 8 - Principais características das revisões incluídas e scores de avaliação obtidos usando AMSTAR 2.

Quadro 9 - Domínios críticos da Ferramenta AMSTAR 2.

Quadro 10 - Avaliação da confiança geral nos resultados da revisão.

Quadro 11- Avaliação e interpretação do *checklist* da Ferramenta AMSTAR 2.

Quadro 12 - Avaliação da confiança geral nos resultados da revisão.

Quadro 13 - Sumário dos domínios ROBIS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rotas de contaminação.

Figura 2 - Aplicações das Nanotecnologias.

Figura 3 - Mercado global de AgNPs, por aplicação, no período de 2012-2022 (t).

Figura 4 - Controle (A) e efeito antibacteriano (B) (*E. coli*) das AgNPs ao fim de 24h.

Figura 5 - Representação esquemática da indução da apoptose provocada pelas AgNPs.

Figura 6 - Rotas de administração e possíveis efeitos reprodutivos e de desenvolvimento das AgNPs em estudos com animais relatados na literatura.

Figura 7 - Visão geral do estudo com artigos incluídos e excluídos.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIC (air-interfaced culture) - cultura com interface aérea (AIC)

AgNP – nanopartícula de prata

RAPD: Randomly amplified polymorphic DNA

MWCNTs – nanotubos de carbono de parede múltipla

SWCNTs - nanotubos de carbono de parede simples

DWCNTs - nanotubos de carbono de parede dupla

CNTs - nanotubos de carbono

CNFs – nanofibras de carbono

NP Al₂O₃ – nanopartícula de óxido de alumínio

NP TiO₂ – nanopartícula de dióxido de titânio

NP CeO₂ – nanopartícula de óxido cério

NP SiO₂ - nanopartícula de óxido de sílica

Nanoclays – nanopartículas de silicatos minerais em camadas

NP Fe – nanopartícula de ferro

NP ZnO – nanopartícula de zinco

Ensaio MTT - MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium

Ensaio CCK-8 - cholecystokinin C-terminal octapeptide

Ensaio XTT- ensaio de resazurina

ROS – reactive oxygen species

LDH- lactate dehydrogenase

AuNP – nanopartícula de ouro

CuO – óxido de cobre

Fe₂O₄ – óxido de ferro

Fe₂O₃ – óxido férrico

NiO – óxido de níquel

MgO₂ – peróxido de magnésio

SiO₂ – dióxido de silício

IL-8 – interleucina 8

TNF-alpha – fator de necrose tumoral alfa

LPS – lipopolissacarídeo

TPS - total suspended particulate (total de partículas em suspensão)

SOD - superóxido desmutase

GPX-1 - glutathione peroxidase

Co- cobalto

Mo- molibdênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA E REFERENCIAL TEÓRICO	26
2.1 NANOPARTÍCULAS DE PRATA: UMA PREOCUPAÇÃO RELEVANTE?	28
2.2 TOXICOCINÉTICA DA PRATA.....	32
2.2.1 Administração sistêmica (via endovenosa)	33
2.2.2 Inalação	34
2.2.3 Via Oral	35
2.2.4 Outras rotas de exposição	37
2.2.5 Deduções sobre toxicocinética	37
2.2.6 Etapas do ciclo de vida da nanop prata	40
2.2.6.1. Síntese e caracterização	40
2.2.6.2. Aplicabilidade: O quanto sabemos?.....	42
2.2.6.3. AgNPs como antibacterianos, antifúngicos e antivirais	46
2.2.6.4. AgNPs como anti-inflamatórios	48
2.2.6.5. AgNPs como antitumorais	49
2.2.6.6. AgNPs como regeneradoras.....	49
2.2.6.7. AgNPs como catalisadores	50
2.2.7 Uso diverso	51
2.3 EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL	51
2.3.1 Toxicidade das AgNPs: íons, nanopartículas ou ambos?	53
2.4 EFEITOS ADVERSOS À PROLE DA EXPOSIÇÃO MATERNA A NANOMATERIAIS	65
2.5 POTENCIAIS EFEITOS TROMBOGÊNICOS	69
3 JUSTIFICATIVA	74
4 OBJETIVOS	82
4.1 OBJETIVO GERAL.....	82
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	82
5 ABORDAGEM METODOLÓGICA	83
5.1. RELEVÂNCIA CIENTÍFICA DO MÉTODO	83
5.1.1. FERRAMENTA AMSTAR	84
5.1.2. FERRAMENTA ROBIS	86
5.2 RELEVÂNCIA CLÍNICA	88

5.3 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO.....	88
5.4 ESTRATÉGIAS DE BUSCA E TRIAGEM DOS DADOS	89
5.5 EXTRAÇÃO DE DADOS E <i>QUALITY ASSESSMENT</i>	91
6 RESULTADOS.....	93
7 DISCUSSÃO.....	105
8 CONCLUSÕES.....	108
REFERÊNCIAS	110
APÊNDICE A – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DAS REVISÕES INCLUÍDAS NO ESTUDO.....	119
APÊNDICE B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DAS REVISÕES EXCLUÍDAS NO ESTUDO.....	120
ANEXO A - AMSTAR 2: A CRITICAL APPRAISAL TOOL FOR SYSTEMATIC REVIEWS THAT INCLUDE RANDOMISED OR NON-RANDOMISED STUDIES OF HEALTHCARE INTERVENTIONS, OR BOTH.....	121
ANEXO B - FERRAMENTA AMSTAR 2.....	130
ANEXO C – FERRAMENTA AMSTAR 2. <i>CHECKLIST</i> DAS REVISÕES INCLUÍDAS	135
ANEXO D – ROBIS: A NEW TOOL TO ASSESS RISK OF BIAS IN SYSTEMATIC REVIEWS WAS DEVELOPED	164
ANEXO E – ROBIS – RISK OF BIAS IN SYSTEMATIC REVIEWS: FERRAMENTA PARA AVALIAR O RISCO DE VIÉS EM REVISÕES SISTEMÁTICAS: ORIENTAÇÕES DE USO (TRADUÇÃO NÃO VALIDADA).	175
ANEXO F – FERRAMENTA ROBIS EM LÍNGUA ORIGINAL (INGLÊS).	224
ANEXO G – FERRAMENTA ROBIS EM LÍNGUA PORTUGUESA (TRADUÇÃO NÃO VALIDADA).	227
ANEXO H – FERRAMENTA ROBIS – <i>CHECKLIST</i> DAS REVISÕES INCLUÍDAS..	232

1 INTRODUÇÃO

Evidencia-se na sociedade pós-moderna, o surgimento das chamadas Nanotecnologias, proporcionando e prometendo uma série de benefícios e novidades, entretanto, desacompanhados de comprovações científicas quanto a seus potenciais riscos e de uma legislação que nos salvguarde. Este projeto versa sobre esta tecnologia, relativamente nova, cujo conceito ainda não é amplamente conhecido. Entretanto, citando um breve histórico, a maioria dos avanços teóricos e tecnológicos na história da humanidade se desenrolou a partir de práticas empíricas de ensaio e erro. Isto também ocorreu com o desenvolvimento da Nanociência e da Nanotecnologia. A história começa no século V a.C., com Leucipo de Mileto, considerado o mestre de Demócrito, que desenvolveu a teoria de que “tudo seria composto de partículas minúsculas indivisíveis e invisíveis a olho nu”, os então chamados átomos.

Essas ideias chegaram até o século XIX, quando a noção da indivisibilidade do átomo foi acrescentada, por John Dalton (1803), à ideia de que os átomos seriam como “bolas de bilhar” e que os elementos eram constituídos por átomos do mesmo tipo. Nessa linha, Dalton enunciou que “os compostos eram constituídos de átomos com razões específicas”, o que o levou às conhecidas Leis Ponderais de Dalton.

No início do século XX, entra em cena Ernest Rutherford (1908) propondo o modelo de átomo similar ao “sistema solar”, depois de descobrir que os átomos eram constituídos, em sua maioria, de espaço vazio com um núcleo denso positivamente carregado e circundado por elétrons (negativos).

Finalmente, surge a contribuição de Niels Bohr (1915) que propôs o modelo pelo qual os elétrons giravam ao redor do núcleo em órbitas circulares e que somente algumas órbitas eram permitidas. Este modelo do átomo permitiu explicar o espectro de emissão do átomo de hidrogênio.

Essas contribuições mostram claramente que os homens de ciência há muito tempo vêm se preocupando com o “muito pequeno” (figura de linguagem). Todavia, não foi só a ciência que avançou na direção do entendimento das relações entre tamanho e propriedades. Vários processos artesanais muito antigos se assemelham às nanofabricações de hoje. São notáveis os pigmentos feitos à base de metais e seus compostos, sobretudo ouro, cobre e ferro, que serviram para construir os maravilhosos vitrais de catedrais da Europa. Os mesmos já estavam presentes na Idade Média, em que a cor dos vidros era dependente da resposta ao efeito do espalhamento da luz, sobre as nanopartículas (NPs), de diferentes tamanhos e dos aditivos metálicos a eles adicionados. Os artesãos medievais, sem saber, tornaram-se nanotec-

nólogos durante o processo de fabricação dos vitrais que eram instalados nas janelas das igrejas. Durante a Idade Média (500 d.C.-1450 d.C.) estes artesãos usavam diferentes produtos químicos para dar colorido a seus trabalhos. A cor vermelha era dada pelas NPs de ouro e a amarela pelas de prata (National Science Foundation, 2008). Da mesma maneira, a indústria romana do século IV a.C. utilizou-se desses sofisticados aditivos para a produção de um vidro multicolor. Com a junção de pó de ouro e prata ao vidro, o mesmo assumiu uma coloração diversa de acordo com a reflexão da luz em contato com a superfície do vaso. No Museu Britânico de Londres há uma peça artesanal chamada “Taça de Licurgo” (século IV d.C.) feita com a técnica denominada cal-soda que contém NP de prata e ouro e que muda de cor de um tom verde azulado a um tom vermelho profundo ao ser exposta à luz.

Em sua história recente sabe-se que, há pelo menos 30 anos, vários laboratórios no mundo desenvolvem pesquisas na direção da miniaturização, sobretudo de sistemas eletrônicos, NPs, sistemas nanoparticulados, etc. É importante mencionar que a eletrônica trazia já em seu arcabouço conceitual ideias para o tratamento do “muito pequeno”. Muitos autores se reportam ao filme *Viagem Fantástica (Fantastic Voyage)* de 1966, baseado no livro de Isaac Asimov, como sendo um dos primeiros a revelar tais ideias para o grande público.

A Nanotecnologia, historicamente, costuma ter seu marco inicial associado à palestra proferida em 1959, durante evento da *American Physical Society*, pelo físico americano Richard Feynman, intitulada: “*There is plenty of room at the bottom*” (Há muito espaço lá em baixo). Nessa palestra, que é hoje considerada o momento definidor das Nanociências e da Nanotecnologia como uma atividade científica, Feynman (que veio a receber o prêmio Nobel de Física em 1965, por suas contribuições ao avanço da teoria quântica) sugeriu que um dia o homem conseguiria manipular objetos de dimensões atômicas e assim construir estruturas de dimensões nanométricas segundo seu livre arbítrio. As ideias de Feynman, porém, ficaram esquecidas por mais de 20 anos. Começaram a renascer nos anos 1980 por obra de Eric Drexler, então um jovem prodígio do *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) que resgatou, de um lado, a palavra “nanotecnologia”, cunhada por um autor japonês, pesquisador da Universidade de Tóquio, Norio Taniguchi, em artigo de 1974; e de outro, a inspirada palestra de Feynman.

Estas ideias entraram em seu livro *Engines of Creation* (Máquinas da Criação), de 1986, um ensaio sobre a possibilidade de construir máquinas moleculares, e que elas poderiam se autorreplicar sem controle, formando a chamada “gosma cinzenta” (*gray goo*).

O termo “nanotecnologia” foi desta forma, popularizado por Drexler, que até por volta dos anos 2000 era fonte garantida em qualquer reportagem sobre o tema. O mesmo termo,

criado em 1974, tinha inclusive outro significado. Foi sugerido para descrever a manufatura precisa de materiais com tolerâncias nanométricas.

A previsão de Feynman só foi possível no início da década de 80, com o desenvolvimento, por físicos europeus, dos microscópios eletrônicos de varredura por sonda, dentre os quais, hoje, se incluem o microscópio de tunelamento (*scanning tunneling microscope*) e o microscópio de força atômica. Além da visualização nanométrica de uma superfície, eles permitem manipular átomos e moléculas, que podem ser arrastados de um ponto e depositados em outro ponto previamente selecionado. Estes novos equipamentos e o avanço da Nanociência é que nos levaram a este momento.

Efetivamente, tais descobertas criaram um clima todo especial, pois colocavam a Nanotecnologia como “uma nova revolução científica”, potencializando o lançamento pelo Governo Clinton, em 2000, no *California Institute of Technology*, da *National Nanotechnology Initiative*, que proporcionou investimentos de US\$ 495 milhões, dando uma visibilidade extraordinária a esse campo de pesquisa.

Hoje, mais de 60 países, incluindo o Brasil, possuem iniciativas nacionais ligadas ao estudo das Nanociências e Nanotecnologias, sendo que seu investimento global certamente ultrapassa a esfera dos trilhões de dólares.

Portanto, por definição, a Nanotecnologia é o estudo, desenho, criação, síntese, manipulação, aplicação e exploração de materiais, aparelhos e sistemas funcionais através do controle da matéria na nanoescala. Ocupa-se da manipulação “controlada” e produção de materiais, instrumentos e estruturas em escala nanométrica.

Diante do exposto, é conveniente fazer algumas colocações. Os prefixos micro, nano, mili, centi são usados para que se possa especificar o fator pelo qual é multiplicada uma determinada grandeza. Na verdade, estão associados com potências de 10. Assim, como quilo corresponde a um fator 10^3 , mili corresponde a 10^{-3} . Na escala nano (nm), o fator de grandeza corresponde a 10^{-9} . Assim, quando se fala de 1 nanômetro, refere-se a um fator de 10^{-9} do metro, ou seja, um bilionésimo do metro. Esse tamanho é aproximadamente 100 mil vezes menor do que o diâmetro de um fio de cabelo, 30 mil vezes menor que um dos fios de uma teia de aranha ou 700 vezes menor que um glóbulo vermelho. É exatamente nessa escala de tamanho que a Nanotecnologia é trabalhada e que os objetos nanotecnológicos são concebidos. Nessa mesma escala estão os átomos e as moléculas. Podemos definir nanomateriais (NMs) como compostos orgânicos ou inorgânicos, cujo tamanho varia de 1 a 100 nm, pelo menos em uma de suas dimensões e que possuem propriedades específicas, diferentes daquelas dos mesmos compostos em escala macroscópica (WHATMORE, 2006). NMs têm sido amplamente apli-

cados em vários setores da produção, como o da saúde, em sistemas de distribuição de medicamentos, vacinas, sensores etc. (PASCHOALINO et al., 2010). Vejamos alguns exemplos de comparação de tamanhos, conforme apresentado nos quadros 1 e 2:

Quadro 1: Conhecendo o Tamanho

Átomo (H)	0,1 nm
DNA	2,0 nm
Proteínas	5,0-50 nm
Vírus	75-100 nm
Bactérias	1000-10000 nm
Células Brancas	10000 nm

Fonte: ABDI, 2010

É senso comum considerar os vírus e as células brancas como entidades muito pequenas. Entretanto, dentro da escala nanométrica, as células brancas são enormes, dado que as entidades típicas tratadas pela Nanotecnologia geralmente estão entre 1 e 100 nm. Não se pode esquecer que 1.000 nanômetros é igual a 1 micron, portanto as células brancas podem ter até 10 micra ou 10^4 nm, ou seja, enormes, frente ao tamanho de algumas entidades típicas da Nanotecnologia que figuram no quadro 2.

Quadro 2: Tipos de partículas

Nanopartículas	1-100 nm
Fulereo (C60)	1 nm
Quantum dot (CdSe)	8 nm
Dendrímeros	10 nm

Fonte: Laboratório de Química do Estado Sólido da Universidade Estadual de Campinas

(<http://lqes.iqm.unicamp.br>).

Efeitos como gravidade, fricção, combustão, eletrostática, forças de Van der Waals e movimentos brownianos estudados em livros de ciência estão, na intimidade, relacionados com escalas de tamanho (ABDI, 2010).

No quadro 3 são apresentados os fenômenos e suas respectivas escalas de tamanho, mostrando que existe uma dependência entre a escala de tamanho e os diferentes efeitos.

Quadro 3: Efeitos e escala de tamanho

Centímetro	Gravidade, fricção, combustão.
Milímetro	Gravidade, fricção, combustão, eletrostática.
Micrômetro	Eletrostática, força de Van der Waals, movimento browniano.
Nanômetro	Eletrostática, força de Van der Waals, movimento browniano, quântico.
Angström	Mecânica quântica.

Fonte: ABDI, 2010.

Como mostrado no quadro 3, ao entrar na escala nanométrica, grande parte dos efeitos estão relacionados com os aspectos quânticos.

A Nanotecnologia consolidou uma dinâmica de rápido desenvolvimento e aplicação diversificada em virtualmente todos os setores econômicos e não configura uma promessa ou uma ficção futurista: ela já é uma realidade observada em inúmeros produtos comercializados por diferentes setores. Dados recentes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) indicam que o mercado de produtos nanotecnológicos movimentou cerca de US\$ 350 bilhões em 2014, em 2015, esse valor teria sido superior a US\$ 1trilhão (MCTI).

Segundo Engelmann (2016), percebe-se então a crescente produção e utilização de produtos com nanotecnologias, demandando, portanto, um aprofundamento na questão da regulação ante a presença do risco. Da mesma forma, verifica-se a formulação de estudos que vislumbram orientações para um manejo adequado, bem como a exploração desta tecnologia da maneira mais benéfica possível.

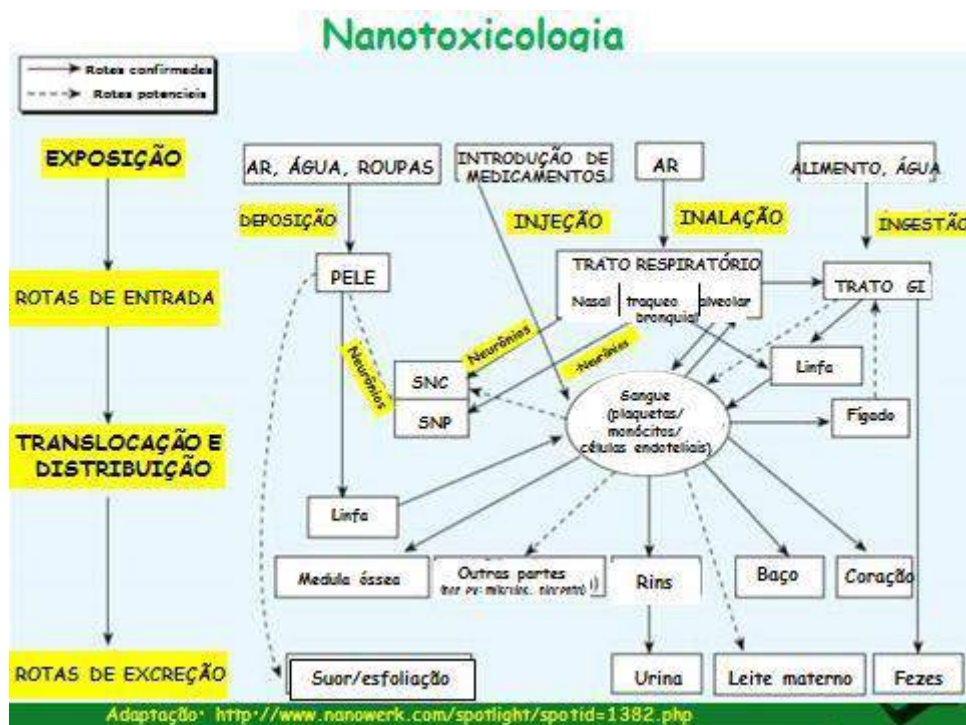
Na nanoescala o comportamento dos átomos é ditado por leis diferentes da Física, isto é, a Mecânica Quântica (GRAY, 2012 apud ENGELMANN, 2015). A mudança paradigmática da “Mecânica Newtoniana” para a “Mecânica Quântica” parece que ainda não foi percebida e que representa, justamente, um “detalhe” significativo na análise dos materiais elaborados a partir da escala nano.

O grande avanço no desenvolvimento de NMs não tem sido acompanhado, na mesma intensidade, de conhecimentos de seus potenciais efeitos deletérios (LOURO et al., 2013). Tem sido objeto de preocupação, inclusive, pesquisas clínicas com o uso de NMs, tendo em vista as, ainda, incipientes noções de nanotoxicidade humana e ambiental (LOURO et al., 2013). Desta forma, há que se definir Nanotoxicologia: é a ciência que estuda a toxicidade dos

NMs. Devido à escala nanométrica e grande área superficial, os mesmos têm propriedades únicas comparadas com os mesmos materiais em escala maior. Isto inclui um aumento da reatividade química na superfície da NP. Por conseguinte, conhecer as características das substâncias em tamanho maior não fornece informações compreensíveis sobre suas propriedades no nível nano. Enfatizando a importância do tamanho, as mesmas propriedades que alteram as características físicas e químicas das NPs, podem também, provocar consequências não pretendidas (e até desconhecidas) quando elas entram em contato com o organismo humano. Um material perfeitamente seguro para ser manuseado em tamanho maior, pode facilmente penetrar na pele na forma de NP ou se tornar um aerossol e entrar no organismo pela via respiratória. A reatividade devido à grande área superficial pode interagir com sistemas biológicos de forma desconhecida.

Nanotoxicologia é, então, uma subespecialidade da Toxicologia. Trata-se da Toxicologia das NPs (partículas <100 nm) que aparentam ter algum efeito tóxico não usual e diferente de partículas da mesma substância, mas de tamanho maior. Há vários mecanismos propostos para explicar a formação destas espécies reativas. No final, todas resultam em danos ao DNA, proteínas, lipídeos e outras biomoléculas, causando inflamação e mesmo a morte celular (KELLY, R.J., 2008). Éric Gaffet, que é um dos pioneiros na França no estudo da toxicologia das nanopartículas engenheiradas ou manufaturadas, destaca a dificuldade de se estudar estas partículas, pois suas propriedades singulares variam em função do modo de sua utilização e das etapas do seu ciclo de vida. Por conta disso, a prudência é um elemento necessário nesta matéria (NANOMÉDECINE, 2013, p. 93). Existem diversas possibilidades de rotas de contaminação, como mostra a Figura 1.

Figura 1: Rotas de contaminação



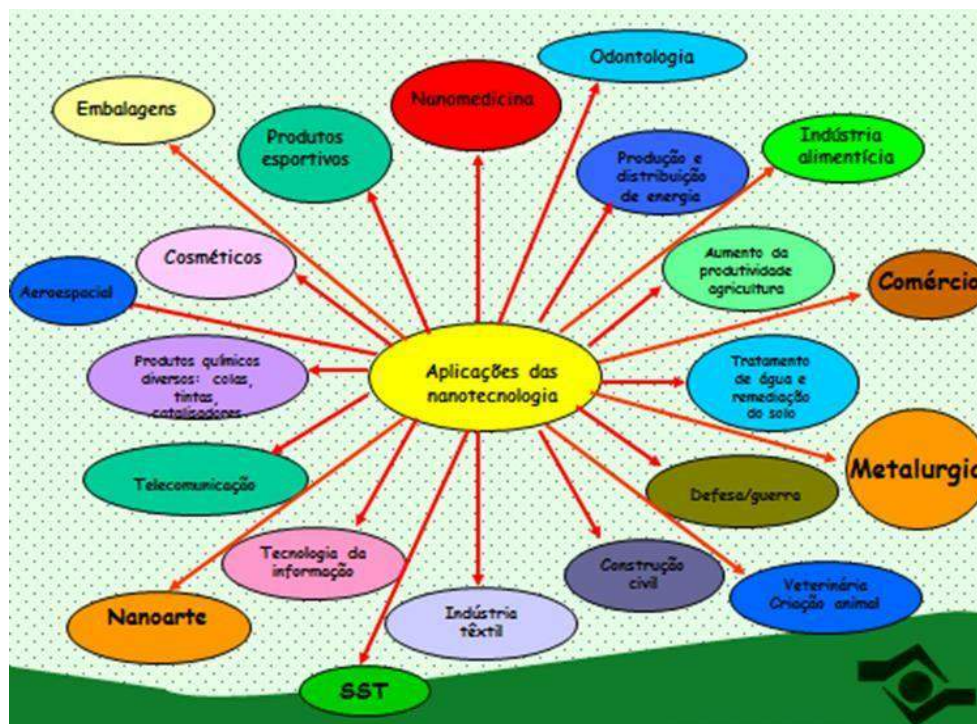
Fonte: <http://www.nanowerk.com>

Preocupação especial também diz respeito à toxicidade infantil e as vias de exposição de embriões, fetos e lactentes. A placenta é uma barreira de particular interesse uma vez que determina a exposição do embrião e do feto, que representam uma subpopulação vulnerável e sensível, exigindo consideração adicional. Estudos iniciais, *in vivo* e *ex vivo* indicam que alguns NMs são capazes de atravessar a barreira placentária, mas a passagem para o feto parece depender do tamanho e revestimento de superfície dos NMs, além do modelo experimental. Ensaio de toxicidade indicam que NPs podem induzir efeitos fisiológicos adversos e, mesmo, impedir a embriogênese (KULVIETIS et al., 2011).

Citando Hougaard (2015), a indústria de nanomateriais (NM) está crescendo rapidamente e com ela, a aplicação de NMs em produtos de consumo. Isso nos leva a refletir sobre o impacto destas nanotecnologias, que deverão provocar importantes consequências econômicas, sociais, ambientais e, até mesmo, militares. São bem amplos os seus campos de aplicação, com grande ação na Medicina, Engenharia, Informática, Física, Química, Biologia e tantas outras (Fig. 2). Um levantamento sumário nas publicações que circulam sobre Nanotecnologia aponta para os seguintes produtos e serviços que já estariam no mercado: tecidos resistentes a manchas e que não amassam; raquetes e bolas de tênis; capeamento de vidros e aplicações anticorrosão a metais; filtros de proteção solar; material para proteção contra raios

ultravioleta; tratamento tóxico de herpes e fungos; nanocola, capaz de unir qualquer material a outro; pó antibactéria; diversas aplicações na medicina como medicamentos, cateteres, válvulas cardíacas, marca-passos, implantes ortopédicos; limpeza de materiais tóxicos; produtos cosméticos; sistemas de filtração do ar e da água; microprocessadores e equipamentos eletrônicos em geral, etc.

Figura 2: Aplicações das Nanotecnologias



Fonte: Fundacentro (MTE) – [http://: www.fundacentro.gov.br](http://www.fundacentro.gov.br)

Cabe ressaltar que, os investimentos em pesquisa de novos materiais em nanotecnologia são cerca de 100 a 1000 vezes maiores (dependendo do país) do que os estudos sobre os impactos à saúde e ao meio ambiente.

Não poderemos, entretanto, refutar os benefícios extraordinários que estas novas tecnologias nos trarão, mas, em contrapartida, não devemos jamais ignorar os potenciais riscos que podem advir, tampouco conhecidos. Para tal, é imperioso pesquisar o enfrentamento acerca dos marcos regulatórios. Citando Engelmann (2016), “uma vez que se verifica a ausência de marcos regulatórios, urge que se implemente o diálogo entre as fontes do Direito com a finalidade de adequar-se às normas existentes, reforçando-se ainda na ideia do Pluralismo Jurídico defendido por Teubner”, e respeitando igualmente o Princípio da Precaução. A indús-

tria brasileira atualmente desenvolve nanotecnologias sem que o Estado tenha decidido o modelo regulatório.

Isso aumenta o risco de exposição, notadamente de mulheres grávidas e, portanto, a preocupação de que a inalação materna de NPs no ar pode interferir negativamente com o desenvolvimento fetal e infantil. Esta preocupação decorre, em parte, de estudos epidemiológicos e experimentais da poluição do ar ambiente, que podem conter níveis consideráveis de partículas. Embora os efeitos diferenciais da fração particulada em relação a outros componentes químicos e gasosos do ar poluído não possam ser inferidos diretamente desses estudos, é necessário cautela em sua interpretação com relação ao papel das partículas nanométricas. Seus achados justificam uma avaliação completa das implicações de exposição de NMs manufaturados, isto é, intencionalmente produzidos pelo homem, com vistas a possíveis resultados adversos à saúde após exposição no início da vida.

Globalmente, a literatura científica disponível até agora, como resumido nesta introdução, indica que o conhecimento atual sobre os possíveis riscos para a saúde com relação à exposição à NP é muito limitado no que diz respeito aos resultados reprodutivos e de desenvolvimento. A NP administrada por via sistêmica parece capaz de atingir a placenta, atravessar a barreira hemato-placentária, acumular-se nos tecidos fetais e causar efeitos adversos à saúde da gestante e do feto. O conjunto limitado de dados sobre a exposição das vias aéreas às NPs não indica, no entanto, efeitos adversos nos parâmetros clássicos da gestação e da prole. Mesmo que os efeitos adversos da exposição materna às NPs não sejam evidentes no embrião/feto, eles podem se manifestar mais tarde na vida. Assim, várias pesquisas em base de dados, relatam que a função de órgãos da descendência pode ser suscetível a perturbações por exposição à inalação materna. Isto diz respeito aos sistemas reprodutores, nervosos, imunitários e cardiovasculares masculinos, dos quais os últimos três raramente são submetidos a estudos em diretrizes atuais. A função reprodutiva e metabólica feminina pouco tem sido estudada.

Em seu estudo Hougaard (2015) afirma que as conclusões sobre NPs são geralmente corroboradas por observações em estudos de poluição do ar, principalmente a partir de escapes de diesel (ED), e partículas de escape de diesel (PED). Contudo, deve-se notar que, em contraste com os achados para NPs, vários estudos de ED e PED observam que a inalação materna aqui afeta o peso da prole, no nascimento, na lactação e até mesmo na idade adulta. Possivelmente, esses efeitos não se devem à fração particulada no ar poluído, mas sim aos produtos químicos associados, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP). Isto, seguramente, estende-se ao mundo do trabalho.

Em estudos recentes, coelhos e *guinea-pigs* parecem ser mais semelhantes aos seres humanos (FISHER B. et al, 2012 e CARTER A.M., 2007 apud HOUGAARD et al, 2015), podendo, portanto, ser modelos animais preferíveis neste respeito. A embriogênese precoce ocorre antes de a placentação¹ ser concluída e os estudos de exposições no início da gravidez, seriam, portanto, esperados serem pouco influenciados pelas diferenças entre espécies na placentação. Ao interpretar e conceber estudos em animais para tradução para a saúde humana, o maior tempo de gestação em seres humanos em comparação com muitos modelos animais (270 versus 20 dias em roedores) pode permitir a acumulação de NPs além de um limiar crítico para a indução de efeitos diretos no embrião/feto. Esse limite (se houver) não é atualmente conhecido. A sua determinação provavelmente representa um dos principais problemas em pesquisas futuras sobre a toxicidade no desenvolvimento. Nesta luz, a exposição pulmonar de animais gestantes com um tempo de gestação comparável ao dos seres humanos pode ser de grande ajuda.

Tais achados, mesmo ainda precoces, trazem a Saunders (2009) a preocupação da já existência de muitos NMs no mercado, e revelam a necessidade premente de compreensão de como NMs interagem com o corpo humano após exposição, em especial quando se fala de trabalhadores e consumidores, sendo primordial para isso a avaliação de barreiras biológicas, que controlam o acesso a todo o organismo e órgãos específicos.

Trabalhadores, de uma forma geral, são os mais expostos a risco. A legislação reconhece tal fato e estabelece critérios para o trabalho em condições insalubres (por exemplo, as Normas Regulamentadoras do Ministério do Trabalho e Emprego - NR, 2015). E, em termos gerais, critérios mais rígidos para gestantes e lactantes. As Normas Regulamentadoras, também chamadas de NRs, foram publicadas pelo Ministério do Trabalho e Emprego (MTE), Portaria n.º. 3.214/78, para estabelecer os requisitos técnicos e legais sobre os aspectos mínimos de Segurança e Saúde Ocupacional (SSO). São, portanto, de observância obrigatória pelas empresas privadas e públicas e pelos órgãos públicos da administração direta e indireta, bem como pelos órgãos dos Poderes Legislativo e Judiciário, que possuam empregados regidos pela Consolidação das Leis do Trabalho (CLT). O não cumprimento das disposições legais e regulamentares sobre segurança e saúde no trabalho acarretará ao empregador a aplicação das penalidades previstas na legislação pertinente. Atualmente, existem 36 Normas Regulamentadoras. Não há, porém, ainda, no país, como já descrito, normas específicas voltadas à exposição e à proteção à NMs. Nem em ambientes laborais produtores intencionais de NMs,

¹ Processo que forma a placenta; desenvolvimento das membranas extraembrionárias e a maneira como os óvulos se distribuem no ovário.

nem nos demais, em que possa haver produção de NMs não intencionais. A NR que mais se aproxima das chamadas NPs é a NR 15, que versa sobre ATIVIDADES E OPERAÇÕES INSALUBRES, em seu ANEXO N.º 12 - Limites de Tolerância para poeiras minerais, em que aborda a legislação em vigor no país sobre fibras respiráveis e não respiráveis, notadamente, em correlação com o asbesto, sílica livre cristalizada e manganês. Não obstante, infelizmente, aquém da legislação internacional. Parte não desprezível da poluição atmosférica (em termos de concentração de partículas, não de massa) encontra-se sob a forma de nanopartículas, mas não há normas a eles direcionadas também (PASCHOALINO et al., 2010).

Se normas não existem, trabalhadores expostos sim, e tampouco informados. Precisam de condições especiais de trabalho? Há modelos em desenvolvimento de sistemas para controle, ao menos parcial, de exposição? (ANDRADE et al., 2013). Deveriam ser eles adotados de imediato?

O objetivo deste trabalho é fazer um amplo levantamento da exposição à nanopartículas de prata (AgNPs), em ambientes laborais ou não (pouco se conhecem discussões sobre o tema na literatura, inclusive internacional), através da avaliação da qualidade de revisões sistemáticas previamente selecionadas e avaliar sua toxicidade e seus potenciais riscos, contribuindo desta forma para elaboração de uma legislação que contemple tais riscos, promovendo também o direito à informação, o princípio da precaução e a proteção destes trabalhadores bem como de consumidores.

2 REVISÃO DE LITERATURA E REFERENCIAL TEÓRICO

Em recém-publicado documento da *World Health Organization* (WHO), do qual esta pesquisadora honrosamente participa, os autores fazem uma ampla reflexão sobre os riscos a que trabalhadores que manipulam nanomateriais manufaturados estão expostos. Em vista disso, foi lançado, com muita propriedade, o documento “*WHO guidelines on protecting workers from potential risks of manufactured nanomaterials (2017)*”. Neste pertinente registro, os autores estabelecem diretrizes para proteção destes trabalhadores em seus diferentes sítios de exposição. O texto ressalta a importância da toxicidade dos nanomateriais (NMs), que pode depender em grande parte de numerosas propriedades físico-químicas, incluindo tamanho, forma (isto é, tamanho em uma dimensão particular), composição, características da superfície, carga e taxa de dissolução. Atualmente, há uma escassez de informações precisas sobre as vias de exposição humana para NMs, seu destino no corpo humano e sua capacidade de induzir efeitos biológicos indesejáveis, como a geração de estresse oxidativo. Os dados de estudos de inalação de NMs *in vitro*, animal e humano estão disponíveis para apenas alguns NMs. Até o presente momento, não foram observados efeitos adversos em longo prazo sobre a saúde em seres humanos. Isso pode ser devido à recente introdução destes materiais, a abordagem preventiva para evitar a exposição e preocupações éticas sobre a realização de estudos em humanos. Isto revela que, com exceção de alguns materiais onde estudos humanos estão disponíveis, as recomendações de saúde devem basear-se na extrapolação da evidência de estudos *in vitro*, animais ou outros de campos que envolvem exposição a partículas de nanoescala, como poluição do ar, para possíveis efeitos em humanos. O texto adverte para o aumento da produção de NMs e sua utilização em produtos industriais e de consumo, o que significa que trabalhadores em todos os países estarão na primeira linha de exposição a esses materiais, colocando-os em risco aumentado de potenciais efeitos adversos para a saúde. Cabe ressaltar que, as propriedades únicas dos NMs podem resultar em comportamento altamente desejável, incluindo, mas não limitado à maior reatividade ou maior condutividade. Como tal, a última década testemunhou, oportunamente, a exploração dessas propriedades únicas para aplicações industriais e de consumo, e vários tipos de NMs encontraram seu caminho para uma grande quantidade de setores, incluindo aeroespacial, cosméticos, alimentos, eletrônicos, construção e medicina, entre outros. Em vista desta inovação, recursos acadêmicos e industriais significativos foram dedicados ao campo da nanotecnologia, aumentando o alcance e o número de NMs que estarão disponíveis para uso futuro. No entanto, as tais nanopartículas também po-

dem apresentar riscos à saúde que diferem daqueles da substância em massa e requerem diferentes métodos de teste para perigo, exposição e avaliação de risco destes seus equivalentes. Nanomateriais estão sendo usados em um número cada vez maior de produtos e indústrias, por conseguinte, o número de trabalhadores expostos a eles, embora não conhecido, está aumentando com a produção industrial e o uso destes materiais. As diretrizes da WHO reiteram que, no local de trabalho, os riscos para a saúde podem resultar de inalação, ingestão ou absorção cutânea de NMs. Os pulmões humanos representam uma excelente porta de entrada para NMs devido à sua grande área superficial, finas barreiras epiteliais e vascularização extensa; e embora a exposição dérmica e oral possa ocorrer, a inalação é mais provável que resulte de uma maior dose sistêmica de NMs. Atualmente, a inalação de partículas biopersistentes e fibras com uma morfologia semelhante ao amianto é o maior perigo para a saúde, possivelmente resultando em inflamação local e câncer. Não obstante os seres humanos tenham sido expostos a nanopartículas produzidas de forma involuntária, como as provenientes de processos de combustão, o aumento recente da produção de NMs exige uma maior investigação sobre a toxicidade potencial e os efeitos adversos para a saúde desses materiais após a exposição. Uma vez que os NMs recém-desenvolvidos não são suficientemente testados para possíveis riscos à saúde, geralmente é recomendado tomar uma abordagem preventiva até que os resultados dos testes estejam disponíveis. Isso denota que os NMs devem ser considerados perigosos, a menos que haja evidências explícitas de que não são. A publicação da WHO reforça que, embora existam estimativas disponíveis das toneladas (t) de nanomateriais produzidos anualmente e utilizadas em todo o mundo, este *Development Guideline Group* (GDG) da WHO não encontrou evidências convincentes de como essas estimativas podem ser correlacionadas com a exposição do trabalhador. As estimativas atuais do número de trabalhadores potencialmente expostos a nanomateriais em países específicos indicam que ainda são uma proporção relativamente pequena de todos os trabalhadores. De acordo com esta fonte, o volume de NMs no mercado pode ser classificado da seguinte forma:

1. Negro de carbono (9,6 milhões de toneladas)
2. Sílica amorfa sintética (1,5 milhões de toneladas)
3. Óxido de alumínio (200 000 t)
4. Titanato de bário (15 000 t)
5. Dióxido de titânio (10 000 t)
6. Dióxido de cério (10 000 t)
7. Óxido de zinco (8000 t)

8. Nanotubos de carbono (CNTs) e nanofibras de carbono (CNFs), (100-3000 t).

9. Nanopartículas de prata (20 t).

Em citação extremamente pertinente, a WHO (2017) reconhece, todavia que, a implementação de regulação de saúde e segurança no trabalho geralmente é menos efetiva nos países de renda baixa e média, o que significa que os trabalhadores desses países correm maior risco de efeitos negativos para a saúde que seus homólogos em países de alta renda. Isto é em parte porque o uso de NMs geralmente não é conhecido ou bem compreendido. Apesar da publicação de uma grande quantidade de artigos científicos sobre nanotecnologia por autores de países de renda baixa e média, apenas alguns se referem à toxicidade potencial de NMs e muito poucos relatórios sobre segurança ou avaliação de risco.

21 NANOPARTÍCULAS DE PRATA: UMA PREOCUPAÇÃO RELEVANTE?

Esta investigação tem como preocupação a avaliação da toxicidade associada à exposição humana e de mamíferos, às nanopartículas de prata, devido à abundância relativa de dados de toxicidade disponíveis para essas partículas, em comparação com outras partículas de metal. Desta forma, isso permitiu o conhecimento sobre o entendimento atual do campo a ser obtido e demonstrou onde existem lacunas no conhecimento. Segundo Johnston (2016), prevê-se que a avaliação dos riscos associados a estas partículas, oportunize, em última instância, concluir as avaliações de risco, combinando essa informação com o conhecimento sobre o nível de exposição humana, nossa inquietação maior. A quantidade de informações de perigo disponíveis para os metais é ainda maior para as partículas de prata, devido à sua inclusão generalizada dentro de uma série de produtos diversos (incluindo roupas e amplo uso na Medicina), que decorre principalmente do seu comportamento antibacteriano.

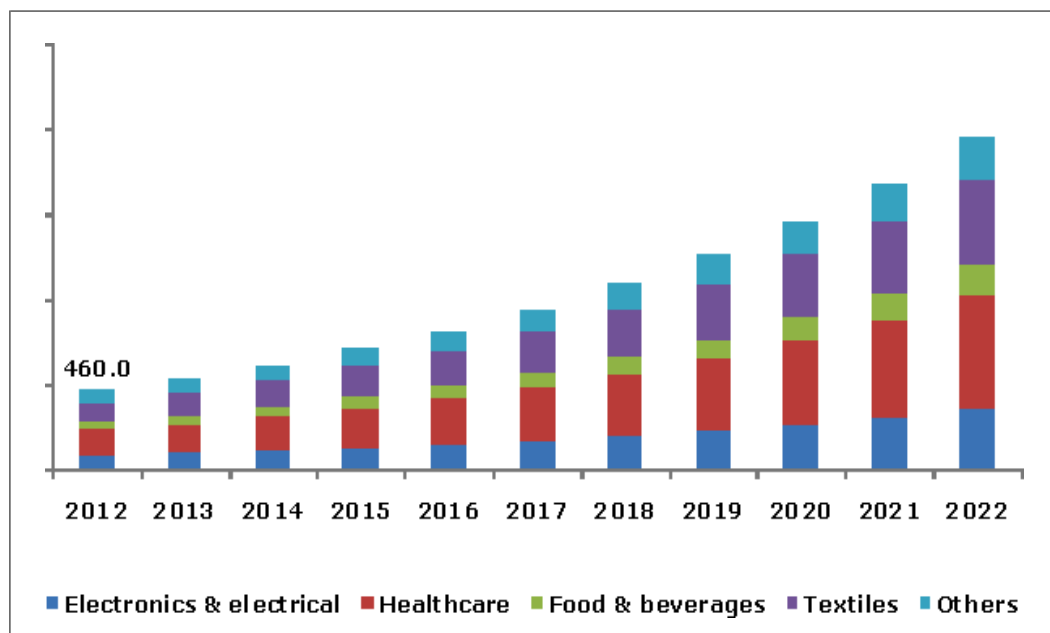
Além disso, segundo documento recente da *European Commission* (EC) de 2014, os efeitos adversos indiretos na saúde humana podem ocorrer através de um aumento resistência de microorganismos contra a prata, incluindo a nanop prata e seus compostos. Isso pode limitar a utilidade da mesma em dispositivos médicos e outras aplicações médicas.

Para mais, a prata pode estar presente em diferentes formas (metálicas - nanoformas ou não - e sais), e não está claro como essas diferentes formas de prata influenciam suas propriedades antimicrobianas, um possível aumento da resistência antimicrobiana e o processo de cicatrização de, por exemplo, queimaduras. Revisões recentes e publicações propõem uma

combinação de nanop prata com antibióticos habituais para o tratamento de doenças infecciosas específicas causadas por bactérias resistentes (EUROPEAN COMMISSION, 2014).

Neste viés, outra apreensão se faz premente. Segundo estudo da *Grand View Research – Market Research & Consulting (2012)*, o mercado mundial de nanopartículas de prata deverá atingir US \$ 2,45 bilhões até 2022. De acordo com a pesquisa, a demanda crescente de materiais antimicrobianos em aplicações de saúde deve gerar mercado de nanopartículas de prata ao longo deste período de previsão. O desenvolvimento de produtos eletrônicos *high-end*, juntamente com a crescente demanda por *gadgets*, deverá promover o crescimento do mercado de nanopartículas de prata nos próximos sete anos. A Fig.3 ilustra, segundo o presente documento, o mercado global de AgNPs, por aplicação, no período de 2012-2022.

Figura 3: Mercado global de AgNPs, por aplicação, no período de 2012-2022 (t)



Fonte: Grand View Research – Market Research & Consulting (2012)

Em face do exposto, podemos evidenciar que a saúde tem sido o segmento de maior crescimento, representando mais de 30% da receita global de mercado de nanopartículas de prata no ano de 2014, com previsão de considerável e predominante aumento até 2022. Especula-se que a preocupação em relação ao bem-estar geral, aumento da população geriátrica e aumento da renda disponível, possa ampliar o mercado de AgNPs. O aumento da demanda por produtos têxteis antimicrobianos devido à crescente conscientização do consumidor em relação à higiene é também estimado para estimular o crescimento deste mercado.

Na contramão deste avanço, Johnston (2016) segue afirmando que, consequências inflamatórias, oxidativas, genotóxicas e citotóxicas estão associadas à exposição a partículas de prata e estão inerentemente ligadas. O órgão alvo principal de acumulação destas partículas tem sido coerentemente demonstrado como o fígado e, portanto, é relevante que uma série de investigações *in vitro* tenha atentado a este potencial órgão. No entanto, cabe ressaltar que ainda há uma lacuna nas informações de toxicidade *in vitro* e *in vivo* e é sabido que, o tamanho da partícula é influente em ditar a toxicidade observada e que, partículas menores são as maiores responsáveis, provavelmente pelas diferenças em sua área superficial. Outra questão importante a ser esclarecida é desvendar se as reações relacionadas a esta exposição advêm de seu pequeno tamanho ou da dissolução de suas partículas, contribuindo para tal toxicidade. Possivelmente uma combinação de ambos poderá ocorrer, posto que, a liberação de íons seria maior para partículas menores (LUBICK et al., 2008).

Em vista deste postulado, esta revisão, terá como eixo principal, como referido, as nanopartículas de prata (AgNPs). A nanop prata e outras formas de prata são amplamente utilizadas hoje em dia por suas atividades antibacterianas. A *European Commission* (2014), retrata as diferentes formas de prata, incluindo sais de prata, óxidos de prata e materiais de prata que aparecem como fios de prata, AgNPs e outras, que são utilizadas em produtos médicos e de consumo, afirmando que podem ter diferentes propriedades físico-químicas, como solubilidade distinta e relação superfície-volume, que podem afetar seu destino e atividade biológica. No cuidado médico, são utilizadas formas de nanop prata, por exemplo, em curativos para feridas e cateteres para reduzir infecções. Nos produtos de consumo, são utilizadas formas de nanop prata, por exemplo, em esportes e outros têxteis, sabão em pó e desodorantes, onde a mesma deve reduzir a produção de odores produzindo bactérias. Em vista do crescente uso destes compostos, várias questões foram levantadas: esses produtos de consumo e de saúde são perigosos para o meio ambiente e / ou para a saúde humana; os microrganismos podem tornar-se resistentes à prata (incluindo a nanop prata e compostos à base de nanop prata); e existe, certamente, algum risco de aumento da resistência bacteriana em relação ao seu uso generalizado e difundido. Atualmente, os produtos que contêm formas de nanop prata são difíceis de rastrear, uma vez que são comercializados sob inúmeras marcas e, com poucas exceções, os atuais regulamentos de rotulagem não exigem especificamente a inclusão de NMs como componentes.

É cónito que a exposição ao consumidor depende da localização do nanomaterial em produtos para consumidores / médicos e / ou da manipulação do produto. Para determinar o nível de exposição, é necessária mais informação sobre as concentrações de prata nos pro-

duto, o tamanho e a forma em que está presente e a probabilidade de liberação de AgNPs ou de íons de Ag destes produtos. O mesmo documento reitera que ao avaliar o fim do ciclo de vida dos produtos contendo AgNPs, presume-se que a gestão de resíduos (reciclagem, tratamento de águas residuais, aterro e incineração) é semelhante aos produtos convencionais. Por conseguinte, o teor de prata em resíduos não reciclados, em última análise, acabará no ambiente, seja como resíduos sólidos em aterros sanitários, emissões de estações de tratamento de águas residuais ou como lixo residual de instalações de incineração. Nos seres humanos, a biodisponibilidade da prata após a administração oral e pulmonar de AgNPs já foi demonstrada. Os principais órgãos-alvo para a deposição de AgNPs após a disponibilidade sistêmica, como reforçamos mais adiante, são baço, fígado e rim, enquanto a distribuição é menor para outros órgãos. Além disso, já foram encontrados níveis elevados de prata também nos testículos (EUROPEAN COMMISSION, 2014).

Os efeitos adversos mais bem descritos nos seres humanos de exposição crônica à prata são a descoloração cinza azulado permanente (argiria ou argirose) da pele e / ou olhos. Em diversos estudos de toxicidade em animais foram observados um aumento de várias enzimas hepáticas, indicando toxicidade hepática após administração de nanopartículas de prata. No entanto, esta toxicidade hepática não foi confirmada pela histopatologia. *In vivo*, exposição oral a nanopartículas de prata não resultou consistentemente em alterações de respostas imunes não específicas. No entanto, para exposição intravenosa, demonstrou-se que o sistema imunológico é o alvo mais sensível para a toxicidade de AgNPs. Sob outra ótica, *in vitro*, o efeito genotóxico da nanop prata também foi noticiado. Como os estudos disponíveis sobre a genotoxicidade *in vivo* de AgNPs ainda são poucos, concluiu-se que estudos adicionais são necessários para conclusões definitivas. Cabe ressaltar que, em muitos estudos, a liberação de prata iônica foi considerada a principal causa de toxicidade (em seres humanos, no meio ambiente e em dispositivos de higiene), no entanto, um número crescente de estudos descobriu que esta liberação não pode sozinha, explicar os efeitos tóxicos observados. As atuais avaliações de risco humano baseiam-se, principalmente, no desenvolvimento de argiria. Nos trabalhadores, a EC ratifica o limiar para prata metálica de 0,1 mg / m³ e 0,01 mg / m³ para sais de prata. Para a população em geral, a OMS definiu um Nível de Efeito Adverso Não Observável (NOAEL), relacionado à soma de todas as rotas de exposição de 5 µg / kg de peso / dia. Uma avaliação de risco detalhada de nanop prata não foi realizada uma vez que, como já referido, pouca informação está disponível. A AgNP sofre várias transformações quando é lançada no meio ambiente. Ademais, além da agregação e aglomeração, as mais importantes são a dissolução e subsequente especiação, como a formação de cloreto de prata e sulfureto de prata. O

sulfureto de prata é particularmente importante porque é altamente estável; o sulfureto está disponível em tratamento de águas residuais e também em muitos corpos de água doce. As espécies químicas que estão realmente presentes determinam a biodisponibilidade e a toxicidade da prata no meio ambiente. A biodisponibilidade da nanopartícula de prata nos solos depende das propriedades das partículas e também do próprio solo. Em geral, a mobilidade da prata iônica no solo e nos sedimentos é muito limitada; no entanto, as partículas podem se comportar de forma diferente.

Existe um efeito de AgNPs sobre a composição da flora bacteriana e sobre a adaptação bacteriana associada a certas condições e usos. No entanto, esta evidência é muitas vezes fragmentada e focada em alguns casos específicos. Há uma escassez de informações sobre potenciais mecanismos de resistência a AgNPs. A exposição à prata iônica e AgNPs produz uma resposta ao estresse e afeta a expressão gênica. São necessários mais dados para entender melhor a resposta bacteriana a estes materiais. No que concerne ao risco associado à disseminação do mecanismo de resistência após o uso da nanoprata, nenhuma documentação está disponível neste momento. Isso, seguramente, representa um grave hiato no conhecimento.

22 TOXICOCINÉTICA DA PRATA

Cabe aqui evidenciar a relevância do domínio deste conceito, a luz dos fundamentos de uma ciência propecta e multidisciplinar denominada Toxicologia.

A título de esclarecimento, relembremos as fases da intoxicação:

1 - Fase de exposição: fase em que as superfícies interna ou externa do organismo entram em contato com o toxicante. Aqui deve ser considerada a via de penetração e o tempo de exposição ao toxicante e sua concentração;

2 - Fase toxicocinética: fase que tem seu início com a penetração do toxicante, distribuição, armazenamento, eliminação e excreção;

3 - Fase toxicodinâmica: fase onde o agente tóxico exerce sua atividade, interagindo com diversos tecidos e órgãos, suscitando alterações bioquímicas e/ou fisiológicas;

4 - Fase clínica: surgimento dos sintomas.

Desta forma, apontando a toxicocinética geral da prata, como cita o texto da *European Commission* (2014), o risco à saúde das aplicações de nanoprata está notoriamente relacionado a potencial exposição de indivíduos a tal material. Se não há absorção, os riscos potenciais do uso externo são restritos aos possíveis efeitos locais no sítio de exposição, princi-

palmente pulmonar, trato gastrointestinal e pele. Não obstante, os dados sobre absorção e exposição sistêmica de NMs são limitados e podem variar dependendo das propriedades físico-químicas de cada partícula e das barreiras locais presentes em diferentes órgãos. No contexto da pele, a absorção destes materiais é, via de regra, considerada muito baixa ou ausente. O referido texto também menciona que, a disponibilidade sistêmica após a exposição oral e inalatória também é, geralmente, considerada menor para nanomateriais do que para moléculas. A absorção limitada destes materiais, portanto, complica os estudos de distribuição e eliminação dos órgãos - outros aspectos da toxicocinética.

2.2.1 Administração sistêmica (via endovenosa)

Foi realizado um estudo em que a depuração do sangue e a distribuição de tecido de três tamanhos diferentes (20 nm, 80 nm e 110 nm) de partícula de nanop prata esférica estabilizada com tampão de citrato foi investigada em ratos por Lankveld et al. (2010) apud *Euro-pean Commission* (2014). Após administração IV única e repetida de 1 ml / animal (~ 25 µg / mL, cerca de 0,1 mg / kg de peso corporal / dia) para os três tamanhos de nanop prata (medido como Ag por *Inductively coupled plasma mass spectrometry – {ICP-MS²}*), observou-se uma rápida depuração no sangue durante os primeiros 10 minutos depois da administração. Após uma única administração, o fígado e o baço foram os dois principais órgãos para distribuição de Ag. Observou-se um aumento gradual após administrações repetidas (cinco vezes), e no sexto dia, um dia após a última administração, Ag foi demonstrada em todos os órgãos investigados, incluindo pulmões, fígado, baço, rins, coração, cérebro e testículos. Os níveis mais elevados foram observados no fígado e no baço com níveis mais baixos nos pulmões e nos rins. O estudo afirma que as AgNPs de 20 nm foram distribuídas principalmente no fígado, seguido dos rins e baço, enquanto que as AgNPs maiores que 80 nm e 110 nm foram distribuídas, principalmente, no baço seguido pelo fígado e pelos pulmões. Além disso, níveis baixos de Ag puderam ser detectados no sangue. Seguindo o mesmo estudo, as AgNPs de 20 nm mostraram, em geral, uma distribuição menor nos órgãos do que as AgNPs de 80 e 110 nm, entretanto, um nível mais alto nos rins. Portanto, isso poderia implicar que alguma excreção ocorreu para as AgNPs de 20 nm ou a distribuição significativa ocorreu em órgãos que não foram examinados no estudo. Do sexto ao décimo sétimo dia, houve uma diminuição gradual nos níveis de prata orgânicos para os três tamanhos de NP, embora no dia 17, Ag ainda fosse

²Tipo de espectrometria de massa que é capaz de detectar metais e diversos não metais em concentrações tão baixas como uma parte em 10¹⁵ (1 parte por trilhão, para determinados isótopos).

detectável em níveis baixos nos rins e cérebro, e em níveis consideráveis no fígado, baço e pulmões.

Outros estudos foram desenvolvidos com a finalidade de experienciar a via endovenosa, tal como Park et al. (2011) que avalia a biodisponibilidade e a distribuição tecidual de 7,9 nm de AgNPs (revestidas com citrato) após uma única administração IV de 1 e 10 mg / kg de peso corporal em ratos até 96 h após administração usando ICP-MS para detecção de Ag. A distribuição dos tecidos foi apenas evidenciada nos pulmões, fígado e rins, tal como em outros estudos. Nos três órgãos, a Ag pôde ser detectada até 96 h após a administração com os níveis mais altos presentes no fígado. No fígado e nos pulmões, observou-se uma diminuição gradual do teor de Ag, enquanto nos rins o nível de Ag permaneceu semelhante entre 24 h e 96 h. A concentração de Ag foi muito maior nas fezes em comparação com a urina, indicando excreção preeminente através da bile.

Outro interessante estudo performado por Xue et al. (2012), que também utiliza administração intravenosa, neste contexto em camundongos com nanopartículas de prata de 12-20 nm (média de 15nm, revestimento não revelado) em doses consideravelmente mais elevadas de 7,5, 30 e 120 mg / kg de peso corporal. Este estudo também evidenciou os níveis mais elevados de Ag (medição de ICP-MS) no baço seguido pelo fígado, pulmões e rins, enquanto a distribuição a outros órgãos (cérebro, coração, músculo) foi relativamente baixa. De forma intrigante, constatou-se uma diferença relacionada ao gênero na biocinética, uma vez que em machos o tempo de meia-vida no sangue ($T_{1/2}$) foi de 15,6 h em comparação com 29,9 h nas fêmeas. À vista disso, pareceu haver uma depuração sanguínea mais rápida em camundongos machos. Após uma única administração de AgNPs houve um declínio gradual no conteúdo de Ag em vários órgãos, embora o Ag ainda fosse detectado no dia 14 após administração com o maior nível de Ag no baço. No baço, houve apenas um declínio limitado no conteúdo de Ag que foi observado principalmente em camundongos machos. Nas fêmeas, nos pulmões e rins, observaram-se níveis significativamente maiores no décimo quarto dia em comparação com os machos.

Consequimos, portanto, em vista da similitude destes e de outros estudos retratados em vasta literatura, concluir que pela administração endovenosa, observa-se acúmulo destas nanopartículas, notadamente, no fígado e baço, desde os primeiros minutos de sua administração, com permanência média de 96h, e prevalente excreção pelas fezes.

2.2.2 Inalação

Igualmente, estudos de inalação foram executados por diversos pesquisadores. Dois estudos de toxicidade por inalação de dose repetida em 28 e 90 dias, respectivamente, foram publicados e incluíram investigações sobre a absorção sistêmica do pulmão (Ji et al., 2007, Sung et al., 2009). As AgNPs foram geradas pela evaporação / condensação originadas da Ag, utilizando um pequeno aquecedor de cerâmica, que produziu partículas de tamanhos entre 2 a 65 nm. As doses de exposição para o estudo de 28 d foram: baixa, (0,48 $\mu\text{g} / \text{m}^3$), média (3,48 $\mu\text{g} / \text{m}^3$) e alta (61,24 $\mu\text{g} / \text{m}^3$), com as nanopartículas de prata com um diâmetro médio geométrico (GMD) de 11,9 nm, 12,4 nm e 14,7 nm, respectivamente. Para avaliar a distribuição do tecido, o teor de prata foi determinado pelo AAS (*Atomic Absorption Spectrometry*). Após 28 dias de inalação, observou-se aumento significativo do conteúdo de Ag dependente da dose no pulmão, com indicação de redução da depuração na dose superior (0,06 mg / m^3). Do mesmo modo, foram identificados aumentos dose-dependente no conteúdo de Ag no fígado, bulbo olfatório e cérebro. Tanto para animais do sexo masculino como feminino, a distribuição de prata estava na mesma ordem de grandeza (Ji et al., 2007). Em um estudo de acompanhamento de 90 dias com AgNPs de 19 nm e maiores concentrações de 0,049, 0,133 e 0,515 mg / m^3 de Ag podem ser demonstrados no fígado, rins, bulbo olfatório, cérebro e sangue, além do pulmão, confirmando a absorção de Ag como AgNPs ou íons de prata. Neste estudo foi evidenciada a presença de Ag no sangue após a inalação, que pode ser salientada pela translocação através de três rotas possíveis: ingestão, absorção no trato GI via gânglios linfáticos ou via translocação para o sangue através de células epiteliais alveolares (OBERDÖRSTER, 1988). Além da absorção pelo sangue, a presença no cérebro pode ser explicada pela captação através do epitélio nasal e do nervo olfativo (OBERDÖRSTER et al., 2004). Algumas diferenças foram observadas entre ratos machos e fêmeas, com ratas fêmeas com maior conteúdo de Ag nos rins em comparação com os ratos machos (SUNG et al., 2009).

2.2.3 Via Oral

O tão citado documento da *European Commission* (2014) reforça que muitos estudos abordaram o destino das AgNPs após a administração oral. Num estudo de toxicidade oral de dose repetida de 28 dias, Kim et al. (2008) investigaram AgNPs (60 nm) em ratos. O conteúdo de Ag nos órgãos foi determinado pelo método AAS. Em função da dose a acumulação de Ag foi observada em todos os tecidos examinados (sangue, cérebro, rim, fígado, pulmão, estômago e testículos). Os níveis mais altos foram observados no estômago, seguido pelo fígado, rins

e pulmões. O baço não foi investigado. Nos rins, tal qual em outros estudos, observou-se um acúmulo gênero-dependente com um teor maior de Ag maior em ratos do sexo feminino quando comparado com ratos machos, enquanto que em outros órgãos o conteúdo de Ag era semelhante. Em um estudo adicional, foi demonstrado que o maior teor de Ag nos rins femininos estava presente em todas as regiões do rim, incluindo córtex, medula externa e medula interna. A histologia após uma dosagem oral repetida de 28 dias revelou a presença de partículas nas áreas luminal e superficial e AgNPs no tecido do trato gastrointestinal (JEONG et al., 2010).

Sob a mesma ótica, além da administração IV citada anteriormente, Park et al. (2011) também investigaram o destino das AgNPs administradas por via oral (7,9 nm) em ratos. Análogo as AgNPs, a Ag administrada IV foi observada no fígado, pulmões e rins, mas em níveis muito mais baixos. A maioria da Ag permaneceu presente nas fezes. Uma comparação da administração IV versus administração oral em doses baixas e altas, respectivamente, sugeriria, neste estudo, uma biodisponibilidade oral de Ag, a partir das AgNPs testadas, na faixa de 1-4%.

Em mais um estudo que se refere à via oral, Lee et al. (2013) averiguaram a persistência potencial de Ag em órgãos após um período de 28 dias de exposição oral repetida de ratos Sprague-Dawley a 10 nm e AgNP a 25 nm. Foi investigada uma dose baixa (100 mg / kg) e alta (500 mg / kg). A distribuição de Ag foi determinada diretamente após as administrações orais no vigésimo oitavo dia e após um período de recuperação de 1, 2 e 4 meses. No vigésimo oitavo dia, Ag pôde ser detectada no sangue e todos os órgãos investigados (fígado, rins, baço, testículos e cérebro). No período de recuperação de 1, 2 e 4 meses após as administrações da Ag, a mesma não foi detectada no sangue. Os níveis mais elevados de Ag estavam presentes no baço e nos ovários seguidos pelos rins e fígado. Os níveis mais baixos foram observados no cérebro e testículos. Mais uma vez, no fígado, baço e rins em ratos fêmeas, níveis mais elevados estavam presentes em comparação com ratos machos. No maior número de tecidos, o conteúdo de Ag diminuiu progressivamente com o tempo. No entanto, para o cérebro e os testículos, a depuração do Ag foi menor quando comparada com os outros órgãos. Em todos os órgãos no quarto mês do estudo, a Ag pôde ser detectada, sobretudo nos grupos de doses elevadas. O tamanho das AgNPs não afetou a depuração de tais órgãos. Dosagens bioquímicas do sangue revelaram aumento nas enzimas hepáticas indicando alguma toxicidade neste órgão. Estes índices de hepatotoxicidade, em sua maioria retornaram ao normal após dois meses de recuperação.

2.2.4 Outras rotas de exposição

Por fim, mas não menos importante, cabe ressaltar a relevância da via subcutânea. Alguns estudos foram apresentados para esta finalidade, tal como Tang et al. (2009) que avaliaram a distribuição em tecido das AgNPs (50-100 nm) e de micropartículas de prata (2-20 µm) após injeção subcutânea (SC) em ratos. O teor de Ag foi determinado pelo método ICP-MS, já citado nesta dissertação. A prata foi demonstrada no sangue, cérebro, fígado, baço, pulmões e rins até 24 semanas após a injeção SC. A translocação foi maior para AgNPs em comparação com as micropartículas de prata; 0,15% versus 0,02%, respectivamente, da dose injetada. A maior distribuição foi identificada no fígado seguido pelos rins, baço e cérebro / pulmões. A relativa presença elevada de Ag nas fezes em comparação com a urina indicou mais excreção biliar do que a excreção urinária, como anteriormente observado. Não foram observados níveis significativos de Ag no coração, útero, ovários, glândula adrenal e fêmur. O microscópio eletrônico de transmissão (MET) identificou partículas no lúmen dos vasos sanguíneos e em vários tecidos (rim, fígado, baço, cérebro, pulmão) sugerindo difusão de AgNPs. Contudo, além das partículas, a presença da própria Ag não foi mais identificada (ou seja, por espectroscopia de raios-X dispersiva de energia {EDX}) nas estruturas observadas. A presença dessas estruturas nos neurônios, igualmente, justifica pesquisas adicionais nesta área.

Ante a aplicação como agente antimicrobiano em curativos para feridas, a possibilidade de penetração na pele da prata durante o uso destes curativos também foi investigada. Alguns destes curativos contendo íons de prata foram avaliados indicando alguma absorção através das feridas e outros, com alta concentração desta nanopartícula, identificaram sua presença no sangue e urina, sugerindo disponibilidade sistêmica e excreção urinária da Ag proveniente do curativo.

Dados experimentais sobre a pele intacta e danificada, *in vitro*, utilizando o método de difusão de Franz³ demonstraram que a absorção de AgNPs era muito baixa, mas detectável (LARESE et al., 2009). Tal experimento foi elaborado com pele humana de espessura total obtida como resíduo cirúrgico usando o método AAS eletrotérmico para caracterização da Ag. As nanopartículas de prata foram observadas por MET no estrato córneo da pele.

2.2.5 Deduções sobre toxicocinética

³Método *in vitro* mais utilizado para determinação da absorção percutânea.

Diante desta premissa, em síntese, podemos concluir que a biodisponibilidade da prata após a administração oral de AgNPs em ratos foi demonstrada e calculada na faixa de 1-4% da dose oral. Além disso, após inalação, a captação de prata foi demonstrada pela presença da prata no pulmão e também em vários tecidos. Todavia, após a inalação, dependendo da dimensão das partículas, a absorção via trato gastrointestinal também não pode ser excluída. A captação da prata através de curativos para tratamento de ferida na pele queimada resulta em níveis séricos significativos, enquanto a absorção sobre a pele intacta não pôde ser mensurada.

Similarmente ficou constatado que os principais órgãos-alvo para a distribuição de AgNPs após a disponibilidade sistêmica são baço, fígado e rins, enquanto que há menor distribuição para outros órgãos. Para mais, os níveis elevados de prata foram notados nos testículos. No entanto, ainda que com níveis baixos, a distribuição de Ag foi demonstrada na maioria dos principais órgãos, incluindo o cérebro. Para a distribuição da prata ao cérebro, não está explícito se a mesma está presente no tecido cerebral ou circunscrita ao endotélio do cérebro. Dados recentes indicam que alguma persistência de Ag pode ocorrer no cérebro e nos testículos, ainda que seu significado para a toxicidade não seja conhecido. Como descrito, há algumas evidências de que a Ag iônica pode formar partículas de Ag na nanoescala *in vivo*. As tão citadas diferenças de gênero (fêmeas com níveis de Ag maiores) foram observadas em vários documentos, como pudemos constatar, que investigaram diferentes rotas de administração, ou seja, inalação e administração oral. Em consequência da presença de Ag nas fezes após as administrações IV e SC, existem indícios de excreção biliar de Ag proveniente da AgNP administrada (EUROPEAN COMMISSION, 2014).

Por fim, tais publicações inferem aos métodos de ICP-MS ou AAS para detecção de Ag, usados na maioria dos estudos, a fragilidade dos estudos de toxicocinética. Isto posto, não se pode depreender que a AgNP é distribuída aos órgãos através destes métodos.

Em seu perspicaz editorial denominado “*The era of nanotechnology and omics sciences*”, Li, Wen (2015), nos outorga uma profunda reflexão sobre tão palpitante tema. Em sua publicação a autora chancela a afirmação de que com o progresso da ciência biomédica e da bioengenharia, entramos agora na era das ciências "nano" e "ômica". Em cooperação com as ciências de superfície, química orgânica, biologia molecular e engenharia biomédica / química, milhares de tipos de nanopartículas foram projetados para fornecer vários medicamentos anticancerígenos e antimicrobianos. Alguns exemplos dessas nanopartículas incluem as poliméricas, micelas, nanopartículas de ouro e pontos quânticos. Esse autor afirma, de modo controverso, que tais nanopartículas, a seu favor, solucionaram o problema da resistência a múltiplos medicamentos; e possuem maior especificidade, potência e menor toxicidade celular do

que o método tradicional. Nesse ínterim, nano-chips e nano-dispositivos surgiram com seu caráter único de entrega de drogas, transfecção de genes e interrogação de células vivas através da fabricação de um ambiente extracelular projetado. A ciência "ômica" emergiu do rápido crescimento da tecnologia genômica e expandiu-se para quatro áreas gerais: genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica. Cada paciente, individualmente, é digitalizado em uma espécie de grande "planilha de dados" e esta informação biomédica pode ser especificada para cada célula ou órgão. Além do tratamento básico do câncer, como a ressecção tumoral, radioterapia e quimioterapia, novas e avançadas tecnologias moleculares foram amplamente aplicadas para seu diagnóstico e tratamento. Um modelo é a identificação e validação de biomarcadores tumorais. Estes são a assinatura de doenças cancerígenas, contendo informações cruciais para o diagnóstico personalizado de câncer, tratamento ou prevenção. Oncologistas atuam durante décadas para identificar biomarcadores que nos norteiam à iniciação ou progressão tumoral. Muitos inibidores bem estudados, tais como inibidores de tirosina quinase, linfoma anaplásico quinase e receptor de fator de crescimento epidérmico são amplamente utilizados para inibir o desenvolvimento do câncer. Estudos de genômica, portanto, ampliam a limitação da descoberta de biomarcadores e validação clínica. A sequenciação da próxima geração está entre as tecnologias mais avançadas desenvolvidas durante a última década e foi adequadamente adotada ao sequenciamento de bactérias, vírus, parasitas, leveduras e células humanas e provou ser rápida, de baixo custo e altamente precisa, diz o editorial. Após o sequenciamento inicial do genoma inteiro, análises mais específicas, tais como sequenciamento direcionado, funcional ou paralelo e sequenciamento de RNA foram desenvolvidos para detectar mutações genéticas exatas e além do mais identificar biomarcadores específicos em cada paciente com câncer. Através de diversos métodos, poder-se-á, não só quantificar o nível de expressão da proteína em diferentes estágios e detectar a modificação pós-translacional⁴, mas também identificar o mecanismo de *feedback* nos caminhos regulatórios. Essas técnicas avançadas, combinadas com bioinformática, cinética, ciência dos materiais e bioquímica tradicional, são usadas globalmente para superar múltiplas doenças médicas e seus obstáculos.

Sob esta ótica, Xia et al. (2010), em seu estudo, preconiza um índice de adsorção⁵ de superfície biológica para caracterizar e identificar interações moleculares entre grupos de na-

⁴ Modificação que a proteína sofre após a tradução, etapa da síntese proteica em que o tRNA se associa ao mRNA, aglomerando-se vários aminoácidos, formando-se então a cadeia polipéptica. Tais modificações podem ocorrer nos três tipos principais de RNA - tRNA, rRNA e mRNA - para gerar a forma funcional do RNA.

⁵ Processo pelo qual átomos, moléculas ou íons são retidos na superfície de sólidos através de interações de natureza química ou física.

nanopartículas, quantificando a adsorção competitiva de um conjunto de sondas de moléculas pequenas nas nanopartículas. Os coeficientes de adsorção dos compostos da sonda foram medidos e utilizados para criar um conjunto de nanodescriptores que representam as contribuições e as forças relativas de cada interação molecular. O método previu com sucesso a adsorção de várias pequenas moléculas em nanotubos de carbono, e estes nanodescriptores também foram medidos para outros doze nanomateriais, incluindo a prata. Os nanodescriptores de índice de adsorção de superfície biológica podem ser utilizados para desenvolver modelos de avaliação farmacocinética e de segurança para nanomateriais. Este estudo é corroborado em outro artigo do mesmo autor (XIA et al., 2011), onde afirma, de forma oportuna que as complexas interações e mudanças dinâmicas de nanomateriais de engenharia em sistemas biológicos têm dificultado o rápido desenvolvimento da bionanociência, e, conseqüentemente os estudos de cinética e toxicocinética (nota da aluna). As nanopartículas coloidais são suspensões metaestáveis que estão sujeitas a agregação devido ao envelhecimento ou mudanças nas condições do meio, como pH e força iônica. A agregação de nanomateriais de engenharia nos diversos meios é uma das questões mais problemáticas em estudos biológicos de nanomateriais, o que reduz qualquer significado de uma caracterização cuidadosa antes de doses *in vitro* ou *in vivo*, conclui o texto.

Em vista deste preâmbulo, e de todas as publicações anteriormente citadas, que fazem referência à toxicocinética, essas interações complicadas e mudanças dinâmicas dos nanomateriais tornam extremamente difícil a caracterização significativa das propriedades das superfícies de nanopartículas em sistemas biológicos, evidenciando que ainda estamos “engatinhando” quando se trata de nanoescala, uma vez que o domínio ainda recai sob a escala *bulk* (massivo).

2.2.6 Etapas do ciclo de vida da nanop prata

2.2.6.1. Síntese e caracterização

De acordo com Quang Huy Tran et al. (2013), atualmente, muitos métodos foram relatados para a síntese de AgNP usando rotas químicas, físicas, fotoquímicas e biológicas. Cada método possui vantagens e desvantagens com problemas comuns, como custos, escalabilidade, tamanhos de partículas e distribuição de tamanho. Entre os métodos existentes, os métodos químicos foram utilizados principalmente para a produção de AgNP. Os métodos químicos fornecem uma maneira fácil de sintetizar AgNP em solução.

Em Soares (2014), o autor alega que a nanotecnologia e a química de síntese moderna têm sido utilizadas para desenvolver métodos com o objetivo de melhorar o desempenho das NPs. O desafio para os investigadores é desenvolver um processo de síntese de NP em que se obtenha um melhor controle sobre tamanho, distribuição, morfologia, pureza, quantidade e qualidade das NPs, utilizando processos econômicos e não prejudiciais ao meio ambiente. Dentro deste contexto, a redução química é, repetidamente, descrita como o método mais frequentemente utilizado para a síntese de AgNP. Esta se resume a um processo de redução que se divide em dois passos, permitindo um melhor controle do tamanho das NPs. Nesta técnica, um agente redutor forte é utilizado para produzir partículas pequenas de prata, as quais são ampliadas num segundo passo por redução com um agente redutor mais fraco. São utilizados como redutores o hidreto de boro, o citrato e o ácido ascórbico. A síntese de NP por métodos de redução química é realizada na presença de agentes estabilizadores, tais como o dodecil sulfato de sódio (SDS), a polivinilpirrolidona (PVP) e o citrato trisódico, a fim de evitar a aglomeração da solução coloidal de AgNP, que pode resultar na alteração das suas propriedades iniciais.

Ainda que as NPs possuam excelentes propriedades físicas e químicas, não possuem propriedades de superfície adequadas para certas aplicações. Para evitar a agregação e a aglomeração destas NPs, são utilizados agentes estabilizadores, dos quais se destacam compostos com grupos tiol, conjuntos de polímeros ou estruturas dendríticas e o encapsulamento em microemulsões. Estes agentes estabilizadores não só protegem as NPs da precipitação, mas também desempenham um papel crítico no tamanho, distribuição, morfologia e biocompatibilidade das mesmas. A PVP é considerada uma excelente estabilizadora polimérica para as AgNPs. No caso de partículas com diâmetros inferiores a 50 nm, o azoto (N) em PVP coordena as ligações com a prata de forma a criar uma camada de proteção. Outros polímeros foram investigados como moléculas estabilizadoras de AgNPs que incluem poliacrilatos, polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico, poliacrilonitrilo, poliacrilamida, carbono em espuma, albumina sérica bovina (BSA) e sulfonato de sódio-2-mercaptoetano (MES). Os revestimentos biológicos também constituem uma opção e podem incluir anticorpos, biopolímeros, tais como o colágeno, ou monocamadas de pequenas moléculas. As biomoléculas promovem a biocompatibilidade das AgNPs, facilitando a sua utilização como biossensores, em imagiologia e tratamentos de hipertermia (SOARES, 2014). Grande variedade de moléculas orgânicas de diferentes composições, tamanho e complexidade estão disponíveis na natureza e proporcionam a estrutura e funcionalização para os vários processos biológicos.

A caracterização destas NPs é importante para se compreender e controlar não só o processo de síntese como suas aplicações. As comparações entre os estudos e as generalizações que permitem o uso posterior de dados são difíceis de efetivar se as AgNPs não estiverem devidamente caracterizadas. Num primeiro passo para caracterização é necessário determinar se as AgNPs foram realmente sintetizadas. A análise do tamanho, forma e quantidade também é importante. Para a determinação destes parâmetros utilizam-se variadas técnicas, incluindo a microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varrimento e microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia de absorção e dispersão dinâmica de luz (DLS). A morfologia e o tamanho das partículas também podem ser determinados por MET, microscopia eletrônica de varredura e AFM. A técnica de DLS é mais utilizada para a determinação da distribuição das NPs. A MET proporciona o acesso não só ao tamanho e morfologia das NPs, mas também ao seu estado de agregação, constituindo por isso, segundo a autora, uma técnica muito utilizada na caracterização de NPs. Contudo, para uma melhor caracterização, deverá ser utilizada juntamente com outras técnicas, pois o processamento da amostra exigido para MET pode alterar as propriedades de superfície das NPs. Outra técnica descrita pela autora é a espectroscopia de UV-Vis, amplamente utilizada para a caracterização de AgNPs, pois, para além de dar informação acerca do tamanho médio das NPs e da dispersão, é um método de baixo custo e de fácil manuseio (SOARES, 2014).

A estabilidade é outro fator importante na caracterização das AgNPs. O chamado potencial zeta (medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que, sabidamente, afetam a estabilidade) é utilizado para caracterizar a propriedade de carga da superfície das NPs, que reflete o potencial elétrico das partículas e é afetado pela composição da superfície das mesmas, a presença ou ausência de compostos adsorvidos e a composição da solução de dispersão, principalmente a força iônica e o pH. Nanopartículas com um potencial zeta acima de (+/-) 30 mV demonstraram ser estáveis, pois, a carga da superfície impede a sua agregação (SOARES, 2014).

2.2.6.2. Aplicabilidade: O quanto sabemos?

Em seu texto de revisão, Winjhoven et al. (2009), reconhece que a nanotecnologia está se expandindo rapidamente e é usada em várias áreas, como cuidados de saúde, produtos de consumo, tais como cosméticos, vestuário, alimentação, meio ambiente, saúde e agricultura, entre outros. Em vista disso, portanto, não é surpresa que muitos produtos que possuem nanopartículas já estejam disponíveis também para consumidores. O uso da prata remete a

tempos muito antigos para fabricação de joias, utensílios, moeda monetária, liga dentária, fotografia, explosivos, etc. (CHEN and SCHLUESENER, 2008). A história nos conta que civilizações antigas estavam cientes das propriedades bactericidas da prata, diz o autor Winjhoven et al. (2009). A prata metálica foi usada para próteses cirúrgicas e talas, fungicidas e cunhagem. Compostos de prata solúveis tais como sais de prata, foram utilizados no tratamento de doenças mentais, epilepsia, dependência de nicotina, gastroenterite e doenças infecciosas, incluindo sífilis e gonorreia. Até a introdução dos antibióticos, a mesma vinha sendo utilizada por sua atividade antisséptica, especificamente no manejo de feridas abertas e queimaduras, em geral para este fim, usada em combinação com sulfadiazina. Devido às suas propriedades antimicrobianas, a prata também foi incorporada em filtros para purificar água potável e água limpa de piscina (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR] 1990*, citada na publicação da Organização Mundial da Saúde [OMS] 2002). Para gerar a AgNP, a prata metálica foi transformada em partículas ultrafinas por vários métodos, incluindo descarga de faísca, redução eletroquímica, irradiação de solução e síntese crioquímica (CHEN and SCHLUESENER, 2008). As partículas de nanop prata são, na sua maioria, menores do que 100 nm e consistem em cerca de 20 a 15.000 átomos de prata (OBERDÖRSTER et al. 2005a, b; WARHEIT et al., 2007, apud CHEN and SCHLUESENER, 2008). Nanopartículas, incluindo a nanop prata, podem ter formas diversas, como esferas, hastes ou cubos. Outrossim, as nanoestruturas podem ser produzidas como tubos, fios, multifacetados ou filmes. Na nanoescala, as partículas de prata expressam desvio de propriedades físico-químicas (como divisão dependente do pH para partículas sólidas e partículas dissolvidas) e atividades biológicas em comparação com o metal comum. Isso se deve à maior área superficial por massa, permitindo que uma maior quantidade de átomos interaja com seu entorno. Devido às propriedades da prata na nanoescala, ela é hoje usada em um número crescente de produtos médicos e de consumo. Além disso, a atividade antimicrobiana notadamente forte é a razão principal para o desenvolvimento cada vez maior de produtos de nanop prata. Ainda em seu relato, Winjhoven et al. (2009), asseguram que, dos mais de 800 produtos de consumo que contêm nanomateriais, cerca de 30% afirmam conter AgNP. Exemplos são materiais de embalagem de alimentos e suplementos alimentares, têxteis resistentes a odor, eletroeletrônicos e eletrodomésticos, cosméticos e dispositivos médicos, desinfetantes de água e pulverizadores de ambientes (Quadro 4). Algumas das aplicações da AgNP redundaram na preocupação dos governos e debates entre o público. Uma experiência interessante relatada neste texto, refere-se a um estudo (BENN et al. 2008), que revela que a prata pode facilmente vazar de águas residuais durante a lavagem, rompendo bactérias úteis utilizadas em instalações de tratamento destas águas e amea-

çando organismos aquáticos em lagos e córregos. Benn e seus colegas detectaram, inclusive, que algumas marcas de meias perdem quase 100% do teor da prata em cerca de quatro lavagens. A nanop prata também é utilizada em máquinas de lavar roupa por causa de sua atividade antimicrobiana (VIGNESHWARAN et al., 2007, apud CHEN and SCHLUESENER, 2008). A despeito deste fato, na Suécia, várias agências, incluindo a Agência Sueca de Proteção Ambiental, protestaram contra esta aplicação porque as águas residuais podem estar contaminadas com AgNP. Recentemente, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) decidiu regular esta forma específica de nanotecnologia. Os dispositivos geradores de íons de prata, como máquinas de lavar roupa e outros, com o objetivo declarado de matar bactérias, não serão mais um dispositivo de lavagem simples, mas serão considerados pesticidas. Cabe ressaltar aqui que, este comunicado não é uma ação para regular a Nanotecnologia, mas sim o efeito bactericida da nanop prata, muito mais que o tamanho, que motivou esta decisão. Em razão dos potenciais efeitos ao ecossistema aquático, novos e onerosos métodos de purificação precisarão ser desenvolvidos para eliminar tal substância, o que, certamente, aumentará os custos governamentais. Outra área diretamente atingida por esta propriedade antibacteriana é a agricultura, pois pode afetar bactérias benéficas ao solo.

Em sua cuidadosa publicação, Soares (2014), ratifica que as AgNPs, devido às suas propriedades específicas, têm inúmeras aplicações, sendo as mais populares, notadamente, as antimicrobianas e, sob esta ótica, realiza uma didática itemização de suas funcionalidades, devidamente citadas a seguir.

Quadro 4: Exemplos de aplicação de prata e nanop prata

Cuidados de saúde	Curativos para feridas, tecidos, antissépticos, mobiliário e camas hospitalares.
Produtos de consumo doméstico	Condicionadores de tecido, mamadeiras, recipientes de armazenamento de alimentos e tigelas de salada, tábuas de cozinha, aspiradores, cortinas descartáveis e persianas, louças, produtos de higiene pessoal - produtos de banheiro, móveis (cadeiras), utensílios de cozinha e acessórios de banho, máquinas de lavar louça, geladeiras e máquinas de lavar roupa, alavancas de tanques de sanitários, rolhas de pia, assentos de sanitários, travesseiros e colchões, recipientes de ar-

	<p>mazenamento de alimentos, outros recipientes, bandejas de gelo e outros utensílios plásticos de cozinha, escovas de cabelo e outras, alisadores de cabelo, pentes, rolos, toucas de banho.</p> <p>Pasta de dentes, desodorantes, cosméticos, escova de dentes, lenços de papel, depiladores, máquinas de barbear elétricas.</p> <p>Xampus para animais de estimação, alimentadores e águas, cestos de lixo, abrigos e roupas de cama para animais de estimação, papel, canetas e lápis, controle remoto, corrimões, teclados de computador, secadores de mão, comunicadores de voz sem fio, tapetes de yoga, revestimentos para uso em computadores portáteis, calculadoras, protetores de lençóis, crachás e suportes, suportes de bilheteria, produtos de armazenamento de mídia, filmes de laminação, capas de relatórios e pastas de projetos, porta retratos, agendas, acessórios de escritório, filmes de transparência, refrigeradores dobráveis.</p>
Vestuário e tecidos	Roupas de bebê, lingerie, meias, calçados, tecidos diversos e vinil, toalhas de banho, colchas, sacos de dormir, roupa de cama, travesseiros, protetores de colchão e toalhas.
Alimentação	Embalagens, produção de aves domésticas.
Construção	Revestimento em pó (puxadores de portas), tintas de parede, ar condicionado, piso de resina epóxi, revestimento de parede de PVC, pavimentos antimicrobianos, sistemas de teto em suspensão metálicos, persianas e sistemas de sombreamento, sistemas de prateleiras, laminados de madeira decorativos, acessórios de fiação elétrica, painéis nobres (alternativa para revestimentos padrão), superfícies laminadas higiênicas, papel de parede, bordas e murais, tapeçarias e carpete, vedações (porta para coolers e freezers, tampas de

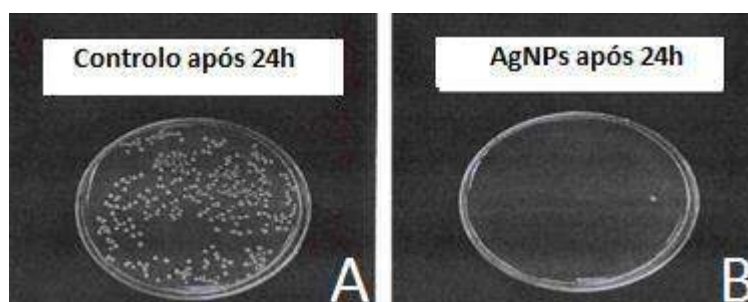
	tanques, misturadores e amassadoras de pão), portas hospitalares, telas vibratórias / peneiras vibratórias na indústria farmacêutica.
Desinfetantes	Desinfetantes agrícolas, desinfetantes industriais, desinfetantes para aquicultura, desinfetantes para piscinas.

Fonte: European Commission (2014) - Opinion on nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance.

2.2.6.3. AgNPs como antibacterianos, antifúngicos e antivirais

Surpreendentemente o espectro antibacteriano das AgNPs é mais amplo do que o dos antibióticos comuns. Como tal, as AgNPs representam uma nova geração de antimicrobianos, capazes de destruir bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Fig.4).

Figura 4: Controle (A) e efeito antibacteriano (B) (*E. coli*) das AgNPs ao fim de 24h.



Fonte: Soares (2014).

As AgNPs também inibem a formação de biofilmes nas superfícies revestidas com as mesmas e têm reduzida propensão para induzir resistência microbiana. Assim sendo, têm sido aplicadas numa vasta gama de produtos antimicrobianos para prevenção de infeções, como curativos para queimaduras e feridas traumáticas, revestimento de cateteres, trabalhos odontológicos (amálgamas e cimentos para restauração, anticáries, tratamento de canal, etc.), prótese, dispositivos médicos e outros.

O mecanismo de ação da atividade antimicrobiana das AgNPs ainda não está bem definido, mas é amplamente reconhecido que possa ser mediado pela oxidação parcial das AgNPs e liberação de íons de prata (Ag^+). Por sua vez, os Ag^+ podem interagir com o peptidoglicano da parede celular e membrana plasmática, causando lise celular; com o DNA bacteri-

ano (citoplasmático), impedindo a replicação do DNA; e com proteínas bacterianas, interrompendo a síntese proteica. As AgNPs também podem danificar as bactérias diretamente por penetração na parede celular e membrana celular.

Em seu recente estudo, Tran et al. (2013), comungam da opinião de Soares (2014), quando afirmam que as AgNPs foram identificadas como um biocida eficaz contra bactérias de amplo espectro, incluindo Gram-negativas e Gram-positivas, das quais existem muitas cepas altamente patogênicas. Neste estudo também foi relatado que a atividade antibacteriana de AgNPs contra bactérias Gram-negativas foi dividida em três etapas: (i) nanopartículas principalmente na faixa de 1-10 nm anexadas à superfície da membrana celular que pioram drasticamente suas funções, tais como permeabilidade e respiração; (ii) são capazes de penetrar nas bactérias e causar outros danos, possivelmente interagindo com compostos que contêm enxofre e fósforo, como o DNA; (iii) nanopartículas liberam íons de prata, que terão uma contribuição adicional para o efeito bactericida destas nanopartículas. Há também estudos que revelaram que a *E. coli* é inibida em baixa concentração de AgNP (3,3 nm) e dez vezes menos do que a concentração inibitória mínima em *S. aureus* (33 nm).

Recentemente, o crescente número de bactérias resistentes aos medicamentos tornou-se um grande desafio que põe em perigo a saúde humana. As AgNPs também foram demonstradas como um biocida eficaz contra essas cepas resistentes a determinados fármacos. Naturalmente que, com excelentes propriedades antibacterianas observadas, as AgNPs foram sugeridas como biocidas efetivos de amplo espectro contra uma variedade de medicamentos resistentes a drogas e bactérias e um candidato potencial para uso em produtos farmacêuticos e médicos, a fim de prevenir a transmissão de agentes patogênicos resistentes a tais fármacos em diferentes segmentos clínicos. Motivo de preocupação? Decerto mais estudos serão cruciais.

Tanto quanto atividades antibacterianas, as AgNPs também apresentam considerável atividade antifúngica contra gêneros como *Aspergillus*, *Candida* e *Fusarium*. Além disso, elas são eficazes contra as leveduras isoladas de mastites bovinas e também contra vários fungos fitopatogênicos. Os resultados de um recente estudo reportado em Soares (2014) sugerem que a atividade antifúngica das AgNPs passa pela alteração da estrutura da membrana celular do fungo e conseqüente inibição do processo de gemulação⁶ normal.

Estudos confirmam que estas resistentes nanopartículas também se têm mostrado ativas contra vários tipos de vírus, incluindo o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

⁶ Mic. Processo de reprodução das leveduras, no qual uma pequena célula brota de outra, para posteriormente separar-se, dando origem a uma nova levedura; brotamento.

(HIV-1), vírus H1N1 Influenza A, vírus da hepatite B (HBV) e vírus Herpes simplex (HSV). Uma vez que as AgNPs podem investir contra uma vasta gama de alvos no vírus, existe uma menor possibilidade de desenvolver resistência, em comparação com antivirais convencionais. Para além da interação direta com as glicoproteínas da superfície viral, as NPs metálicas podem ter acesso ao interior da célula e exercer a sua atividade antiviral através de interações com o genoma viral [DNA ou ácido ribonucleico (RNA)]. Além disso, o compartimento intracelular de uma célula infectada com um vírus está superlotado de fatores celulares que são necessários para permitir a replicação viral e a produção adequada de viriões da progenia⁷. A interação de NPs metálicas com estes fatores, que são a chave para uma replicação viral eficiente, pode também representar um novo mecanismo de ação.

2.2.6.4. AgNPs como anti-inflamatórios

Seguindo o pensamento de Soares (2014), a cicatrização ocorre após uma sequência de eventos, incluindo a coagulação, inflamação, proliferação e remodelação da matriz e do tecido e a resposta inflamatória durante este processo induz a produção de mediadores que promovem o processo de cura. Embora as citocinas sejam fundamentais na iniciação, manutenção e regulação da resposta pós-lesão, tais moléculas têm sido implicadas na cura deficiente de feridas, formação de cicatriz anormal e resposta inflamatória descontrolada. Em sua pesquisa bibliográfica, o texto sugere que a inflamação pode ser prejudicial para o processo de cicatrização e confirma que as AgNPs podem modular a expressão das citocinas de uma forma dependente da dose, diminuindo assim a inflamação e também a cicatriz. A atividade anti-inflamatória de um creme tópico com AgNP também foi avaliada num modelo murino de dermatite de contato alérgica. Os investigadores verificaram que o creme com AgNP era o responsável pela redução visível do eritema, de uma forma dependente da concentração, quando comparado à esteroides e imunossupressores. Também foi verificada a inibição da expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e de IL-12 e a indução da apoptose⁸ em células envolvidas no processo inflamatório. A referência afirma ainda que considerados em conjunto, estes resultados sugerem que as AgNPs podem estar envolvidas na alteração ou supressão de eventos inflamatórios nas fases iniciais de cicatrização de feridas, bem como a utilização de AgNPs podem ser clinicamente aplicáveis a outras doenças, como infeções por *Chlamydia trachomatis*. Os autores verificaram a regulação de vários mediadores inflamató-

⁷ Virions são veículos para transmissão do genoma viral para próxima célula hospedeira ou organismo.

⁸ Morte celular não seguida de autólise, também conhecida como “morte celular programada”.

rios e sugerem que o efeito anti-inflamatório das AgNPs não é generalizado, mas altamente seletivo, dependendo assim do tipo de patógeno ou das células expostas. No entanto, observou-se, como confirmado a seguir, que AgNPs causam dano mitocondrial, resultando em indução de apoptose e morte de macrófagos. Um estudo relatado por Soares (2014) demonstrou que AgNPs de 20 nm aumentaram o tamanho de neutrófilos humanos recentemente isolados e rapidamente interagiram com a membrana celular e, em seguida penetraram no interior das células, induzindo apoptose celular e inibindo a síntese de novo de proteínas somente quando presentes como grandes agregados (> 500 nm).

2.2.6.5. AgNPs como antitumorais

Tristemente, como é sabido, o câncer é uma das doenças do século XXI, e constitui um desafio terapêutico para os investigadores e médicos. Nos referidos artigos pesquisados, há menção dos fatores chave para o crescimento e disseminação das células tumorais em que a angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos e capilares a partir de pré-existentes. Os vasos sanguíneos fornecem oxigênio e outros nutrientes para as células tumorais, permitindo-lhes crescer, migrar e metastatizar para diferentes órgãos. A angiogênese tumoral é predominantemente provocada por mitógenos específicos endoteliais, tais como o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e fator β de transformação do crescimento (TGF- β). Incontáveis moléculas anti-angiogênicas são detectadas em diferentes fases de ensaios clínicos, muitas delas foram aprovadas como terapêuticas para o câncer. Infelizmente, alguns destes agentes demonstraram sinais de toxicidade. Isto posto, pesquisas focadas no uso anti-angiogênico das AgNPs revelaram que poderiam atuar como moléculas anti-angiogênicas potentes. As AgNPs foram capazes de bloquear completamente a permeabilidade de células endoteliais da retina de suíno induzida por VEGF e IL-1 β e em outro estudo foi demonstrado, *in vivo*, em camundongos, que as AgNPs podem inibir a proliferação celular, a migração e a formação de novos microvasos, induzidos pelo VEGF (SOARES, 2014).

2.2.6.6. AgNPs como regeneradoras

No âmbito da medicina regenerativa, notadamente na reparação de pele e do tecido ósseo utilizando nanomateriais, foram realizadas pesquisas intensivas para tentar acelerar a cicatrização de feridas e a recuperação da função mecânica. Em 1998 foram introduzidos no

mercado curativos com AgNP. Segundo Tran et al. (2013), estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que os mesmos melhoram a cicatrização de feridas, devido à sua potente atividade antimicrobiana e anti-inflamatória já descrita. Sua eficácia foi comprovada em cicatrização em modelo suíno de feridas contaminadas e em úlceras crônicas e ratifica seu uso como facilitadores da fase precoce da cicatrização de feridas. Estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram que as AgNPs podem promover a proliferação de queratinócitos no processo de reepitelização e também conduzem a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos para a diminuição da ferida. Foi também observado que a função mecânica da pele tratada com AgNP tinha melhores propriedades elásticas, deposição e alinhamento das fibras de colágeno, com uma estreita semelhança com a pele normal. Com base nestes resultados, este estudo concluiu que as AgNPs eram predominantemente responsáveis pela regulação e deposição de colágeno e sua utilização pode trazer imensa contribuição no processo de cicatrização de feridas.

2.2.6.7. AgNPs como catalisadores

A catálise é definida como uma área chave no desenvolvimento de produtos químicos e a utilização de NPs como potenciais catalisadores tem atraído imensa atenção nos últimos anos, pois estes catalisadores podem ser seletivos, eficientes e recicláveis, preenchendo os requisitos de uma catálise “verde”. Por esse motivo, o desenvolvimento de novos métodos de síntese de NPs e a sua aplicação catalítica em novas reações é uma tela em branco na área da pesquisa. Estudos recentes demonstram que um campo inexplorado para os catalisadores de prata pode ser a remoção de poluentes em águas residuais ou no ar. Sendo a redução do *p*-nitrofenol a *p*-aminofenol importante neste campo, pois a presença de compostos fenólicos em águas residuais pode ser preocupante devido à sua toxicidade. Já o *p*-aminofenol é um importante intermediário na síntese de medicamentos e tem outras aplicações como revelador de fotografias, inibição da corrosão de pinturas, aditivo em combustíveis e na síntese de corantes.

Em vista do exposto e a despeito do rápido crescimento de produtos com materiais nanoparticulados, em especial a nanop prata, em função de sua generalizada aplicabilidade, cabe citar o trabalho de Tran et al. (2013), que evidencia a preocupação da comunidade científica com tal material e mostra uma tendência de aumento de publicações nesta área. A título de ilustração, durante os 10 anos de 2001 a 2011, o número de artigos publicados cresceu cerca de 93%, no que concerne as AgNPs (SOARES, 2014).

2.2.7 Uso diverso

Na internet, os dispositivos médicos reivindicados para conter a nanop prata podem ser encontrados. No entanto, nenhum trabalho científico sobre esse tipo de aplicação foi encontrado na literatura.

A desinfecção de salas, equipamentos médicos e ambulâncias por aerossolização de peróxido de hidrogênio (5%) com íon-prata (névoa seca) foi desenvolvida usando a experiência adquirida com a descontaminação do antraz com uma atividade satisfatória (ANDERSEN et al., 2006; SHAPEY et al. 2008 apud *European Commission*, 2014). Todavia, até agora a nanop prata não foi utilizada para esta aplicação e a segurança deste tipo de desinfecção para os usuários está atualmente em revisão.

2.3 EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL

O documento sobre a prata, publicado pela *European Commission* (2014) afirma que existem vários limites e diretrizes de exposição ocupacional para a prata, mas os valores de cada um dependem da forma da prata, bem como da agência individual que faz tais recomendações. Por exemplo, a Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais (ACGIH) estabeleceu valores limiar (TLV) separados para prata metálica ($0,1 \text{ mg/m}^3$) e compostos solúveis de prata ($0,01 \text{ mg/m}^3$). Por outro lado, o limite de exposição permitido (PEL) recomendado pela Administração de Segurança e Saúde do Trabalho (OSHA) e pela Administração de Segurança e Saúde de Minas (MSHA) e o limite de exposição recomendado pelo Instituto Nacional de Segurança e Saúde do Trabalho (NIOSH) é de $0,01 \text{ mg/m}^3$ para todas as formas de prata.

Com o uso da nanop prata em um número crescente de aplicações, novas ou adicionais a exposição ocupacional deve ser esperada e receada. Em princípio, isso inclui a exposição à prata com e sem nanoescala, usada e gerada durante a produção, respectivamente, exposições à nanoforma durante a embalagem, mistura e carregamento do material durante a fabricação de artigos tratados, bem como a sua manipulação e embalagem. A aplicação, por exemplo, por pulverização ou roll-on de produtos que contenham AgNPs (por exemplo, pinturas) e tarefas secundárias, incluindo a limpeza etc., fornece outra fonte de exposição, assim como manipulação de materiais tratados, por exemplo, corte e costura de têxteis tratados com nanop prata. Finalmente, exposições indiretas podem ocorrer em consumidores expostos de superfícies

tratadas e determinados artigos. Conseqüentemente, as exposições dérmicas e por inalação são esperadas para trabalhadores por uma grande variedade de caminhos.

Diversos estudos relataram resultados de monitoramento do ar em local de trabalho em instalações de produção de nanoprata. Esses resultados são difíceis de interpretar, especialmente porque as medidas foram limitadas ao tamanho e número de partículas, mas não incluíram a determinação do teor/concentração de prata. No entanto, os dados foram interpretados para indicar um potencial de separação da AgNP a partir do microcomposto (documento de decisão AGE-20 da US EPA de 2005).

Outro dado relevante reportado na publicação da *European Commission* (2014) versa que os níveis e as distribuições de tamanho de partícula de poeiras produzidas em laboratórios dentários foram medidos após o corte, moagem e polimento de ligas contendo prata, materiais a base de gesso, porcelana e dentadura, por meio de microscopia elétrica e eletrônica, bem como técnicas de contagem por Coulters. As medidas revelaram uma alta proporção de poeira respirável (partículas menores que 5 micrômetros) associadas a essas operações. Há que se observar que a informação publicada sobre a exposição ocupacional à prata em Odontologia é confundida pela exposição concomitante ao mercúrio "como na amálgama de prata". Nenhuma informação recente sobre a exposição à prata sozinha pode ser identificada.

Em face do exposto, pode-se concluir que, a exposição a qualquer substância, incluindo NMs, depende da quantidade presente em um produto e da possibilidade de liberação ou vazamento do produto. Para estimar os níveis de exposição, é necessária informação sobre as concentrações de AgNP no produto, o tamanho e a forma em que está presente (agregados, aglomerados) e a probabilidade de liberação de (nano) Ag + do produto. A disponibilidade desses dados é limitada neste momento, pois níveis relatados de prata liberada de produtos de consumo contendo prata em diferentes estudos são inconsistentes, o que é provavelmente devido a diferenças na metodologia utilizada. As medições de NMs em produtos de consumo são, portanto, prementemente necessárias.

Portanto, a US- EPA sugere que, para avaliar a exposição humana as AgNPs, uma simples categorização da possível exposição a tais produtos pode ser útil. A categorização inclui: espera-se causar exposição, pode causar exposição e exposição não esperada também ao consumidor. O tipo de produto (spray, líquido, sólido) em grande parte determina a probabilidade de exposição. No entanto, os níveis reportados de prata liberados a partir de produtos de consumo contendo prata em diferentes estudos são inconsistentes, provavelmente devido a diferenças na metodologia utilizada, como anteriormente mencionado. A exposição ocupacional a partículas de prata e nanoprata - principalmente através de material no ar – ainda não foi

estudada em detalhes. Uma descrição mais detalhada da exposição ocupacional é imperiosa para realizar uma avaliação de potenciais riscos.

2.3.1 Toxicidade das AgNPs: íons, nanopartículas ou ambos?

A nanotecnologia, como é notório, vem crescendo rapidamente com a utilização em uma ampla gama de produtos comerciais em todo o mundo. No entanto, ainda existe uma falta de informação, segundo Quang Huy Tran et al. (2013), sobre o aumento da exposição humana, animal e ecológica aos NMs, incluindo AgNPs e os riscos potenciais relacionados à sua toxicidade a curto e longo prazo. A produção de NPs em grande escala e a eliminação inadequada de resíduos pode levar à sua acumulação na natureza e, conseqüentemente elevar a exposição humana. Para aumentar a complexidade deste problema, a maioria dos nanomateriais metálicos parecem não ser biodegradáveis e podem permanecer na natureza e nos tecidos durante anos. Diante desta premissa, este segmento, é dedicado a uma rápida revisão dos possíveis riscos de AgNPs para células de humanos e mamíferos, *in vitro* e *in vivo*.

Para compreender a toxicidade de diferentes NPs *in vitro*, Braydich-stolle et al. (2005) avaliaram a adequação de uma linha de células estaminais espermatogonais de ratos para avaliar a toxicidade da prata (Ag-15 nm), molibdênio (MoO₃-30 nm) e NP de alumínio (Al-30 nm) na linha germinal masculina. Resultados mostraram uma toxicidade dependente da concentração para todos os tipos de NPs testados. As AgNPs, por sua vez, foram as mais tóxicas (5-10 µg ml⁻¹) e reduziram a função mitocondrial drasticamente, além de aumentar a vazão da membrana. Esta linha celular foi sugerida como um valioso modelo para investigar a citotoxicidade de NP na linha germinativa *in vitro*. Tais estudos, como afirma Soares (2014), em sua dissertação de Mestrado, podem ser usados para estabelecer relações de concentração/efeito e os limiares específicos para cada tipo de célula. Estes ensaios são adequados para o rastreio toxicológico de um número cada vez maior de novos nanomateriais reforçando a necessidade de testes *in vivo*.

Diante do exposto, ainda de acordo com Soares (2014), podemos ratificar que, os estudos *in vitro* representam assim, a iniciativa inicial para a compreensão de como o organismo vai reagir a um novo agente. Em comparação com estudos em animais, os estudos *in vitro* são menos eticamente ambíguos, mais fáceis de controlar e reproduzir e menos dispendiosos. No caso de citotoxicidade, é importante reconhecer que, além da concentração do agente potencialmente tóxico a ser testado, as células em cultura são sensíveis a alterações no seu meio ambiente, tais como as flutuações de temperatura, pH e concentrações de nutrientes. Consequen-

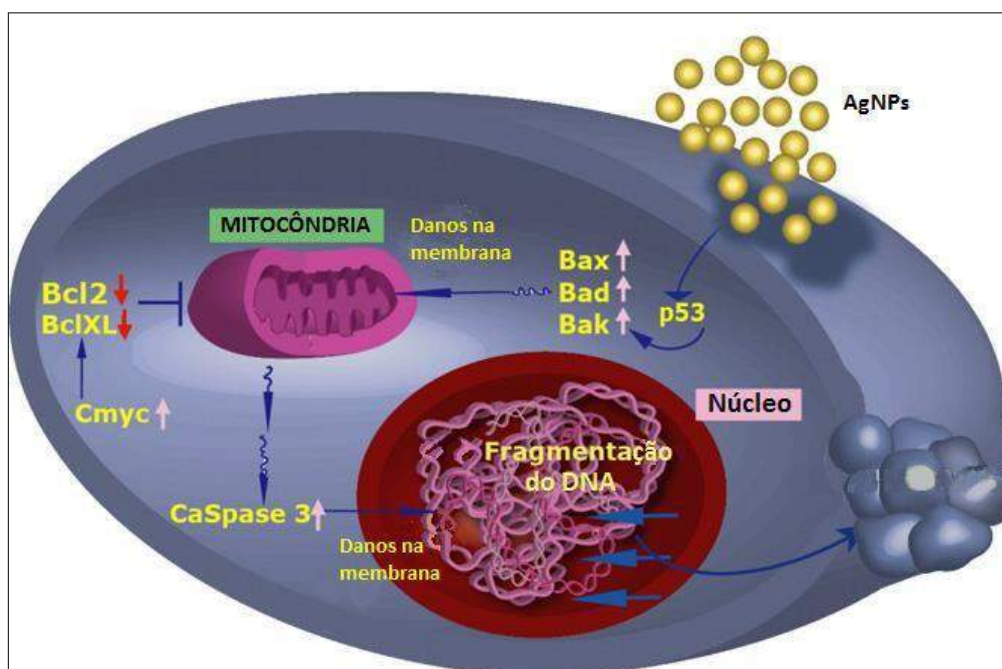
temente, o controle das condições experimentais é primordial para assegurar que a morte celular medida corresponde à toxicidade das NPs adicionadas e não a condições de cultura instáveis. Ademais, é importante que a escolha do ensaio de citotoxicidade seja apropriada, bem como a realização de testes múltiplos deverá ser vantajosa para garantir desfechos válidos.

Em vários estudos pesquisados (SOARES, 2014), observa-se que o dano celular mais aludido se refere à produção de espécies oxigênio reativas (ROS) e conseqüentemente, estresse oxidativo. As doenças cardiovasculares, a carcinogênese e o envelhecimento são exemplos emblemáticos de conseqüências que decorrem deste estresse oxidativo.

Outra questão relevante, descrita na maioria dos estudos, é a afirmação de que a genotoxicidade constitui outro mecanismo importante para a toxicidade induzida por AgNP. A integridade do DNA genômico está constantemente sob ameaça, mesmo em células saudáveis. Em geral, as alterações nocivas do material genético (genotoxicidade) incluem aberrações cromossômicas e mutações pontuais que envolvem uma mudança numa única base. Os danos ao DNA ativam uma rede de sinalização complexa que funciona para ativar controladores do ciclo celular e mediar a reparação do DNA. Em conseqüência, as células retomam a progressão do ciclo celular, posto que o dano é reparado.

Como se fora numa cascata de efeitos, a desestabilização da integridade mitocondrial por agentes genotóxicos, bem como citotóxicos levam à ativação de caspases que conduzem à apoptose. Está retratado na literatura que as AgNPs induzem toxicidade via ativação da cascata que resulta na já conhecida apoptose. Esta última é legitimada como um modo distinto de morte celular programada que envolve a eliminação geneticamente determinada de células. Durante o processo de morte celular programada, ocorre a ativação de proteínas proteolíticas como as caspases, que, como resultado induzem a apoptose. Uma representação esquemática, descrita em Soares (2014), do circuito apoptótico envolvido na morte das células tratadas com AgNP é demonstrada na Fig. 5.

Figura 5: Representação esquemática da indução da apoptose provocada pelas AgNPs.



Fonte: Soares, T. (2014)

As AgNPs, à custa de sua ligação à membrana celular, provocam danos na integridade da membrana e ativam a proteína p53. No que lhe concerne, a p53 ativa mediadores pró-apoptóticos como bax, bad e bak. Estas proteínas são conhecidas por causar danos na membrana mitocondrial libertando citocromo c, que numa reação em cascata, ativa a caspase-3. Por fim, a caspase-3 cliva a membrana nuclear para induzir a fragmentação de DNA. Além disto, há evidências de provocarem morte por necrose celular (SOARES, 2014).

Isto posto, nos conciliamos a Tran et al. (2013), quando diz em seu texto que, a questão mais importante aqui é o impacto real das AgNPs na saúde humana e nos animais. Entretanto, ainda que reforçemos que os estudos *in vitro* com AgNPs são essenciais para a avaliação dos efeitos toxicológicos e para o rastreio dos seus potenciais de toxicidade a longo prazo, cabe ressaltar, como cita Soares (2014), que os ensaios *in vitro* não possuem a complexidade do sistema *vivo*, as interações biológicas com as proteínas, a resposta imunológica e barreiras fisiológicas, o que pode levar a falsas interpretações sobre a toxicidade das AgNPs.

Via de regra, os estudos toxicológicos com as AgNPs têm como foco a avaliação de sua distribuição nos tecidos, após injeção intravenosa, exposição pulmonar, dérmica ou do trato gastrointestinal. Estes estudos fornecem informação útil sobre os potenciais órgãos alvo da toxicidade das NPs, entretanto, há ainda algumas questões sem resposta. As alterações nas propriedades físico-químicas das AgNPs em fluidos biológicos, tais como o tamanho, a aglo-

meração, ou formação de agregados e carga de superfície têm de ser necessariamente verificados para determinar a sua toxicidade e compreender seu mecanismo. Os fatores fisiológicos que afetam a absorção, distribuição e excreção de NPs inorgânicas que dependem das vias de exposição, juntamente com o seu mecanismo de absorção e alvos biológicos, também devem ser considerados para uma melhor compreensão do seu potencial de toxicidade.

No corpo humano há essencialmente três vias de exposição à AgNPs: a pele, os pulmões e o trato digestivo. O trato genital feminino também pode constituir uma via de entrada, uma vez que as AgNPs são incorporadas em produtos de higiene femininos, no caso específico de consumidores. Desta forma, as AgNPs podem entrar e penetrar nesses órgãos, de modo que essa penetração depende do tamanho, forma e das características de superfície das NPs, bem como do órgão (apresentam histologias diferentes), idade e de outros agentes.

Após tal exposição, as nanopartículas de prata são capacitadas a atravessar a circulação sistêmica e assim, se distribuírem pelo organismo, tal como demonstrado no Quadro 5. O tamanho das partículas e a via de exposição afetam sua distribuição pelos tecidos. A eliminação de partículas ocorre essencialmente pelas fezes e urina.

Quadro 5: Distribuição nos tecidos das AgNPs segundo as várias vias de exposição.

Via de exposição	Tamanho das AgNPs (nm)	Distribuição nos tecidos por ordem decrescente de quantidade		Conclusões
Oral	60	Estômago Fígado Rins Pulmões Testículos Cérebro Sangue		A absorção das AgNPs após administração oral foi demonstrada e a toxicidade no fígado foi sugerida.
Inalação	18-19	Pulmões Fígado Baço Cérebro		Translocação dependente da dose. Inflamação alveolar.
Inalação	4-10	Pulmões Fígado Rins Coração Cérebro		Translocação dependente do tempo e do tamanho. As NPs foram rapidamente eliminadas dos pulmões.
Injeção intravenosa	12-20	Baço Fígado Pulmões Rins		Toxicidade dependente do tempo e da concentração.
Injeção intravenosa	20-100	20 nm: Fígado Rins Baço	> 20 nm: Rins Baço Pulmões	Translocação dependente do tamanho.
Dérmica	Acticoat 15	Plasma		Concentração no sangue de $56,8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Eliminação passados 6 meses
Dérmica	Acticoat 15	Fígado (hepatotoxicidade e argíria)		Hepatotoxicidade e argíria que desapareceram passados 7 meses

Fonte: Soares (2014).

A via dérmica é crucial para avaliação das consequências de uma exposição, pois um grande número de produtos que contém AgNPs são aplicados diretamente sobre a pele. Diante disso, a preocupação recai sobre a pele lesada, pois as nanopartículas de prata aqui têm comportamento biológico distinto da pele íntegra.

De acordo com Soares (2014), o estudo da ingestão oral de suspensões de AgNPs é também relevante, visto que foi legitimada como uma alternativa terapêutica para o tratamento de doenças como artrite e cancro. Contudo, há relatos de uma série de efeitos prejudiciais, associados à ingestão destas suspensões, incluindo úlceras intestinais, argíria e danos hepáti-

cos. Segundo o texto, outra questão relacionada à absorção oral, pode ser a bioacumulação, já que em dois estudos foram encontrados relatos da presença e permanência de AgNP no cérebro e nos testículos.

O incremento da produção e utilização de AgNP faculta a exposição humana, notadamente por inalação. Consequentemente, é imperativo entender a toxicidade destas NPs após exposição pulmonar. Contudo, há relatos de que esta interpelação ainda não foi muito bem explorada, estando o epicentro das pesquisas voltado para a avaliação da disponibilidade sistêmica de partículas, após exposição pulmonar.

Em estudos de exposição por inalação verificou-se toxicidade no fígado, bem como nos pulmões, além da acumulação de AgNPs em órgãos como o cérebro e, consequentemente, bulbo olfativo, seguramente por via inalatória, ainda sem implicações definidas.

Cabe ressaltar ainda a importância da avaliação da distribuição das AgNPs nos tecidos após administração intravenosa, no sentido de se entender quais os órgãos alvo envolvidos em maior risco de toxicidade, já que após esta exposição, as AgNPs podem translocar por via sistêmica e serem distribuídas pelo organismo.

A luz de todo o conhecimento produzido a respeito da exposição, o documento da *European Commission* ilustra com pertinência as categorias e subcategorias de potencial exposição em várias aplicações (Quadro 6).

Quadro 6: Classificação da potencial exposição humana a nanop prata

Categoria	Subcategoria	Rotas de Exposição	Exposição Potencial *
Alimentos e bebidas	Limpeza	Inalação/Dérmica	Alta
	Utensílios para cozinha/revestimento	Dérmica	Baixa
	Armazenamento	Dérmica	Baixa
	Suplementos	Oral	Alta
Cuidados pessoais e cosméticos	Cuidados com a pele	Dérmica	Alta
	Higiene Oral	Oral	Alta
	Limpeza	Dérmica	Alta
	Cuidados com o cabelo	Dérmica	Baixa?
	Cuidados do bebê	Dérmica	Alta?
	Curativo de feridas	Dérmica	Alta
	Produtos de balcão	Dérmica?	Alta?
Têxtil e sapatos	Roupas	Dérmica	?
	Outros têxteis	Dérmica	?

	Brinquedos	Dérmica/Oral	?
Eletrônicos	Cuidados pessoais	Dérmica	Baixa
	Eletrodomésticos	Dérmica	Baixa
	<i>Hardware</i>	Dérmica	Baixa
	Dispositivos móveis	Dérmica	Baixa
Produtos domésticos / Melhorias para casa	Limpeza	Inalação/Dérmica	Alta
	Revestimento	Dérmica	Alta??
	Mobiliário	Dérmica	Baixa
	Mobiliário/Revestimento	Dérmica	Baixa
Filtração, purificação, neutralização, sanitização	Filtração	Inalação	?
	Limpeza	Inalação/Dérmica	Alta

* "Alto" indica uma alta probabilidade de exposição, ou uma possibilidade de alta exposição, ou ambos.

"Baixo" indica uma baixa probabilidade de exposição, ou uma possibilidade de baixa exposição, ou ambos.

"?" Indica que não há informações suficientes disponíveis.

Fonte: European Commission (2014) - Opinion on nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance.

Entretanto, diante do exposto, ainda permanece a questão sobre o verdadeiro fomentador desta toxicidade: nanopartículas de prata, íons ou ambos? Em sua publicação, Beer et al. (2012), afirmam que os íons de prata são conhecidos por serem tóxicos para muitas espécies, incluindo seres humanos. Em muitos estudos, o nitrato de prata (AgNO_3) tem sido usado para comparar a toxicidade de íons de prata e AgNP. No entanto, a quantidade analisada destes íons nas suspensões de AgNPs só são relatados em alguns estudos, enquanto que a maioria não abordou a contribuição dos mesmos para a toxicidade das suspensões de AgNPs. Em seu estudo o autor declara que em suas suspensões de AgNPs a partir do pó desta nanopartícula, comercialmente disponível, detectou-se entre 39% e 71% de fração de íons de prata. A alta concentração de íons de prata parece em parte se dever ao protocolo de preparação, onde, através da centrifugação e filtração, os maiores agregados de AgNPs são removidos enquanto nanoparticulados e seus agregados abaixo de 450 nm de diâmetro, bem como os íons de prata permanecem em suspensão. Isso, naturalmente, leva a um aumento proporcional de íons de prata em comparação com o restante das AgNPs na suspensão. Diante disso, parece que, em concentrações baixas de íons metálicos, a absorção de NPs leva a uma toxicidade adicional, enquanto que em concentrações mais altas de íons metálicos a presença de NPs não adiciona toxicidade mensurável adicional, pelo menos nos ensaios utilizados por este autor.

Por fim, o estudo conclui que os íons de prata livres nas preparações de AgNPs desempenham um papel considerável na toxicidade das suspensões destas nanopartículas. Embora a contribuição destes íons para a toxicidade medida das suspensões de AgNPs seja um determinante importante, um efeito combinado de ambos aparece em concentrações mais baixas de íons de prata. Estes dados indicam que a quantidade destes íons nas preparações de AgNPs deve ser medida rotineiramente e relatada no estudo toxicológico, em virtude da sua importância.

No texto de Buerki-Thurnherr et al. (2012), os autores chamam a atenção, em seu preâmbulo, da importância da placenta enquanto barreira biológica, mas, entretanto, questionam sua integridade: “por muitos anos, a placenta tem sido percebida como uma impenetrável barreira para qualquer agente farmacológico ou tóxico entre a mãe e o feto, uma porta perfeitamente segura, fechada a todos os visitantes desconhecidos. Mas não estariam todas as portas prontas para serem abertas em algum momento ou outro?” De fato, desde que foram descobertos defeitos congênitos induzidos pela talidomida nos anos 60, muitos estudos adicionais têm indicado que a placenta pode ser permeável a muitas substâncias químicas e poluentes ambientais do que o previsto anteriormente. Por exemplo, quanto à exposição ao álcool, tabaco, metilmercúrio, chumbo ou policlorobifenóis (PCB) foi demonstrado poderem causar efeitos deletérios funcionais, cognitivos ou reprodutivos para o feto. Não obstante, a barreira placentária é indispensável na medida em que medeia a troca de nutrientes e resíduos metabólicos, realiza funções metabólicas vitais e secreta hormônios que mantêm a gestação. Mas, nestes tempos há um novo visitante batendo à porta da placenta. Com o crescente uso da nanotecnologia, a placenta é susceptível de entrar em contato com novas NPs, acidentalmente ou intencionalmente, através da exposição a estes materiais. Ele aponta: “devemos nos preocupar com o novo convidado, considerando que a placenta já está lidando regularmente com uma grande quantidade de toxinas exógenas, partículas e produtos químicos?”. Embora estas novas características possam conduzir ao desenvolvimento de numerosas aplicações promissoras em muitos campos da tecnologia e medicina, elas poderão ter efeitos imprevistos e/ou desconhecidos, como já relatado. Finalizando, neste artigo o autor sumariza diversas publicações que avaliaram a transferência de NP pela placenta em animais e humanos e seus principais efeitos.

Seguindo esta diretriz e salientando a relevância do estudo de barreiras biológicas que chancele e fundamente a passagem dos NMs por via transplacentária, Pietroiusti et al. (2013), discutem as evidências disponíveis, com base em estudos *in vivo* para interações de NPs comercialmente relevantes com barreiras internas críticas. As barreiras internas em foco nesta revisão são a barreira hemato-encefálica, protegendo o cérebro, a barreira testicular,

protegendo a linha germinal masculina e a placenta, protegendo o feto em desenvolvimento. A via de exposição (pulmonar, gastrointestinal, intravenosa, intraperitoneal ou dérmica) e, portanto, o portal de entrada de NPs no corpo, é de importância crítica. Diferentes propriedades físico-químicas, não apenas tamanho, podem determinar a capacidade das NPs para quebrar barreiras biológicas. A situação é ainda agravada pela formação da chamada “corona” de biomoléculas nas superfícies das NPs, cuja composição pode variar dependendo da via de exposição e da translocação das mesmas de um compartimento biológico para outro. A relevância da interação das NPs com barreiras biológicas internas para seu impacto nos órgãos protegidos por essas barreiras também é discutida. A escolha evolutiva de uma dupla proteção destes órgãos e sistemas é clara: o cérebro é o centro de coordenação das atividades fisiológicas do organismo, e a integridade dos testículos e do embrião é crucial para a reprodução da espécie. Não importa o quão bem protegido, nenhum castelo ou fortaleza é inexpugnável, e isso se torna verdadeiro também para órgãos protegidos por barreiras internas. De fato, estas barreiras podem ser danificadas ou destruídas em alguns casos, mas com maior frequência podem ser contornadas. As NPs, menores que 100 nm, as tornam semelhantes a moléculas fisiológicas, podendo permitir-lhes os mesmos mecanismos de entrada através de barreiras internas. Nesta base, uma extensa investigação sobre a possível utilização de NPs adequadamente projetadas para o diagnóstico e tratamento de doenças nos órgãos protegidos pelas barreiras internas tem sido desenvolvida nos últimos anos. Em contrapartida, as mesmas características peculiares das NPs, produzidas para fins industriais e/ou comerciais (NPs engenheiradas - NPEs), demonstram crescente preocupação sobre seu possível acesso, não intencional, a estes órgãos altamente protegidos, uma vez que entram em contato com trabalhadores ou consumidores. O foco desta pertinente revisão são as evidências atuais da habilidade destas NPEs atravessarem estas barreiras internas e/ou causarem efeitos toxicológicos. Nesta análise, os autores se referem a estudos disponíveis *in vivo*. O texto, notavelmente, percorre a fisiopatologia das barreiras supracitadas, a correlação entre elas, explanando as reais possibilidades de translocação através de possíveis rotas, doses efetivas, e seus decorrentes danos. Notadamente, no que diz respeito à placenta, os autores abordam algumas pesquisas realizadas com determinados tipos de NPs. Entre suas conclusões, atestam que, para ter acesso ao cérebro, órgão reprodutivo masculino e feto, respectivamente, as NPs devem e podem permear barreiras anatômicas primárias, como o epitélio pulmonar, bem como barreiras internas, incluindo a barreira hematoencefálica, a testicular e a placentária. Em resumo, entre outros desfechos, os dados sugerem que danos substanciais aos órgãos protegidos por barreiras internas podem surgir indiretamente, mesmo na ausência desta travessia. Esta possibilidade deve ser aborda-

da, segundo os autores, utilizando modelos *in vitro* e *ex vivo*. Basear-se na equação nenhuma travessia = nenhum dano pode suscitar a falsa conclusão que algumas NPs são seguras quando, de fato, são perigosas. De peculiar magnitude, estudos recentes revelaram que estes materiais podem causar danos ao DNA de células cultivadas além de uma barreira, sem, entretanto, atravessar esta barreira. Tais danos indiretos foram observados através de barreiras de trofoblasto⁹ *in vitro* e em estudos utilizando explantes¹⁰ *ex vivo* de placenta humana, concretizando o princípio da toxicidade indireta. Não obstante as ressalvas do uso de modelos *in vitro* / *ex vivo*, depreendem os autores, que estes resultados justificam consideração.

Em publicação nacional, Delgado (2013), nos chama a atenção para esta preocupação. Ele cita que, apesar do número crescente de produtos da nanotecnologia chegando ao mercado, a avaliação dos riscos das NPs para saúde está na sua infância. Os efeitos nocivos das NPs sobre o desenvolvimento pré-natal têm sido ainda menos investigados. Neste artigo o autor sumariza a literatura sobre os efeitos das NPs sobre o desenvolvimento e os exemplifica, de acordo com os NMs avaliados e as espécies estudadas. As pesquisas são em geral muito recentes e, ainda limitadas, e incluem experimentos *ex vivo* empregando invertebrados (ouriços do mar, ostras e caramujos de água doce) e vertebrados não mamíferos (peixes e sapos), ensaios *in vitro* (células tronco embrionárias de camundongos) e *in vivo* em roedores. Aqui também são comentadas as diferenças de estrutura e função entre a placenta de roedores e a placenta humana no período inicial da gravidez e a possível relevância delas para a transferência transplacentária de NPs. Muito pouco tem sido publicado a respeito dos efeitos das NPs na placenta e sobre a passagem destas da mãe para o embrião e feto humanos. Nesta revisão bibliográfica, o foco dos autores foi principalmente a avaliação dos riscos potenciais ao desenvolvimento apresentados por NPs, o que constitui o primeiro passo da avaliação de risco (identificação de riscos) à luz da toxicologia reprodutiva.

Sob esta ótica, Wick et al. (2010), relatam que, ao longo de sua história, os seres humanos sempre foram expostos a partículas finas e ultrafinas. Desde a Revolução Industrial, fontes, doses e tipos de NPs mudaram dramaticamente. Na última década, o rápido desenvolvimento do campo da Nanotecnologia levou a um aumento de NPEs com novas propriedades físicas e químicas. Independentemente de esta exposição ser ou não intencional, é necessária uma avaliação cuidadosa dos possíveis efeitos adversos. Um grande número de projetos foi

⁹ Camada celular mesodérmica extraembrionária que está ligada à mucosa uterina, e através da qual o embrião recebe a nutrição da mãe.

¹⁰ Fragmento de tecido ou de órgão retirado de um organismo para ser cultivado ou desenvolvido em meio artificial.

realizado para avaliar as consequências da exposição à NP manufaturada ou derivada da combustão na saúde humana. Nos últimos anos tem havido uma crescente preocupação sobre a possível influência na saúde da exposição a poluentes do ar durante a gravidez, portanto, uma inquietação implícita sobre o risco potencial de exposição do útero a NPs. Nesta pesquisa foram utilizadas técnicas de perfusão em placentas saudáveis de gestações não complicadas, quer após parto vaginal ou cesáreo, sendo empregadas esferas de poliestireno fluorescentes completamente caracterizadas, de tamanho variável (50-500 nm) como partículas modelo e aplicadas ao sistema de perfusão. Foi demonstrado neste estudo que partículas de poliestireno fluorescente com diâmetro até 240 nm foram absorvidas pela placenta e capazes de atravessá-la, ratificando que a translocação foi observada, sem reduzir a viabilidade da placenta e sem alterações na morfologia do tecido. Isto sugere que a maioria das NPs, incluindo a nanop prata, tem potencial para a transferência transplacentária e enfatiza a necessidade de novos estudos nanotoxicológicos sobre este importante sistema orgânico.

Sob este enfoque, em artigo de crucial relevância para esta pesquisa, Melnik et al. (2012), descrevem que as NPs de prata, amplamente utilizadas na fabricação de vários tipos de produtos de consumo e para aplicações médicas, pertencem a novos tipos de materiais que apresentam riscos potenciais à saúde humana. Os efeitos negativos potenciais da influência destas NPs na reprodução são insuficientemente pesquisados. Em tal estudo, os autores realizaram uma avaliação quantitativa da transferência de NP de prata metálica através da placenta e do leite materno durante uma experiência *in vivo* em ratos. Foram utilizadas NPs de prata de $34,9 \pm 14,8$ nm que foram estabilizadas por polivinilpirrolidona de baixo peso molecular e marcadas com o isótopo radioativo ^{110m}Ag usando irradiação de nêutrons térmicos em um reator nuclear. As preparações de NPs marcadas com ^{110m}Ag foram administradas intragastricamente através de uma agulha de gavagem a grávidas (20º dia de gestação) ou lactantes (14- 16 dias de lactação) a uma dose de 1,69-2,21 mg / kg de peso corporal após conversão em prata. O acúmulo de NPs em fetos de ratos e ratos infantis que consumiam o leite materno de sua mãe foi avaliado usando um espectrômetro de raios gama semiconductor de fundo baixo, 24 e 48 horas após rotulagem, respectivamente. Em todos os casos, foi observada penetração das NPs marcadas com ^{110m}Ag através da placenta e da entrada no leite materno em quantidades que excedem 100-1.000 vezes a sensibilidade do método analítico utilizado. O nível médio de acúmulo de NPs nos fetos foi de 0,085-0,147% da dose administrada, o que era comparável ao acúmulo do marcador no fígado, sangue e grupamento muscular de animais adultos e excedeu a penetração de NPs através da barreira hematoencefálica no cérebro de fêmeas por um fator de 10-100. Em fêmeas em lactação, a acumulação total de NPs marcadas com ^{110m}Ag

no leite excedeu $1,94 \pm 0,29\%$ da dose administrada ao longo de um período de 48h de lactação, e, não menos que 25% desta quantidade foi absorvida pelo trato gastrointestinal de ratos infantis. Desta forma, esta foi a primeira vez que se obteve evidência experimental da transferência de NPs da mãe para a prole através da placenta e do leite materno.

Em Saunders (2009), o autor infere às NPs, relevância quantos aos possíveis benefícios em muitos aspectos de nossas vidas, mas chama atenção para uma ineficiente avaliação toxicológica do seu possível impacto à saúde humana. A Nanotecnologia é uma área em rápida expansão da atividade industrial e NPs estão sendo desenvolvidas para uma ampla gama de propósitos. Com alguns desses produtos já em uso, e muitos mais em breve, é extremamente importante que os riscos potenciais desta nova tecnologia sejam adequadamente avaliados. Ressalta também que, há uma necessidade premente de entender como a NP modificada, ou seja, engenheirada pode interagir com a exposição do corpo humano, enquanto consumidor, no local de trabalho ou no ambiente, sendo fundamental para isso a avaliação das interações das NPs com barreiras biológicas que controlam o acesso a todo o organismo e a órgãos específicos. A placenta, segundo o autor, é uma barreira de particular interesse porque determina a exposição do feto que representa uma subpopulação vulnerável e sensível que necessita de adicional apreciação. Como já mencionado, pouco se sabe atualmente sobre se NPs podem atravessar a barreira placentária ou interferir em sua função, mas modelos de transporte adequados têm sido desenvolvidos e poderão ser utilizados para esclarecer os mecanismos de interação e transporte através da placenta.

Em estudo sueco, produzido por Söderstjerna et al. (2013), o autor reitera que o rápido desenvolvimento das nanotecnologias tem suscitado preocupação quanto as suas aplicações e seus efeitos adversos, notadamente, na saúde humana e ao meio ambiente. Afirma, igualmente, que as NPs podem ser capturadas diretamente por órgãos expostos, mas também serem translocadas a órgãos secundários, tais como o sistema nervoso central (SNC) após administração venosa ou subcutânea ou através do sistema olfativo. O SNC é particularmente vulnerável durante o desenvolvimento fetal e relatórios recentes descrevem a passagem das NPs através da placenta e até mesmo em tecido cerebral usando sistemas experimentais *in vitro* e *in vivo*. Os autores investigaram se NPs de ouro e prata, em tamanhos que variaram entre 20 e 80nm após duas semanas de exposição, tiveram efeito sobre o precursor neural embrionário humano (HNPC). Eles demonstraram que NPs de prata de ambos os tamanhos causaram um aumento significativo no número de proliferação e apoptose nos HNPCs. Em contraste, apenas a dose mais elevada de NPs de ouro de 20nm afetou significativamente a proliferação, enquanto que nenhum efeito foi observado na morte celular apoptótica. Resumida-

mente, portanto, os dados demonstram que as NPs de ouro e prata interferem com o perfil de crescimento de HNPCs, indicando a necessidade de estudos mais detalhados sobre os efeitos adversos das NPs sobre o SNC em desenvolvimento.

2.4 EFEITOS ADVERSOS À PROLE DA EXPOSIÇÃO MATERNA A NANOMATERIAIS

Podemos, diante do exposto, perceber a similitude dos artigos, singularmente em estudos mais recentes, a luz de novas ocorrências sobre o tema.

Em recente estudo, publicado nos anais do *XIV International Congress of Toxicology*, Cassee (2016), relembra a importância da poluição atmosférica diante deste contexto. O autor aborda a definição e descrição de partículas transportadas pelo ar como parte da poluição atmosférica, bem como define as engenheiradas, as exposições potenciais a seres humanos através do ambiente e as ocupacionais e dados de estudos de biodistribuição que justificam a avaliação de respostas adversas em embriões e fetos. Cabe ressaltar que a exposição por inalação pode resultar em estresse oxidativo materno pulmonar (e sistêmico) e inflamação. A inflamação tem sido mencionada como o maior inimigo da gravidez. Os efeitos dependem muito de quando a exposição ocorre durante o desenvolvimento. Segundo o autor, para alguns NMs industriais amplamente utilizados, não é necessário nenhum novo teste de segurança para a nanoforma porque os dados já estão disponíveis para a forma convencional com a mesma composição química. Esta, segundo o autor, pode não ser uma situação desejável, porque as propriedades físico-químicas dos NMs são conhecidas por afetar o resultado de muitos estudos de biodistribuição cinética e toxicidade. A exposição materna à poluição atmosférica nos seres humanos, principalmente através da inalação, demonstrou induzir um retardo do crescimento intrauterino associado a uma diminuição do peso placentário. A evidência de uma associação entre a exposição do pulmão às NPs, inflamação sistêmica e anormalidades fetais é, contudo, especulativa, pois somente alguns relatórios circunstanciais abordaram este tópico. Um pouco mais de evidência está disponível a partir de estudos de poluição do ar em animais ou como parte de estudos observacionais. Por exemplo, a exposição de ratos à poluição do ar urbano com alto teor de material particulado – *particulate matter* (PM 2,5, 600 µg / m³) antes e durante a gravidez aumentou a citocina da interleucina 4 (IL-4) na parte fetal da placenta, indicando uma reação inflamatória placentária. O maior conjunto de evidências relaciona-se às associações entre a exposição materna a partículas ambientais e os efeitos sobre o peso ao nascer (corrigido para a idade gestacional). Em uma metanálise de estudos em 14 centros, um

aumento de $10 \mu\text{g} / \text{m}^3$ na concentração de PM10 foi associado com uma diminuição de 9 g no peso médio ao nascer e uma “*odds-ratio*” de 1,02 no risco de baixo peso ao nascer.

À semelhança de Cassee (2016), Medeiros e Gouveia (2005) e Junger e Ponce de Leon (2007), em publicação nacional de caráter complementar, avaliaram o efeito da poluição do ar sobre o peso ao nascer de recém-nascidos. Junger pesquisou as gestações a termo e únicas, no Município do Rio de Janeiro no ano de 2002, e Medeiros teve como critérios de inclusão todos os partos de mães residentes no Município de São Paulo, nos anos de 1998 a 2000. Estimaram-se as prevalências de baixo peso ao nascer conforme características do recém-nascido, da mãe e do parto. Apenas os distritos mais centrais de São Paulo foram incluídos, totalizando uma amostra de 311.735 nascimentos. Para avaliação do efeito da poluição do ar foram excluídos os prematuros, gemelares e analisados somente os nascimentos das áreas mais centrais da cidade. Ambos os estudos analisaram os seguintes poluentes: PM10 (material particulado até 10 micra de volume aerodinâmico); SO₂ (dióxido de enxofre); CO (monóxido de carbono); NO₂ (dióxido de nitrogênio) e O₃ (ozônio). Apesar de certas variações metodológicas, os estudos se complementam, porquanto, reafirmam que o baixo peso ao nascer está fortemente relacionado com a mortalidade infantil e é um indicador bastante sensível dos efeitos ambientais e concluem que mecanismos biológicos envolvidos com a poluição atmosférica e o baixo peso ao nascer ainda não estão bem evidenciados. Contudo, pode-se supor que a poluição do ar esteja interferindo nas diferenças anatomopatológicas e morfométricas da placenta, igualmente no infarto placentário e na ocorrência de vilosidade. Tais poluentes podem afetar o transporte de oxigênio e também aumentar a viscosidade sanguínea devido a uma resposta inflamatória. Julga-se que haja um efeito tóxico direto sobre o feto, por meio da diminuição do suprimento fetal de oxigênio, devido à redução da capacidade do transporte de oxigênio ou pela alteração da viscosidade sanguínea.

Os autores reiteram que a realização efetiva de medidas de controle dos poluentes possibilitará o aumento de recém-nascidos saudáveis e afirmam que, com peso favorável e potencial normal de crescimento e desenvolvimento, por conseguinte, essas crianças terão maior sobrevida.

Em análise semelhante, Rich et al. (2015), observaram diferenças no peso de nascimento associadas ao ano 2008, relacionadas à redução da poluição atmosférica para os Jogos Olímpicos de Pequim, China e concluíram que a diminuição a curto prazo da poluição atmosférica, notadamente, no final da gravidez, em mulheres que viviam na região durante os estes jogos, numa cidade normalmente fortemente poluída, foram associados com maior peso ao nascer, mas reforçam a necessidade de maiores estudos para examinar possíveis explicações

mecanicistas e estudar os efeitos destas misturas poluentes (por exemplo, poluição de tráfego, aerossóis orgânicos secundários, etc.).

Portanto, podemos concluir que, a continuidade das investigações a respeito dos efeitos da poluição do ar, assim como os análogos NMs, sobre a saúde do recém-nascido deve ser incentivada, com vistas a minimizar os efeitos deletérios à prole, não apenas o baixo peso ao nascer, como também a insuficiência placentária, a desnutrição intraútero e o consequente sofrimento fetal. Finalizam, em síntese, afirmando que estudos contendo também dados de fontes primárias relacionadas ao recém-nascido devem ser realizados, bem como medidas de exposição mais próximas ao local de residência materna.

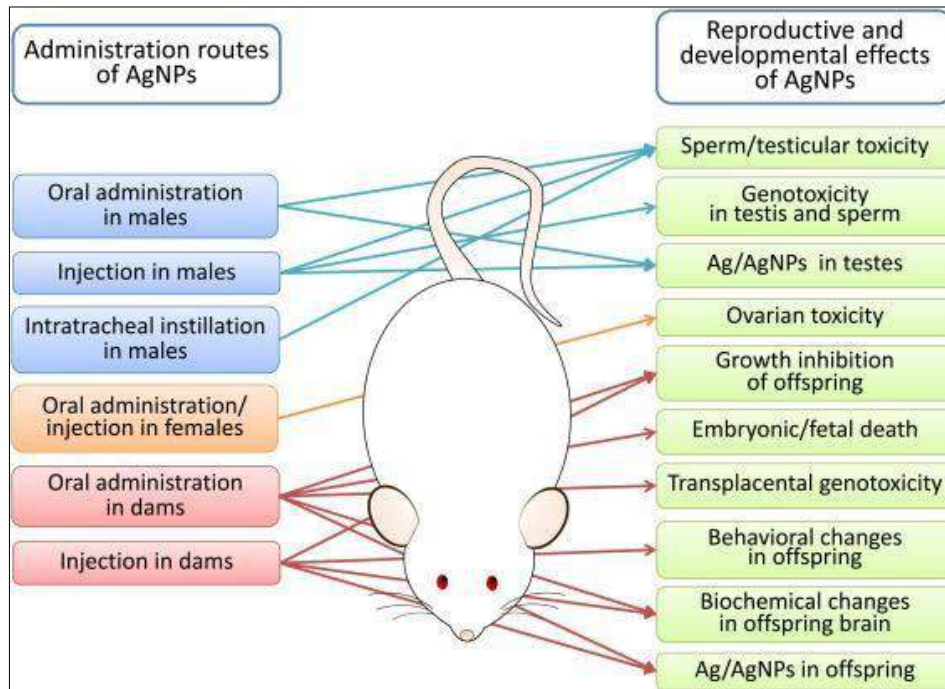
Sob esta perspectiva, Hougaard (2015), já citado neste texto, em seu amplo estudo, analisa e identifica, não só a contaminação transplacentária, bem como os potenciais efeitos adversos em diversos órgãos e sistemas. Sumarizando o estado da arte e promovendo bases para avaliação de risco, sua revisão objetiva esclarecer se a inalação materna de NPs manufaturadas pode constituir um perigo para a gravidez e o desenvolvimento fetal; identificar sistemas de órgãos fetais que possam ser sensíveis à exposição materna por inalação e, por conseguinte, merecer um exame mais aprofundado, baseado em estudos experimentais e, finalmente, esboçar recomendações para futuras estratégias de testes. Sob esta ótica, em seu estudo o autor ratifica a forte evidência de baixo peso ao nascer e redução do perímetro cefálico em recém-nascidos cujas mães foram expostas a material particulado em escala nanométrica. Neste abrangente artigo, cita também riscos intermediários a fortes, de pré-eclâmpsia, com consequente aumento de partos prematuros e também ruptura prematura de membranas. Malformações congênitas também são descritas em decorrência de inalação de material particulado, como as cardiopatias congênitas relacionadas a defeito do septo atrial e coarctação da aorta. O autor, em sua revisão, descreve diversos estudos que relacionam a exposição a diversos tipos de NPs durante a gravidez, a população estudada e sua biodistribuição e toxicidade em tecidos embrionários e extraembrionários.

Em publicação italiana, Campagnolo et al. (2012), do Departamento de Biomedicina e Prevenção de Roma, já se preocupavam com este dilema: “pessoas devem estar expostas a tais materiais num futuro próximo, tanto em ambientes ocupacionais como ambientais”. Isso aumentou a apreensão sobre possíveis implicações para a saúde pública. Em particular, muito recentemente, a comunidade científica centrou-se no que os NMs podem exercer sobre o aparelho reprodutor e sobre o desenvolvimento embrionário. O autor cita que há indicações de que os NMs podem ter efeitos adversos em células da linha germinativa e nos embriões em desenvolvimento. Nesta minirevisão, os autores efetuaram uma análise crítica das publicações

sobre toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento com as NPs mais comumente usadas, como é o caso da prata, com o maior foco em mamíferos. Entre outras questões, os mesmos enfatizam as principais características físico-químicas que podem afetar o comportamento das NPs em sistemas biológicos, isto é, presença de contaminantes e desestabilização das mesmas, tamanho, dosagem, presença de grupos funcionais, influência do solvente, etc. A importância deste campo específico da nanotoxicologia é documentada pelo número rapidamente crescente de publicações registradas nos últimos três anos, o que pode ser uma consequência das preocupações crescentes sobre a possível interferência de NPs na capacidade reprodutiva e o resultado da gravidez, em uma época em que a idade reprodutiva aumentou e a possibilidade de ter filhos parece reduzida.

Em recente e prestimosa pesquisa, Makoto (2017), resume os efeitos significativos relatados na literatura sobre a toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento de nanopartículas de prata em animais de laboratório. As AgNPs mostraram toxicidade testicular / espermática em machos e toxicidade ovariana e embrionária em fêmeas. A injeção materna de AgNPs atrasou o desenvolvimento físico e prejudicou o comportamento cognitivo na prole. A Ag foi acumulada nos testículos após administração de AgNPs. Estas foram identificadas no saco vitelino visceral após administração durante a gestação precoce em ratos. As AgNPs radio-marcadas foram detectadas na placenta, no leite materno e na descendência pré e pós-natal após injeção durante a gestação tardia em ratos (Fig. 6). A prata na forma iônica, e possivelmente também partículas, sugere ser biodisponível. Embora esta revisão forneça informações iniciais sobre a potencial toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento das AgNPs, os dados ainda são muito limitados e o autor também reitera a necessidade de mais estudos utilizando metodologias de ponta e rotas e doses relevantes para exposição humana.

Figura 6: Rotas de administração e possíveis efeitos reprodutivos e de desenvolvimento das AgNPs em estudos com animais relatados na literatura.



Fonte: M. Ema et al. / Reproductive Toxicology, 2017.

2.5 POTENCIAIS EFEITOS TROMBOGÊNICOS

Em artigo recente, Simak e De Paoli (2017), reforçam que o equilíbrio da coagulação sanguínea no organismo é alcançado pela interação das plaquetas sanguíneas (PLTs) com o sistema de coagulação do plasma (SCP) e as células endoteliais vasculares. Em organismos saudáveis, estes sistemas previnem trombose e, inevitavelmente, dano vascular, permitindo que a coagulação sanguínea interrompa o sangramento. A desregulação da hemostasia pode causar patologias trombóticas e / ou hemorrágicas graves. Muitos NMs engenheirados estão sendo investigados para fins biomédicos e são, impreterivelmente, expostos ao sangue. Além disso, NMs podem acessar o sistema vascular após exposição ocupacional, ambiental ou outros tipos de exposição. Assim, é essencial avaliar os efeitos de NMs engenheirados na hemostasia. Em sua revisão, os autores dedicam-se às investigações das interações dos NMs com os componentes sanguíneos envolvidos na coagulação sanguínea: o SCP e as PLTs. Ênfases particulares incluem a fisiopatologia dos efeitos dos NMs no SCP, incluindo o sistema

calicreína-cinina¹¹ e nas PLTs. Métodos para investigar essas interações são descritos sucintamente, e é apresentada uma revisão dos estudos mais importantes sobre as interações de NMs com coagulação plasmática e plaquetas.

A investigação das interações dos NMs com os componentes sanguíneos envolvidos na hemostasia, o SCP e as PLTs é essencial para a avaliação das atividades trombogênicas dos NMs e outros efeitos adversos potenciais na hemocoagulação. Após muitos anos de estudos de hemocompatibilidade dos materiais, os eventos adversos trombóticos continuam a ser um obstáculo substancial no desenvolvimento clínico de novos dispositivos médicos destinados ao uso intravascular ou outro contato com o sangue, como no caso da prata, dizem os autores. O equilíbrio da coagulação sanguínea no organismo é conseguido pela interação das PLTs com o SCP e as células endoteliais vasculares. Sintomas trombóticos e hemorrágicos são causados por uma desregulação no balanço da hemocoagulação. Tal equilíbrio da hemocoagulação é afetado pelos sistemas que produzem respostas inflamatórias. Em consequência, a coagulação do sangue é parte integrante da inflamação e deve ser compreendida neste contexto.

O declínio do equilíbrio da hemocoagulação leva a patologias onde predominam tanto a trombose quanto a hemorragia. É importante notar que em certos tipos de desordens de hemocoagulação, os sintomas trombóticos e hemorrágicos podem ser observados simultaneamente, isto é, os sintomas tromboembólicos podem estar associados a uma falha da hemostasia pós-traumática. Desta forma, a compreensão dos caminhos que se situam abaixo do arranjo do equilíbrio da hemocoagulação é crítica (SIMAK E DE PAOLI, 2017).

Em texto anterior, Laloy et al. (2014), estudaram os impactos das NPs de prata na hemólise, função plaquetária e coagulação e afirmam que as mesmas estão sendo crescentemente utilizadas em aplicações biomédicas devido ao seu grande espectro antimicrobiano, nas mais diversas situações. Não obstante, relatam que os dados em literatura sobre a habilidade das AgNPs em executar sua função desejada, sem, contudo, induzir efeitos indesejáveis nos elementos sanguíneos, ainda são muito limitados e contraditórios. Eles investigaram o impacto das AgNPs sobre a integridade dos eritrócitos, função plaquetária e coagulação sanguínea. Em sua pesquisa, descrevem que a integridade dos eritrócitos foi avaliada por medidas espectrofotométricas de liberação de hemoglobina e adesão e agregação plaquetária foram determinadas pela agregometria de transmissão de luz e microscopia eletrônica de varredura. O teste

¹¹ Sistema de interações metabólicas por meio de produtos originados no néfron distal. Entre estes estão a calicreína, cininas, quininase I, quininase II e encefalinase. Este sistema participa do controle das funções renais, interage com o sistema renina-angiotensina-aldosterona, regulando a pressão arterial, atuando na produção de prostaglandinas, liberação de vasopressinas e equilíbrio hidro-eletrolítico.

calibrado de geração de trombina foi utilizado para estudar a cascata de coagulação. Nesta linha, afirmam que as AgNPs induzem hemólise e também aumentam a adesão plaquetária, sem, entretanto, ter qualquer impacto na agregação plaquetária. Por fim, também tinham potencial procoagulante. Expondo todos estes testes agrupados, a concentração sem efeito observado (*no-observed effect concentration* – NOEC) é de 5 µg / mL.

Em algumas aplicações biomédicas, as AgNPs estão em contato com sangue. Devido ao seu reduzido tamanho e aumento da área superficial, estas também podem penetrar no corpo e translocar para o fluxo sanguíneo sistêmico após inalação, ingestão, contato dérmico ou por administração sistêmica. Estas AgNPs, após inalação, administração oral ou injeção subcutânea em ratos, podem atingir a corrente sanguínea e serem distribuídas a órgãos, incluindo fígado, rim e cérebro. Desta forma, igualmente a Simak e De Paoli (2017), descrevem que informações sobre o potencial impacto de AgNPs na hemólise, atividade plaquetária e coagulação, associada à exposição humana são, via de regra, muito limitadas. Uma hemólise importante (destruição dos glóbulos vermelhos) pode resultar em condições patológicas, tais como anemia, hipertensão pulmonar e insuficiência renal, portanto, os autores afirmam que estes estudos podem ter grande impacto clínico. Além disso, um desequilíbrio homeostático na função plaquetária (hemostasia primária) ou no sistema de coagulação (hemostasia secundária) pode levar a distúrbios tromboticos ou hemorrágicos. A cascata de coagulação plasmática, responsável pela coagulação do sangue, consiste numa série de reações enzimáticas sequenciais realizadas por fatores de coagulação ativados. Pode ser acionada através de duas vias distintas: a mediada por fator tecidual celular (TF) e a via de contato mediada pela superfície (anteriormente conhecidas como vias extrínsecas e intrínsecas, respectivamente). Ambas convergem para uma via comum, resultando na geração de trombina ativada e formação de coágulos de fibrina. A maioria destas reações proteolíticas ocorre na superfície da membrana fosfolipídica aniônica de plaquetas ativadas ou de células endoteliais *in vivo* e requerem cálcio como um cofator. Há sim, portanto, uma possibilidade plausível de que alguns NMs interfiram em algumas dessas reações, como recentemente demonstrado. Os autores atentam que, no presente estudo, ressaltaram os efeitos de AgNPs em três parâmetros sanguíneos: (i) hemólise, (ii) hemostasia primária e (iii) hemostasia secundária.

O mecanismo que explica esta indução de hemólise por AgNPs ainda não foi completamente elucidado. É notório que baixas concentrações de íons de prata levam à morte de glóbulos vermelhos sanguíneos. Em contato com o sangue, a prata metálica ioniza e libera íons na corrente sanguínea, o que pode interagir com proteínas da transmembrana. Contudo a geração de íon de prata não é o único fator de hemólise; outros mecanismos contribuem para a

hemólise induzida pelas NPs, notadamente, deformabilidade, adesividade, vesiculação de membrana, etc.

As NPs de prata apresentam numerosas interações com componentes, tais como glóbulos vermelhos, plaquetas e o sistema de coagulação. Os autores recomendam, para tanto, a realização de testes hematológicos específicos, superando interferências para determinar a hemocompatibilidade das NPs e estimar a NOEC. Utilizando tais testes, as NPs de Ag demonstraram efeitos pro-hemolíticos, procoagulantes e promovem a adesão plaquetária. A NOEC e LOEC (*lowest observed effect concentration* – concentração de menor efeito observado) máximas no sangue foram determinadas a 5 e 50 µg / mL, respectivamente.

Em face deste axioma, como já anteriormente mencionado, Makoto et al. (2017), também salientam a percepção sobre a potencial contaminação do leite materno, no que concerne às AgNPs, reforçando este indício.

Ao examinar casos em que o nível de exposição foi maior do que o esperado realisticamente demonstrou-se que a exposição não afetava a função emocional e cognitiva dos bebês. Além disso, verificou-se que a distribuição de NPs para o leite materno pode variar dependendo das diferenças no tamanho de partícula e materiais.

Uma vez que há pouca informação de segurança sobre NPs durante a lactação, o conhecimento sobre a distribuição das mesmas para o leite materno e sua distribuição aos bebês por esta via, seguramente tornar-se-ão importantes na investigação sobre sua avaliação e seus efeitos na próxima geração (MORISHITA et al., 2016).

Além dessas experiências em animais, é importante coletar informações sobre a exposição materna humana a NPs durante a lactação, como sua forma e abundância.

Em sequência, Morishita et al. (2016), em seu texto informa que estudos recentes de roedores mostraram que as NPs são distribuídas ao leite materno, e são necessárias informações de segurança mais detalhadas sobre o consumo de NPs por parte das mães lactantes. Neste estudo, os autores usaram ratos para investigar a segurança do uso destes materiais durante a lactação. Quando as NPs de prata (AgNPs) e ouro (AuNPs) foram administradas por via intravenosa a camundongos lactantes, foram distribuídas ao leite materno sem produzir danos aparentes à glândula mamária e a quantidade de AgNPs distribuídas no leite materno aumentou com a diminuição do tamanho de partícula. As AgNPs administradas oralmente foram também distribuídas para o leite materno e subsequentemente para os cérebros de filhotes alimentados com leite. As AgNPs de dez nanômetros foram mantidas mais tempo nos cérebros dos filhotes do que nos seus fígados e pulmões. No entanto, não foram observadas alterações comportamentais significativas em descendentes alimentados por lactantes que recebe-

ram estas partículas por via oral. À vista disso, estes dados fornecem informações básicas para avaliar a segurança do uso de NPs durante a lactação. Cabe ressaltar que Melnik et al. (2012), já citado neste projeto, realizaram estudo semelhante.

Os NMs têm propriedades únicas que oferecem muitas novas oportunidades para aplicações na indústria alimentar. Podem ser utilizados como aditivos nutricionais, aromatizantes e corantes, antiaglomerantes ou como ingredientes antibacterianos para embalagens alimentares. No entanto, as mesmas propriedades apresentadas na escala nanométrica que tornam estes materiais atraentes para utilização na indústria alimentar podem também resultar em maior toxicidade para os seres humanos e para o ambiente.

Como será referido futuramente neste texto, sérias preocupações éticas e de justiça social devem ser abordadas na regulação da nanotecnologia. No caso da fórmula infantil, as crianças podem estar em maior risco de sofrer danos à saúde por causa de sua fisiologia mais vulnerável. Os sistemas imune, nervoso central, reprodutivo e digestivo das crianças continuam a desenvolver-se e, em certos estágios iniciais de desenvolvimento, a exposição a tóxicos pode levar a danos irreversíveis que podem aumentar o risco de doença na vida adulta.

Os reguladores europeus promulgaram uma série de políticas de precaução para as nanotecnologias. O Parlamento Europeu tem trabalhado no sentido de uma moratória sobre novos alimentos que contenham NMs. A França, a Bélgica e a Dinamarca implementaram registros obrigatórios para os mesmos, e a União Europeia implementou um regime de rotulagem de nanoalimentos. No Brasil, infelizmente, estamos muito aquém desta discussão, diante de uma legislação laxa e incipiente, que deveria ser amplamente fortalecida e transparente e com tomadas de decisão preventivas, principalmente em se tratando de alimentos consumidos por crianças (ILLUMINATO, 2016).

3 JUSTIFICATIVA

Neste contexto, ainda que citemos os inegáveis benefícios descritos com sua utilização, a dúvida que chama a atenção de pesquisadores é a potencialidade de riscos, pois seus efeitos na vida humana e no ecossistema, de maneira geral, são desconhecidos.

O grande desafio lançado ao lado desta tecnologia então são os seus riscos, e a partir disso devemos questionar a ausência de marcos regulatórios específicos e, também, a necessidade de refletir sobre respostas jurídicas que atendam às necessidades humanas dentro de um quadro de segurança humana e ambiental (ENGELMANN, 2015).

Assim, o mais instigante sobre os estudos das nanotecnologias e meio ambiente é que se desconhecem publicamente os possíveis riscos que elas podem gerar. Outrossim, nada ou pouco existe em termos de regulação jurídica dessa matéria. Não são conhecidas solidamente as propriedades físico-químicas, seu potencial de degradação e de acumulação no meio ambiente, bem como sua toxicidade ambiental, em relação ao trabalhador que tem contato em sua produção, dentre outros (HOHENDORFF et al., 2016). Por estes motivos é que se faz imperiosa a discussão sobre estas tecnologias, a fim de pesquisar modelos regulatórios, resguardando-se o meio ambiente, respeitando também o primordial Princípio da Precaução, que, neste caso específico, dita a observação de normas mínimas de cuidado com a exploração em nanoescala, funcionando, na verdade, não como uma diretriz teórica, mas como um guia de boas práticas.

A preocupação com o desenvolvimento desta nova tecnologia ultrapassa nossas fronteiras. Diante destes questionamentos, urge que se envolvam as mais variadas áreas de conhecimento, conforme citação de Engelmann:

Essa é a zona de discussão que está envolvendo estudiosos das mais variadas áreas de conhecimento. Sobre as descobertas já alcançadas em escala nano, cabe perguntar: qual é o limite dessa pesquisa em frações cada vez menores? Sabe-se, com a mesma precisão, quais as consequências dessa investida nano na natureza? Quando se estuda em escala nano, o que exatamente se tem como objeto? [...]. Essa escala de geração do conhecimento desafia a humanidade, pois é necessário obter dela efeitos práticos que possam alcançar benefícios aos humanos. Além disso, como novas possibilidades de conhecimento, antes de se festejar os avanços, torna-se imperioso analisar, com a maior precisão possível, as

consequências e desdobramentos que serão provocados nos diversos espaços humanos (ENGELMANN et al., 2010).

Posto que ocorre a falta de consenso acerca da própria definição em diversas organizações internacionais - como a *International Organization for Standardization (ISO)*, *European Commission (EC)*, *American Chemistry Council (ACC)*, *German Chemical Industry Association (VCI)*, *Food and Drug Administration (FDA-USA)* – isto representa mais uma comprovação da incerteza, da insegurança e do desconhecimento que perpassam as nanotecnologias, necessitando a prospecção regulatória focada na saúde e segurança do ser humano e meio ambiente (ENGELMANN, 2014).

Diante da complexa diversidade de conceituação, o Brasil adotou o parâmetro de nanotecnologia da ISO TCC 229, observando-se a definição de nanomaterial da ISO/TR 12885-2008, sendo o nanomaterial engenheirado/manufaturado, ou seja, aquele intencionalmente produzido pelo homem, e/ou o que contém nano-objetos (ABDI, 2012).

Verificamos, assim, a produção e utilização, cada vez maior, de produtos com nanotecnologias, o que demanda um aprofundamento na questão da regulação ante a presença do risco. Da mesma forma, observa-se a formulação de estudos que vislumbram orientações para um manejo adequado, bem como a exploração desta tecnologia da maneira mais benéfica possível.

Atualmente, já se pode contar com uma vasta literatura produzida em países como Estados Unidos, Alemanha, China, Japão, etc. e por instituições como *Environmental Protection Agency (EPA)*, *Food and Drug Administration (FDA)*, *National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)*, *Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)*, *International Organization for Standardization (ISO)*, *World Health Organization (WHO)*, que estabeleceu a criação de um Grupo de Desenvolvimento de Diretrizes (*Guideline Development Group - GDG*), do qual esta aluna, honrosamente, faz parte, que reflete a diversidade de nanomateriais manufaturados e processos de fabricação em escala global e as diferenças culturais na segurança no local de trabalho. Este GDG supervisiona elementos importantes no processo de desenvolvimento de diretrizes, tais como elaboração de texto de diretriz, e um Grupo de Revisão Externa que é encarregado de revisão crítica das evidências científicas e do texto das diretrizes. Este documento já está em processo de finalização (WHO, 2016). Estes documentos, entre outros, estão servindo de base para novas pesquisas e para que as indústrias desenvolvam seus projetos, produtos e processos.

A legislação para a nanotecnologia está passando por uma inflexão, na medida em que deixa de ser voluntária para ser mandatória (legalmente obrigatória). Estados Unidos e Comunidade Europeia estão trabalhando juntos na construção de legislações harmonizadas (ABDI, 2010).

No que concerne ao Brasil, ainda estamos “engatinhando” na questão da regulamentação. Há que se repensar e discutir estes propósitos. De acordo com a Academia Brasileira de Ciências, o que se pleiteia é o equilíbrio entre conhecimento e legislação das nanotecnologias. Em publicação recente (junho/2015), cientistas recomendaram, em audiência pública realizada na Câmara dos Deputados neste período, cautela na avaliação de dois projetos de lei, em trâmite desde 2013, que criam a política nacional de nanotecnologia e regulamentam a rotulagem de produtos resultantes de partículas utilizadas em celulares, computadores, cosméticos e na área de saúde.

O debate conjunto das comissões de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável e de Ciência e Tecnologia, Comunicação e Informática da Câmara reuniu, neste evento, especialistas e governo num debate de propostas de regulamentação de um setor que, uma vez desenvolvido e regulamentado, tem potencial de movimentar trilhões de dólares por ano. Nos Estados Unidos, por exemplo, o governo investe bilhões de dólares para aprofundar o conhecimento em nanotecnologia.

Cabe ressaltar que, até o presente momento, nenhum país regulamentou o setor, embora essa inovação já esteja em uso em alguns lugares do mundo. A mobilização internacional é para criar uma legislação com o mínimo de impacto na população e no meio ambiente. Mas, infelizmente, o capital ainda fala mais alto.

No Brasil, as pesquisas ligadas à Nanotecnologia estão avançando. Cientistas, porém, consideraram fundamental aprofundar o conhecimento científico na área e os impactos ambientais e temem que a “pressa” para se criar uma legislação possa travar as pesquisas e trazer impactos negativos para o Brasil.

Um breve relato sobre os projetos que tramitam na Câmara, ambos de autoria do Deputado Sarney Filho (PV- MA). Um é o Projeto de Lei (PL) 6741/13, que institui a Política Nacional de Nanotecnologia e determina que o poder público controle os riscos e impactos relacionados ao setor. O outro é o PL 5133/13, que regulamentam a rotulagem de produtos resultantes das nanotecnologias ou que façam uso de nanocomponentes.

Em audiência pública, foi defendido um “equilíbrio” nas propostas para não haver risco de “engessar” a área de Nanotecnologia em uma única legislação ou criar uma norma impraticável em razão da existência de outras regulamentações de agências como a Agência

Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Foi também discutido que Nanotecnologia é uma área abrangente que pode ser utilizada em diversas áreas. Por isso, é fundamental trabalhar aspectos específicos, diante da altíssima especificidade, que existem entre vários produtos no campo das várias áreas do conhecimento, dentre os quais, como já dito, alimentos, cosméticos, medicamentos e vacinas.

Os projetos de lei, segundo pesquisadores, tratam as áreas de nanotecnologias de forma "restritiva". Outro problema citado é o fato de prever "autorização prévia" para realização de pesquisas podendo acarretar atrasos em projetos sob pena de paralisar os processos e ao mesmo tempo expor a população a riscos que possam ser evitados.

Dentre outras iniciativas, o projeto fixa também multas que variam de R\$ 5 mil a R\$ 1,5 milhão para reparar inconvenientes e eventuais danos causados pelas nanotecnologias.

É mister que esta lei seja bem fundamentada, pois é necessário ter informação qualificada sobre nanotecnologia, seus benefícios, riscos e conceitos de nanotoxicologia. Há, portanto, que se esgotar a questão científica.

Representando a Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC) na audiência, o acadêmico Fernando Galembeck, diretor do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), considerou restritivos e precipitados os dois Projetos de Lei (PLs) em tramitação na Câmara dos Deputados. No entendimento de Galembeck, serão necessárias várias legislações diante das especificidades das nanotecnologias. Ele também criticou o fato dos dois PLs tratarem a Nanotecnologia de forma abrangente.

No Legislativo do Rio Grande do Sul, segundo Engelmann (2016), encontra-se a Proposição n.º 19/2014 (RIO GRANDE DO SUL, 2016), protocolada em 25.02.2014, de autoria do deputado Alexandre Postal. A mesma postula “tornar obrigatória e regulamenta a rotulagem de produtos das nanotecnologias e de produtos que fazem uso das nanotecnologias”. Após mais de 2 anos de tramitação, constam 3 pareceres favoráveis à proposição, o último sendo dado em 14.06.2016. Portanto, a tendência é que tal proposição seja efetivamente transformada em Projeto de lei, sendo então a próxima etapa, a votação pela casa. Ressaltam-se na justificativa da proposição, dois pontos importantes, e que merecem destaque neste momento: o Direito à Informação e o Dever de Informar, conforme orientado por Wilson Engelmann (2015) sobre os nanocosméticos, sendo que “em todos os momentos, ingressa o direito à informação (do trabalhador e do consumidor) e o dever de informar (de todos aqueles que se encontram ao longo do ciclo de vida e que dispõe de alguma informação que deva ser socializada)”.

No estado de São Paulo, verifica-se o Projeto de Lei n.º 1456/2015, que tramita na Assembleia Legislativa, de autoria do deputado Hélio Nishimoto, com a mesma proposta de regulamentar e tornar obrigatória a rotulagem de produtos de nanotecnologia e os que fazem uso dela (SÃO PAULO, 2016). Este projeto passou, na data de 09.03.2016, pela Comissão de Defesa dos Direitos da Pessoa Humana, da Cidadania, da Participação e das Questões Sociais, com parecer favorável de todos os integrantes, e atualmente se encontra pronto para votação. Conforme acima descrito, um grande número de normativas já é encontrado, produzidas por várias agências e órgãos internacionais sobre esta nova tecnologia e sua gestão de risco, como a *National Institute for Health* (NIH) dos Estados Unidos, *National Science Foundation* (NSF), ISO, OECD, *British Standards Institution* (BSI), na União Europeia a Comissão Europeia e Parlamento Europeu, *European Medicines Agency*, *Co-nanomet*, *European Agency for Safety and Health at Work*, dentre outras. Essas diretrizes, avaliações de risco e recomendações poderão ser aproveitadas para a geração de um marco normativo interno (ENGELMANN, 2015).

Os esforços regulatórios atuais estão focados principalmente no nível nacional e regional (por exemplo, REACH, na Europa e TSCA, nos EUA), com discussões e desenvolvimentos em nível internacional que ocorrem em grande parte na OCDE e na ISO, com a publicação de uma série de estudos, padronizações e documentos de orientação. O REACH é regulamento da União Europeia aprovado com o objetivo de melhorar a proteção da saúde humana e do ambiente, face aos riscos que podem resultar dos produtos químicos e, simultaneamente, de fomentar, a competitividade da indústria química da União Europeia. Este regulamento promove, igualmente, métodos alternativos para a avaliação dos perigos das substâncias tendo em vista a redução do número de ensaios em animais. A palavra REACH significa Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Produtos Químicos (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*). O regulamento entrou em vigor em 1º de junho de 2007. Quanto a TSCA (*Toxic Substances Control Act*), a Lei de Controle de Substâncias Tóxicas, é originária dos Estados Unidos, aprovada por seu Congresso em 1976 e assinada em 11 de outubro de 1976, e regula a introdução de produtos químicos novos ou já existentes. Apoiou a maioria dos produtos químicos existentes, em contraste com a legislação mais recente de registro, avaliação e autorização de produtos químicos (REACH) da União Europeia. TSCA aborda a produção, importação, uso e eliminação de produtos químicos específicos, incluindo policlorobifenóis (PCBs), amianto, radônio e tinta à base de chumbo. No entanto, até o momento, não existe um quadro regulatório global específico ou unificado para os NMs, e os

produtos estão sendo registrados em diferentes países, muitas vezes de acordo com o seu tipo, e, invariavelmente, já dispostos no mercado.

O Brasil também aderiu ao projeto europeu NanoReg, que trata da regulação internacional em nanotecnologia. Tal iniciativa envolve 64 instituições de 16 países europeus, além de Austrália, Canadá, Coreia do Sul, Estados Unidos e Japão. Essa adesão foi aprovada pelo Comitê Interministerial de Nanotecnologia (CIN), do qual esta aluna também faz parte, que envolve quase uma dezena de ministérios, dentre os quais MCTI, as pastas do Meio Ambiente, da Agricultura, de Minas e Energia, e a do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior.

Cabe salientar que, desde 2012, o Ministério montou um programa chamado Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia (IBN), que conta com mais de 20 laboratórios associados que estudam o tema e traçam políticas. Entre suas atribuições está o fomento ao setor produtivo, fomento à pesquisa e desenvolvimento e Instituições de Ciência e Tecnologia (ICTs); formação de Recursos Humanos; cooperação internacional e também o marco legal e regulamentação do setor.

Em resumo, os dois projetos supracitados ainda estão em trâmite na Câmara e serão discutidas possíveis alterações para que, segundo especialistas, se adequem às legítimas necessidades do país.

Um aspecto importante da nanotecnologia está na possibilidade de sua forte interação com as políticas públicas, sobretudo nos países em desenvolvimento. Suas amplas potencialidades permitem propor possíveis novas soluções para diferentes e importantes problemas ligados à saúde, habitação, transportes, meio ambiente, saneamento básico, entre outras. Os pontos citados vêm sendo debatidos internacionalmente, e existe um grande espaço para a nanotecnologia: armazenamento, produção e conversão de energia; incremento da produtividade da agricultura; tratamento de água e poluição ambiental; diagnóstico e *screening* de doenças; sistemas de “entrega de fármacos” (*drug delivery*); processamento e armazenamento de alimentos; poluição do ar e remediação; materiais para construção; monitoramento da saúde humana e animal; vetores, detecção e controle de pragas.

É imperioso lançar um olhar atento para aquilo que tem sido chamado de nanogeopolítica, no sentido de utilizar da maneira mais apropriada possível nossos recursos minerais, principalmente aqueles que começam a se tornar matérias-primas cruciais para a nanotecnologia, tais como: lítio, índio, nióbio, zircônio e grafite.

Em suma, desde 2012 as nanotecnologias se tornaram comuns na produção de bens manufaturados. As aplicações no tratamento médico e nas Ciências da Vida se tornaram signi-

ficativas, tais como novos fármacos, dispositivos médicos e ferramentas de diagnóstico. Assim sendo, parafraseando Raj Bawa, diretor fundador da Sociedade Americana de Nanomedicina, entre outras tantas atribuições: “as nanotecnologias não são uma indústria, mas estarão presentes em todas as indústrias”. E finalizando com a citação do professor de Direito Ambiental do programa de Pós-Graduação em Direito da UNISINOS, Délton Winter de Carvalho (2014), que bem sintetiza tudo que foi dito até o momento:

Em outro caso, a nanotecnologia mostra-se como uma tecnologia de benefícios potenciais extraordinários e sérios riscos também. Riscos estes pobremente investigados e conhecidos. No longo prazo, o cenário das nanotecnologias pode envolver desenvolvimentos revolucionários, com uma possibilidade de profundos impactos econômicos e sociais positivos.

Diante dos limiares altos acerca tanto dos benefícios como riscos desta tecnologia uma precaução pura parece inapropriada, devendo ser evitada uma postura de simples obstaculização da continuidade das pesquisas envolvendo essa tecnologia (dado ao seu alto potencial benéfico futuro). Contudo, os limiares altos acerca da possível magnitude destes riscos, por evidente, justifica alguma graduação de cautela, devendo estes nanomateriais receberem uma maior densidade precaucional do que os produtos químicos em geral, tais como: i)restrições nos usos envolvendo potencial exposição pública até que maiores informações estejam disponíveis; ii)a sensibilização aos potenciais de possíveis danos graves e irreversíveis; iii)a potencialização de estímulo à pesquisa acerca das atuais questões envolvendo consequências à saúde, ao meio ambiente bem como referentes à segurança dos usos dos nanomateriais.

Por conseguinte, é inegável que os riscos são diversos, seja pelo impacto negativo ou sobre os logros positivos para a natureza e sociedade e, sob este aspecto, ele se torna um elemento decisivo. Englobamos nesta discussão sobre as nanotecnologias, inovação tecnológica, sociedade de risco, equidade intergeracional e a sociedade uma complexidade sistêmica inédita que, todavia, ingressa no ambiente jurídico por meio da compreensão dos riscos que envol-

vem e ameaçam o direito à sustentabilidade (WITTMANN, 2015) e, de forma irrefutável, a saúde do trabalhador.

Notório, portanto, fomentar a investigação acerca desta ciência, utilizando-se de todos os mecanismos já existentes, como orientações e guias de organizações internacionais, protegendo minimamente o meio ambiente e a vida humana.

Devido à inexistência de exigência legal, ambientes de trabalho não são avaliados quanto à presença de NMs. Não há que se conheça, estudos nacionais que tratem do tema. Há, por outro lado, como já sabido, número diversificado de ambientes de trabalho com possibilidade de exposição à NMs de potencial risco. Para além do ineditismo, há relevância quanto a revelar risco potencial e necessidade de proteção específica não abordados pela norma tanto quanto à ausência de mecanismos legais que a protejam.

Como citado anteriormente, diante de poucos estudos sobre o tema, encontramos na publicação de Saunders (2009), a preocupação diante de potencial interação de NMs com trabalhadoras ou potenciais consumidoras, sendo primordial para isso também a avaliação de barreiras biológicas, que controlam o acesso a todo o organismo e órgãos específicos.

Certamente, o potencial de risco precisa ser esclarecido. Devido ao grande *gap* de dados, é imperioso o desenvolvimento de estratégias e testes que garantam a identificação dos potenciais riscos, construídas em bases científicas sólidas.

Portanto, à luz dos conceitos expostos, considerando a importância da Nanotecnologia nos dias atuais, a entrada frequente no mercado de novos produtos nanotecnológicos, a insuficiência de estudos sobre o tema, a necessidade premente de investigação dos potenciais riscos e agravos à saúde produzidos pelos NMs, e a ausência de legislação trabalhista que contribua para a proteção e segurança dos trabalhadores, acredito ser este estudo de relevância, merecendo ser aprofundado e aperfeiçoado na evolução de seu curso.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL:

- Avaliar a qualidade de Revisões Sistemáticas sobre a toxicidade das nanopartículas de prata em células *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, em mamíferos, incluindo humanos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a qualidade metodológica das revisões realizadas.
- Avaliar vieses potencialmente presentes nas revisões analisadas.
- Discutir potenciais repercussões para o futuro da pesquisa científica e propostas de aperfeiçoamento.

5 ABORDAGEM METODOLÓGICA

O propósito desta pesquisa é avaliar e comparar Revisões Sistemáticas (RS) previamente caracterizadas, através da ferramenta AMSTAR 2, adaptada, um instrumento de medição para avaliar a qualidade metodológica das análises sistemáticas, sobre a toxicidade das nanopartículas de prata (AgNPs) em células *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, em testes em mamíferos, inclusive humanos. Como já retratado no referencial teórico, este estudo teve por objetivo inicial, através de uma revisão sistemática, avaliar a capacidade de NMs atravessarem a barreira placentária humana, comprometer o desenvolvimento e suscitar potencial embriotoxicidade, e, além disso, alcançar o leite materno, e, entre outros tópicos, analisar potenciais efeitos placentários e por exposição de lactentes a leite com NMs; avaliar possibilidade de fórmulas infantis conterem NMs e avaliar potencial de contaminação materna, infantil e de fórmulas serem oriundas de ambientes laborais. Diante da dimensão de artigos encontrados nas referidas bases de dados (845 artigos), e da inviabilidade de execução no período concedido ao Mestrado, a despeito das exclusões realizadas, toda abordagem metodológica preliminar foi descartada para dar lugar à nova e não menos oportuna pesquisa descrita abaixo e devidamente corroborada na Figura 7.

5.1. RELEVÂNCIA CIENTÍFICA DO MÉTODO

Em pertinente e relevante publicação, Zoltowski et al. (2014) enfatizam que a revisão sistemática é uma das técnicas mais potentes e prestigiadas para avaliação e síntese da literatura nos mais diversos campos de conhecimento. O desenvolvimento dessa metodologia, segundo os autores, deveu-se, especialmente, à Fundação Cochrane. Instituída em 1992, no Reino Unido, a fundação ajudou a disseminar estudos empregando a RS como metodologia de referência para as pesquisas da medicina baseada em evidências.

Os métodos para elaboração de revisões sistemáticas, em geral, preveem: (1) elaboração da pergunta de pesquisa; (2) busca na literatura; (3) seleção dos artigos; (4) extração dos dados; (5) avaliação da qualidade metodológica; (6) síntese dos dados (metanálise); (7) avaliação da qualidade das evidências; e (8) redação e publicação dos resultados. Assim sendo, uma revisão sistemática se caracteriza pela aplicação de estratégias de busca, análise crítica e síntese da literatura de forma organizada, minimizando e identificando os vieses. Desta forma, revisar sistematicamente um problema de pesquisa implica um trabalho reflexivo de análise

dos dados, sejam eles quanti ou qualitativos, não se resumindo a uma apresentação puramente cronológica e/ou descritiva de uma temática, afirmam os autores (ZOLTOWSKI et al., 2014).

Cabe salientar que para ter sua validade assegurada, um artigo de RS depende fundamentalmente da sua qualidade metodológica. Revisões de literatura tradicionais costumam aplicar uma narrativa de linguagem informal e métodos subjetivos de busca e síntese de dados, fomentando, portanto, vieses no processo de revisão. Em contrapartida, revisões sistemáticas objetivam um processo formal e controlado, com critérios explícitos de inclusão e exclusão de estudos, a fim de aclarar aos leitores a diretriz metodológica empreendida.

Entretanto, embora se coloque como uma metodologia robusta, é sabido que nem todas as revisões sistemáticas são realizadas com a mesma qualidade. Os pesquisadores tendem a adotar diferentes métodos e critérios para identificar, analisar e sintetizar os dados, ocasionando assim uma versatilidade na maneira de gerir uma revisão sistemática (LITTELL, CORCORAN, & PILLAI, 2008). Sob essa ótica, a qualidade metodológica de uma RS representa o quão bem ela foi conduzida. Zoltowski et al. (2014) instam que revisões bem conduzidas e elaboradas ampliam a probabilidade de apresentação de resultados não-enviesados, além de serem um pré-requisito para interpretações e aplicações válidas. É importante ressaltar que qualidade metodológica de uma RS não deve ser confundida com a dos estudos revisados, embora esteja relacionada com a avaliação e a descrição minuciosa destes.

Em vista desta inquietação e reforçando a metodologia utilizada nessa dissertação, é relevante relatar que é possível constatar na literatura internacional uma inquietude crescente com a qualidade metodológica de estudos de revisão sistemática, sobretudo na área da saúde. Entretanto, mesmo que exista essa preocupação em orientar os autores quanto a como realizar uma revisão adequada, a avaliação da qualidade metodológica dos artigos de RS já publicados no Brasil ainda é um campo incipiente.

5.1.1. Ferramenta AMSTAR

Em seu texto, Zoltowski et al. (2014) salienta a presença de mais de 24 instrumentos internacionais para avaliar a qualidade metodológica destas revisões sistemáticas. Sob este ângulo, um dos instrumentos que foram desenvolvidos de forma rigorosa e validada empiricamente, e aplicado nesta dissertação, é a ferramenta *Assessment of Multiple Systematic Reviews* (AMSTAR). Este instrumento tem apresentado boas evidências de validação de construto, concordância entre juízes e fidedignidade (SHEA et al., 2009) e desde sua criação em 2007, já foi citado mais de 1600 vezes, tornando-se o padrão ouro na avaliação da qualidade metodo-

lógica das revisões sistemáticas e orientação do seu desenvolvimento. Desta forma, o texto afirma que o AMSTAR tem bom acordo, confiabilidade, validade de construção e viabilidade, devendo essa descoberta ser corroborada por uma ampla gama de pesquisadores e uma gama mais diversificada de revisões. De acordo com Costa et al. (2015), a ideia contemporânea de uma revisão de estudos feita de maneira sistemática surgiu tão somente no final da década de 1970, a partir do conceito de metanálise. Apesar de o termo metanálise ser reiteradamente confundido como sinônimo de RS, os dois termos possuem sentidos distintos. Metanálise refere-se ao procedimento estatístico de tratamento dos dados de diversos estudos com o objetivo de agrupá-los, enquanto que RS refere-se ao processo de reunião, avaliação crítica e sintética dos resultados de múltiplos estudos, podendo ou não incluir metanálise. Como já mencionado, houve uma proliferação de revisões sistemáticas como uma das principais ferramentas para a saúde baseada em evidências. Isso evidencia oportunidades e riscos. As oportunidades são que RS criam um ambiente onde os pesquisadores podem basear decisões em resumos precisos, sucintos, críveis, abrangentes e compreensíveis das melhores evidências disponíveis em um tópico, minimizando erros e vieses. O viés de publicação pode ser compreendido pela tendência de estudos com resultados positivos (ou significativos) serem mais aceitos para publicação em detrimento daqueles com resultados negativos (ou não esperados). Desta forma, o pesquisador, ao realizar uma busca não sistemática, acaba supervalorizando a seleção de artigos com resultados positivos, visto que aqueles com resultados negativos costumam ser mais difíceis de serem encontrados. Buscando minimizar o viés de publicação, a RS caracteriza-se pela aplicação de estratégias de busca, análise crítica e síntese da literatura de forma organizada. Os riscos incluem variação na qualidade e validação empírica. Os tomadores de decisão tentaram, dessa forma, encontrar maneiras de utilizar melhor a vasta quantidade de RS disponíveis que oferecem literatura pertinente e bem fundamentada da mais alta qualidade. Portanto, entre as metas da ferramenta AMSTAR, podemos mencionar: criar instrumentos válidos, confiáveis e utilizáveis que ajudem os usuários a diferenciar entre revisões sistemáticas, focalizando sua qualidade metodológica e consenso de especialistas e facilitar o desenvolvimento de avaliações de alta qualidade. Desta forma, seu propósito pode estar relacionado ao desenvolvimento e avaliação de revisões, uso como guia para conduzir tais revisões, e, igualmente como amparo ao ensino das mesmas (SHEA et al., 2017). O autor revela ainda que a atualização do AMSTAR, agora denominada AMSTAR 2, e sua adaptação podem permitir uma avaliação mais detalhada de revisões sistemáticas que incluem estudos randomizados ou não randomizados de intervenções de saúde, ou ambos. Com ações para basear mais decisões em evidências de observação do mundo real, presume-se que a AMSTAR 2 ajudará os tomadores

de decisão na identificação de revisões sistemáticas de alta qualidade, inclusive aquelas baseadas em estudos não randomizados de intervenções de saúde. Em síntese, esta ferramenta é composta atualmente por dezesseis itens, e para cada item do instrumento, com modificação em seu estilo de respostas, com redação e diretrizes aprimoradas. Agora com há quatro opções de resposta: a) “sim”, caso a revisão contemple explicitamente o critério; b) “não”, caso não contemple; c) sim parcial e d) não parcial. Para cada resposta “sim”, aplica-se um ponto. A ferramenta é um *checklist* e a maioria de seus itens foi desenvolvida para ser autoexplicativa. O *checklist* completo e o protocolo descritivo do procedimento estão descritos nos Anexos A e B.

5.1.2. Ferramenta ROBIS

Em prossecução à avaliação de qualidade dos estudos propostos nesta dissertação, acrescentamos mais uma ferramenta para análise dos mesmos, definida em breve preâmbulo. Em conformidade com Whiting et al. (2016), trata-se de um instrumento denominado ROBIS (*Risk of Bias in Systematic Reviews*) para avaliar o risco de viés em revisões sistemáticas (e não em estudos primários). O ROBIS foi desenvolvido usando metodologia rigorosa e no presente momento está voltado para quatro grandes categorias de revisões, principalmente em ambientes de saúde: intervenções, diagnóstico, prognóstico e etiologia.

Nesta ferramenta fundamental, em adendo à análise da qualidade metodológica das revisões selecionadas estabelecida e demonstrada acima, através, da Ferramenta AMSTAR 2, evidenciamos, também, a análise dos possíveis riscos de vieses em tais revisões. Foi, portanto, aplicado o *checklist* desta ferramenta, na língua inglesa, com base no *guideline* lançado, em 2016, por Whiting et al. e com subsídio de tradução (ainda não validada) para o português pelo Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos e Departamento de Ciência e Tecnologia, publicado em 2017. A Fase 1, de caráter opcional, referente à avaliação da relevância, em que os avaliadores primeiro reportam a pergunta que estão tentando responder (na overview ou diretriz), o que chamamos de “questão alvo”, foi suprimida. A título de esclarecimento, pressupomos ser nossa revisão de caráter etiológico. Em sequência, foi realizada, primeiramente, a Fase 2, que diz respeito à identificação dos potenciais riscos de vieses durante o processo da revisão e envolve a avaliação de quatro domínios para cobrir os principais processos da revisão: (1) critérios de elegibilidade dos estudos; (2) identificação e seleção; (3) coleta de dados e avaliação dos estudos; e (4) síntese e resultados. Nesta fase, a ferramenta ROBIS identifica as principais limitações para auxiliar a avaliação do risco

de viés na fase final. Cada um dos quatro domínios da ferramenta compreende três seções: 1) informação usada para subsidiar a avaliação, 2) questões norteadoras e 3) avaliação do potencial risco de vieses. Os domínios devem ser considerados sequencialmente e não avaliados isoladamente. Isso significa que ao avaliar o domínio 2 (identificação e seleção dos estudos), o avaliador deve considerar a estratégia de busca em relação à questão de pesquisa apresentada no domínio 1. De acordo com sua diretriz, em todas as fases as questões norteadoras são respondidas como “Sim”, “Provavelmente Sim”, “Provavelmente Não”, “Não” e “Sem informações”, com “Sim” indicando baixo potencial de risco de viés. O risco potencial de viés associado com cada domínio é avaliado em seguida como “Baixo”, “Alto” ou “Incerto”. Se as respostas de todas as questões norteadoras para um domínio são “Sim” ou “Provavelmente Sim”, então o potencial risco de viés pôde ser avaliado como baixo. Se alguma questão norteadora for respondida como “Não” ou “Provavelmente Não” o risco de viés pôde ser classificado como alto. A categoria “Sem Informação”, como determina o *guideline*, foi utilizada somente quando os dados reportados foram insuficientes para permitir um julgamento. Ao registrar as informações utilizadas para subsidiar a avaliação, tal ferramenta pretende tornar a classificação transparente e, quando necessário, facilitar a discussão entre os autores da revisão. Em seguida foi executada a Fase 3, que corresponde a fase final da ferramenta e avalia se a revisão sistemática como um todo está sob o risco de viés. Essa avaliação utiliza a mesma estrutura do Domínio 2 uma vez que inclui questões norteadoras e justificativas; não obstante, o julgamento sobre potenciais riscos de viés foi substituído por uma avaliação geral do risco de viés da revisão. A primeira questão desta fase pergunta se a interpretação dos achados aborda todos os potenciais riscos identificados entre os domínios 1 e 4. Se não foi identificado nenhum risco potencial, de acordo com o manual, a questão pode ser respondida como “Sim”. Se um ou mais riscos potenciais forem identificados em quaisquer dos domínios anteriores, mas forem ponderados na interpretação dos resultados e nas conclusões do artigo, esta questão pode também ser respondida como “Sim”. A decorrer da classificação das outras questões desta fase, a revisão poderá ser classificada como “Baixo risco de viés”. Esta fase ainda insere três questões alusivas à interpretação dos achados da revisão. Essas questões abordam se as conclusões foram baseadas nas evidências apresentadas, se a relevância dos estudos incluídos foi considerada e se os autores evitaram enfatizar os resultados com base na significância estatística. Tais conceitos são importantes para a interpretação dos achados de uma revisão, pois são onde vieses podem ser introduzidos no estudo. À vista disso, tais resultados sumarizados são apresentados no quadro 13.

A diretriz acrescenta que falhas sistemáticas ou limitações na concepção ou realização de uma revisão têm potencial para tais riscos de viés. Existem diversas ferramentas para a avaliação crítica e a avaliação da qualidade das revisões sistemáticas, mas nenhuma objetiva especificamente avaliar o risco de viés em revisões sistemáticas. Isto posto, a ferramenta ROBIS surge para preencher essa lacuna. O *checklist* completo e o protocolo descritivo do procedimento estão descritos nos Anexos C, D, E e F.

5.2 RELEVÂNCIA CLÍNICA

De acordo com Moraschini et al. (2016), a tomada de decisões em medicina deve, preferencialmente, ser apoiada por evidências científicas, e revisões sistemáticas suplantam a hierarquia científica a este respeito. A análise crítica de revisões sistemáticas e metanálises publicadas pode contribuir e assinalar seus pontos fortes e fracos e identificar áreas que exigem aperfeiçoamentos adicionais.

5.3 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO

O segmento principal da dissertação, como dito, foi construído a partir de avaliações de revisões sistemáticas previamente selecionadas, seguindo os seguintes critérios de elegibilidade:

- 1 - Apenas revisões sistemáticas (com ou sem metanálise);
- 2 - Data: sem restrição;
- 3 - Línguas: sem restrição;
- 4 - Foco específico sobre a toxicidade de nanopartículas de prata (AgNPs) em células *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, em testes em mamíferos, inclusive humanos.

O quadro 7 exhibe as revisões excluídas e as justificativas para sua exclusão.

Quadro 7: Lista de estudos excluídos e justificativa de sua exclusão.

Referência	Número de artigos excluídos	Crítérios de Exclusão
Maudgalya et al. (2008).	1	Revisão sistemática que não contempla o estudo de nanopartículas de prata (AgNPs).
Eastlake et al. (2016); Boccuni et al. (2017); Mihalache et al. (2017); Myojo et al. (2017).	4	Revisão sistemática sem relação com o tema.
Sahu et al. (2016); Liu et al. (2016)..	2	Revisão descritiva.
Yan Adrian et al. (2016).	1	Texto completo não disponível.

5.4 ESTRATÉGIAS DE BUSCA E TRIAGEM DOS DADOS

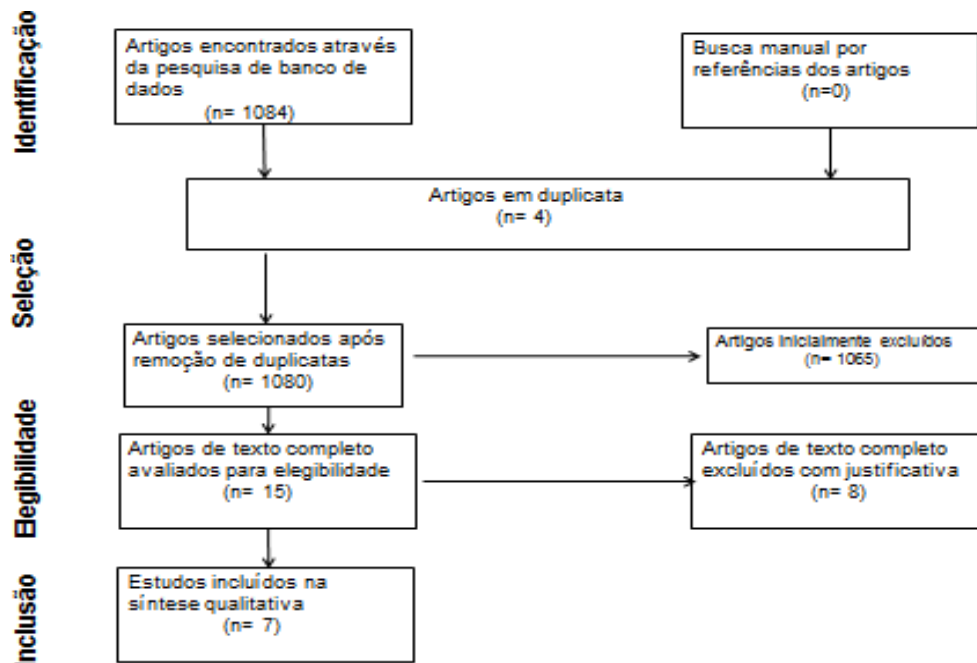
No presente momento, cabe ressaltar um breve histórico de um projeto que teve em sua origem o objetivo de, através de uma revisão sistemática, avaliar a capacidade de nanomateriais atravessarem a barreira placentária humana, comprometer o desenvolvimento e suscitar potencial embriotoxicidade, e, além disso, alcançar o leite materno, e, entre outros tópicos, analisar potenciais efeitos placentários e por exposição de lactentes a leite com NMs; avaliar possibilidade de fórmulas infantis conterem NMs e avaliar potencial de contaminação materna, infantil e de fórmulas serem oriundas de ambientes laborais. Foi, por conseguinte, efetuada uma extensa busca, caracterizada por revisão de literatura, que se baseou, fundamentalmente, em artigos de revistas científicas, resenhas, teses e dissertações, consultadas nas mais difundidas bases de dados, tais como: Latin American and Caribbean Health Science Literature Database (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SciELO), PubMed, MedLine, Cochrane Library, Embase/Elsevier Base de Dados, Scopus, Web of Science, Nano Online e também a chamada “*grey literature*” (literatura cinzenta) encontrada em outras bases de livros, teses e dissertações disponíveis no portal Capes. Pesquisaram-se, ainda, teses, dissertações e artigos citados nas referências bibliográficas da literatura selecionada por intermédio das referidas bases de dados. Para nossa surpresa, esta ampla, diversa e específica busca se concretizou, inicialmente, em 845 artigos, o que, a despeito das exclusões realizadas, seria inexecutável diante do tempo outorgado para o Mestrado. Assim sendo, toda abordagem metodológica preliminar foi descartada para dar lugar à nova pesquisa que se fundamenta na análise qualitativa de revisões sistemáticas sobre a toxicidade das nanopartículas de prata em células *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, em testes em humanos e mamíferos, cujo objeto será mais bem

aprofundado em capítulo próprio. Enfatizamos que a eleição da nanopartícula de prata, entre outras considerações, se deve, sobretudo, à relevância dos potenciais efeitos adversos gerados, destacando aqui a possibilidade de resistência bacteriana, mencionada previamente nesta dissertação, e seu volume de produção mundial como também ao contingente de literatura científica publicizada. Cabe aqui salientar que não encontramos nenhum *Quality Assessment* relacionado ao tema.

Destaca-se uma necessidade urgente de melhorar a maneira pela qual a produção científica é avaliada, sobretudo por agências financiadoras, instituições acadêmicas e outros (THE PLOS MEDICINE EDITORS, 2006). Para tal, um grupo de editores de periódicos acadêmicos, em dezembro de 2012, desenvolveu um conjunto de recomendações, conhecido como a Declaração de São Francisco sobre Avaliação de Pesquisas (DORA, 2012). Neste contexto, a declaração enfatiza que o chamado “fator de impacto” de uma publicação possui várias limitações como ferramenta para avaliação de pesquisa e há que se considerar, entre outras recomendações, a necessidade de avaliar a pesquisa por seus próprios méritos e não com base na revista em que a mesma é publicada, reforçando, portanto, a necessidade de eliminar o uso de métricas baseadas em periódicos.

Para o presente estudo, uma pesquisa eletrônica foi conduzida, sem restrição de data, caracterizada por revisão de literatura e baseou-se, fundamentalmente, em artigos de revisões sistemáticas em revistas científicas, teses e dissertações, consultadas nas principais bases de dados descritas acima. Cabe ressaltar que, o campo da pesquisa neste tema está expandindo rapidamente e a literatura publicada até o momento deverá ser interpretada com cautela.

Os processos de busca e triagem para seleção de artigos foram realizados primeiramente pela análise de títulos e resumos. Artigos completos foram selecionados para leitura crítica e foram avaliados de acordo com a elegibilidade dos critérios (inclusão / exclusão) para futuras extrações de dados. Segue abaixo a Figura 7 (*PRISMA Flow*) com a visão geral dos artigos. As seguintes palavras-chave e operadores booleanos foram pesquisados em todos os bancos de dados: “systematic review” AND nanosilver OR silver OR AgNP OR nanoag OR agnano OR “silver nanoparticles” AND toxicity e filtros específicos de cada base de dados. Termos MeSH não foram encontrados. É relevante ressaltar a existência de diversas diretrizes de relatórios para os principais tipos de estudo, tais como: STROBE, CONSORT, PRISMA, ARRIVE, etc. A escolha da diretriz PRISMA se baseia na eleição de revisões sistemáticas para o referido estudo.

Figura 7: Visão geral do estudo com artigos incluídos e excluídos

5.5 EXTRAÇÃO DE DADOS E *QUALITY ASSESSMENT*

Em seu oportuno texto, Jagannath et al. (2010) reiteram que profissionais de saúde precisariam ler uma grande quantidade de artigos originais todos os dias para acompanhar as informações mais recentes em seu campo; as revisões sistemáticas são uma forma de se manterem atualizados quanto à literatura médica. Estas RS fornecem uma síntese lógica da base de pesquisa através de uma pergunta cuidadosamente formulada e análise de todas as evidências disponíveis. Uma busca abrangente da literatura utilizando critérios de inclusão e exclusão predeterminados, como já relatado, é seguida por uma avaliação crítica do risco de viés em qualquer estudo incluído, e também pode incluir uma síntese de dados para os resultados de interesse. Cabe salientar que há um maior reconhecimento nos dias atuais de que a qualidade metodológica e a qualidade dos relatórios das revisões sistemáticas são dois aspectos distintos a serem considerados na avaliação das revisões. A qualidade metodológica representa o quão bem foi realizada a revisão sistemática (pesquisa de literatura, agrupamento de da-

dos, etc.). A qualidade dos relatórios, no entanto, considera o quão bem os revisores sistemáticos relataram sua metodologia e resultados.

Diante desta premissa, neste presente estudo, para cada revisão sistemática incluída, foram extraídos os seguintes dados: autores, revista de publicação, ano de publicação, país, pesquisa questão/objetivo, número de estudos incluídos, tipo de estudo, material, modelo animal, órgão alvo, via de administração, dose, método, e sumário de resultados. Como já mencionado, para aumentar a precisão e reduzir a possibilidade de viés, a qualidade dos estudos incluídos foi avaliada utilizando duas ferramentas de avaliação de qualidade: a) As diretrizes AMSTAR2, com seus novos critérios, incluindo os 16 itens e suas opções. Entretanto, este *checklist* foi adaptado a esta dissertação, com intuito de realizar uma avaliação da qualidade metodológica mais apropriada das revisões selecionadas. Porquanto, determinados itens do *checklist* não são aplicáveis às mesmas, em razão da característica dos estudos, pois seu perfil não é o de intervenção em saúde, característica a que se voltam, em especial, os instrumentos de avaliação da qualidade. Ainda assim, as diretrizes são rigorosas e seguir o que seja adequado à avaliação de qualidade metodológica das revisões sistemáticas aqui selecionadas, tem reflexo na qualidade do trabalho feito e, quiçá, sobre formuladores de políticas públicas. Isto posto, foram excluídos os itens 9, 11, 12 e 15 deste *checklist* e sua argumentação e critérios serão retratados em segmento próprio. Seguindo os critérios do AMSTAR2, somente itens da opção “sim” geraram pontuação. Portanto, cada artigo pôde obter uma pontuação entre 0 (sem critérios) e 12 (todos os critérios). Não há consenso sobre a pontuação da qualidade dos estudos usando o sistema AMSTAR 2. No entanto, Moraschini et al. (2016), afirmam que estudos com menos de três pontos são de baixa qualidade. Cabe salientar que o AMSTAR 2 é, notadamente, uma ferramenta mais rigorosa e ampla em analogia com a primeira AMSTAR e não foram encontradas durante a pesquisa revisões que a empregaram. Por fim, será aplicada a lista de verificação ROBIS já anteriormente citada, voltada à análise de vieses.

Reitera-se aqui, a relevância da seleção da nanopartícula de prata, que, entre outros argumentos, se deve, sobretudo, à magnitude de potenciais efeitos adversos gerados, seu volume de produção mundial e também ao contingente de literatura científica publicizada.

Em vista do ineditismo deste objeto, porquanto não encontramos nenhum *Quality Assessment* relacionado ao tema, pondera-se ser de grande contribuição na contextualização a possível proposição de meios hierarquizados de controle.

6 RESULTADOS

Como já reportado em seção própria, o escopo deste estudo é a avaliação e comparação das Revisões Sistemáticas identificadas, no que concerne à qualidade metodológica de análises sistemáticas. O foco deste estudo foi a toxicidade das nanopartículas de prata em células *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, em testes em mamíferos e humanos. Os dados foram coletados usando as duas ferramentas de avaliação da qualidade supracitadas e foram analisados usando estatística descritiva. As características dos estudos incluídos são apresentadas no Quadro 8. Ao analisar estes dados, nos chama a atenção certa heterogeneidade dos artigos, como, por exemplo, as revisões sistemáticas disponíveis podem ter incluído características de estudos com comparadores diferentes ou diferentes tempos de acompanhamento, tipos de estudo, participantes etc. As prováveis fontes de viés também serão mencionadas. Reputa-se este fato à escassez, ou mesmo, ausência de estudos de *quality assessment* neste tema, sendo encontradas com maior frequência revisões com peculiaridades etiológicas (agente tóxico e efeito) em detrimento das de intervenção em saúde. Dentre as sete revisões incluídas no estudo, especificamente, no que concerne à questão da pesquisa, pudemos observar diversidades no tema, com dois estudos de genotoxicidade em mamíferos, um sobre evidência de toxicidade mitocondrial, outro com estudos de citotoxicidade induzida pela exposição à AgNP, em células humanas, um com foco em mecanismos de toxicidade e outros dois inerentes à identificação dos riscos relacionados às NPs mais comuns e/ou tóxicas aos trabalhadores e possíveis marcadore de vigilância e mandatórias recomendações. Estes últimos, mesmo com citações de toxicidade, não buscavam, a priori, desfechos tóxicos, e, sim, em especial, exposição. O fato é que todas têm em comum a questão da toxicidade, o que nos faculta e suporta a realização do estudo. Nenhuma revisão conduziu uma análise quantitativa (metanálise). Verificou-se, também, uma grande variabilidade no número de estudos incluídos em cada revisão, variando entre 7 e 110, com uma média de 36,8 estudos. Cinco revisões incluíram estudos experimentais e duas abrangeram estudos observacionais em humanos.

Para aplicação e interpretação da ferramenta AMSTAR 2, como descrito, foi utilizado seu *guideline* (incluso no Anexo A) para análise dos dados do *checklist*. Cabe salientar que, a despeito de igualmente ter sido realizada avaliação em *score* único (tipicamente visto em *quality assessment*), não preconizada pelo presente manual, apresentamos aqui as classificações de itens individuais não combinadas para criar uma pontuação geral, o que é fortemente

recomendado pelo referido texto. Consequentemente, consideramos o impacto potencial de uma classificação inadequada para cada item (Quadro 11). No *score* único nenhuma das avaliações incluídas contemplou todos os critérios da AMSTAR 2 (Quadro 8). As pontuações variaram entre 0 a 9/12 pontos, com uma média de 3 pontos. A diretriz reitera que uma pontuação geral pode disfarçar fraquezas críticas que devem diminuir a confiança nos resultados de uma revisão sistemática e recomenda que seus usuários adotem o processo de classificação com base na identificação de domínios críticos (Quadros 9 e 10) ou alguma variação com base nesses princípios. Os autores reforçam que todas as etapas na condução de uma revisão sistemática e metanálise são importantes, mas sete domínios podem afetar criticamente a validade de uma revisão e suas conclusões. Dois deles referem-se ao risco de viés, se é acessado adequadamente e como pode influenciar os resultados de uma revisão. Portanto, estes domínios têm maior peso se aplicáveis aos estudos. Em nosso caso, como descrito, três deles foram excluídos. Os autores do referido manual também reiteram que as falhas nos itens identificados como críticos podem não ser fatais se outras informações (por exemplo, diretamente dos autores da revisão) indicarem que a opção de resposta primária estava errada. Isso pode proporcionar garantia sobre os resultados da revisão ou permitir uma alteração da revisão através de análises adicionais. Há que ressaltar que esta listagem é uma sugestão e os avaliadores podem adicionar ou substituir outros domínios críticos, de acordo com as características dos seus estudos.

Quadro 8: Principais características das revisões incluídas e scores de avaliação obtidos usando AMSTAR 2

No	Autor	Public.	Ano	País	Questão da pesquisa	Núm. estudos incluídos	Tipo de estudo	Material	Modelo Animal	Órgão-Alvo	Via de adm.	Dose	Método	Síntese de Resultados	Quality Estimate (AMSTAR)
1	Fewell et al.	<i>E.Health</i>	2017	UK	Revisar os estudos de genotoxicidade em mamíferos usando micro e AgNP	16	Experimenta in vivo e in vitro em humanos	Micro e AgNP	Mamíferos (ratos e camundongos)	Sig penférico, medula óssea, baço, fígado, pulmão, test. e prole	IP, EV, 10µ a inalação 1000mg/kg e oral dia	10µ a inalação 1000mg/kg e oral dia	Ensaio de cometa alc, ensaio de micronúcleos, ensaio microscópico de células em metafase, ensaio de cometa neutro e RAPD-test	Rupturas de cadeia de DNA, aberração cromossômica, aumento significativo da frequência de micronúcleos de eritrócitos, aumento significativo do risco e dano ao DNA em espermatozoides, indução significativa de micronúcleos no sangue e na medula óssea. Ingestão materna de AgNP durante a gestação induziu grande rearranjo de grama no desenvolvimento embrionário. Aumento significativo da eviência de fragmentação de DNA no fígado, baço, medula óssea, rim e espermático. Efeitos dose dependentes. Outros: nenhuma alteração significativa.	2
2	Mauer e Meyer	<i>Environ Science Nano</i>	2013	UK	Examinar a evidência existente de toxicidade mitocondrial induzida pela exposição à AgNP e o papel das propriedades físico-químicas das próprias NP na toxicidade mitocondrial	18	Experimenta in vivo e in vitro	AgNP	Ratos e cultura de células humanas	Fibroblastos de fígado de rato; células de fibroblastos de neuroblastoma de ratos; células de fibroblastos pulmonares humanos; células de glioblastoma humano; cérebro, fígado, músculo e coração de ratos; células de carcinoma epitelial basal alveolar humano; mitocôndrias do fígado de rato; células de adenocarcinoma colorretal humano; fibroblastos de pulmão de hamster; C. albicans; hepatócitos humanos; células dendríticas de ratos; monócitos humanos primários; monócitos e queratinócitos de ratos; cultura de células corticais de ratos; células de leucemia monocítica aguda humana; células de hepatoblastoma, neuroblastoma e astrocitoma humano; C. elegans; células de carcinoma escamoso oral humano e queratinócitos humanos.	0,5 a 201 µm	Ensaio MITT	Estresse oxidativo mitocondrial; despolimerização mitocondrial; redução da atividade mitocondrial e citosólica e inibição das flutuações mitocondriais; indução de apoptose mitocondrial.	0	
3	Debia et al.	<i>Annals of Occupational Hygiene</i>	2016	USA	Compilar artigos científicos que relatam medições de exposição em locais de trabalho envolvidos na produção e/ou manipulação de ENMs, resumir os dados de exposição relatados nos estudos para cada NM li estádo e avaliar a qualidade da evidência através da abordagem GRADE adaptada.	50	Estudos observacionais em humanos	MWCNTs, SWCNTs, DWCNTs, CNTs, CNFs, NP Al ₂ O ₃ , NP TiO ₂ , AgNP, SiO ₂ NP, Nanoclays, NP Fe, NP CeO ₂ , C60 NP ZnO	Humanos	N/A	N/A	N/A	Microscopia eletrônica; Análise química; Método termo-óptico modificado	Evidência baixa, moderada e alta NP CeO ₂ - zero	4

continua

4	Alter et al. <i>Journal of Advanced Research</i>	2017 Japão	Elucidar diferentes propriedades de AgNPs	25	Experimentais em animais e cultura de células humanas	AgNP	Mamíferos (ratos) e Cél. Humanas	Toxicidade celular	N/A	1 a 13 mm Faixa de concent.: 0,4 a 250µl/ml e 10 a 50g/ml	Ensaio MTT Ensaio MTT Alamar blue Ensaio CCK-8 Ensaio XTT	Cito toxicidade de tamanho dependente. Toxicidade dependente do tamanho através de autofagia do sistema lisossomal e ativação do "inflammasome". EC50 dependente de tamanho e entrada mais fácil de partículas menores. Citotoxicidade induzida através de estresse oxidativo. Toxicidade dependente do tamanho da partícula e do potencial de superfície. Interação da AgNP com vírus HIV dependente do tamanho. Apoptose celular. Neurotoxic. ROS e LDH gerados de forma Dependente de tamanho.	1
5	Turkçez et al. <i>Engineering Materials</i>	2013 Turquia	Avaliar práticas baseadas em evidências para segurança de NP, com vistas a estudos de genotoxicidade e carcinogenicidade.	32	Experimentais <i>in vitro</i>	Óxido de alumínio Nanotubos de C. Cobalto NP Óxido de cobre Óxido de dióxido, óxido de tungstênio Óxido de ferro Dióxido de titânio Carboneto de silício NP de ouro e prata	Humanos Peixes D. Melanogaster Hamster chinês Ratos	Toxicidade celular	N/A	Ensaio de micronúcleo Ensaio cometa Ames test Ensaio wing spot	Genotoxicidade Mutagenicidade Carcinogenicidade Estresse oxidativo Imunoxidante peroxidação lipídica Inflamação Apoptose	0	
6	Secordo et al. <i>Critical Reviews in Toxicology</i>	2016 USA	Analisar a metodologia para testes toxicológicos de NP aerossolizadas em sistemas de exposição <i>in vitro</i> de AIC para avaliação dos riscos de ENP, prevenindo comparações entre laboratórios para identificar limiares de dose para efeitos adversos.	110 (N=7)	Experimentais <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	AgNP AuNP TiO ₂ Carbono Nanocristais de celulose CeO ₂ CuO Cu ₂ O Fe Fe ₃ O ₄ Fe ₂ O ₃ NiO MgO ₂ SiO ₂ Poliestireno	Cél. hum Humanos Animais (ratos, camundongos, e hamsters)	Toxicidade celular Pulmão	Direta Inalação Sem caract. online relatada 0,7µg/cm ² 2,4mg 2 x 10 ⁶ /cm ³ 0,01mg/m ³ 10,0mg/m ³	Sistema AIC Inalação	Sem redução da viabilidade celular. Parada do ciclo cel. após exposição. Significativo dano ao DNA. Sem citotoxicidade ou mudança na secreção de IL-8 e TNF-α após exposição isolamento de AgNP, mas ↑ de secreção de IL-8 e TNF-α qdo expostos com LPS. Exposição a prata rão resultou em significativa citotoxicidade ou inflamação. Comparação de submerso com AIC, submerso mostra resposta mais forte. ~ 2/3 das AgNP foram associadas às células em 4h de exposição. Comparação de múltiplas opções analíticas, experimentais e de simulação – bom acordo em todas. ↑ da citotoxicidade e de citocinas pró-inflamatórias, exceto TNF-α.	5	

7	Gulumian et al.	<i>Plos One</i>	2016	South Africa	Identificar abordagens de triagem e vigilância a fim de extrair dados sobre: 1- estudos que tenham sido bem sucedidos; 2- identificação dos riscos relacionados as NP mais comuns e/ou tóxicas aos trabalhadores; 3- possíveis marcadores de vigilância de exposição. Recomendações baseadas nos achados atuais.	7	Estudos de casos	AgNP NM derivados de carbono	Humanos	Concent. de AgNP no sangue e urina; Hemograma; Bioquímica; Saúde geral; ; Contato ambiental	Inalação	Valor	Monit. clínica e lab. (incluindo biomarcadores)	AgNP no sangue e urina - não elevados. Sem diferença significativa na inflamação pulmonar, dano oxidativo, genotoxicidade e função pulmonar; ↓ das enzimas oxidativas; ↑ de marcadores cardiovasculares; Injúria cardiov. e pulmonar sem mudança significativa na FC nem ↑ do estresse oxidativo ou marcadores de peroxidação lipídica, apenas ↓ de SOD e GPX-1 foi observada. Avaliações auto-relatadas para NM heterogêneas (comparados a ferramenta BC que requer validação. ↑ do estresse pulm. Diferença significativa no Co ou Mo. Todos os marcadores oxidativos ↑ no grupo exposto vs. grupo não exposto.	9
							Estudos transversais	AgAu		Enzimas oxidantes; Marcadores cardiovasculares; Genotoxicidade;		(0,35 e 1,35 μ/m3 de AgNP por			
							Estudo longitudinal	TiO ₂ SiO ₂		cardiovasculares; Genotoxicidade; Função pulmonar; Função neurocomportamental; Sintomas/Doenças cardiov. e respirat. ; Espirros; Doença de pele; Sintomas neurol., Efeitos à saúde: teste de função pulmonar, resposta pulmonar à inflamação, estresse oxidativo, peroxidação lipídica, concent. sang. de metal; marcadores de estresse oxidativo pulmonar.		0,158 e 0,109 mg/m3 de TPS, respectivamente) Questionário de exposição auto-administrado (potencial de inalação e contato dérmico)			

Nota: Nem todas as referências citam o tamanho das partículas.

Quadro 9: Domínios críticos da Ferramenta AMSTAR 2

<ul style="list-style-type: none"> • Protocolo registrado antes do início da revisão (item 2) • Adequação da pesquisa bibliográfica (item 4) • Justificação para exclusão de estudos individuais (item 7) • Risco de viés dos estudos individuais incluídos na revisão (item 9) – excluído. • Adequação de métodos meta-analíticos (item 11) – excluído. • Consideração do risco de viés ao interpretar os resultados da revisão (item 13) • Avaliação da presença e impacto provável do viés de publicação (item 15) - excluído.

Quadro 10: Avaliação da confiança geral nos resultados da revisão

<p>Alta</p> <p>Não ou uma fraqueza não crítica: a revisão sistemática fornece um resumo preciso e abrangente dos resultados dos estudos disponíveis que abordam a questão de interesse.</p> <p>Moderada</p> <p>Mais de uma fraqueza não crítica *: a revisão sistemática tem mais de uma fraqueza, mas sem falhas críticas. Pode fornecer um resumo preciso dos resultados dos estudos disponíveis que foram incluídos na revisão.</p> <p>Baixa</p> <p>Mais de uma falha crítica com ou sem falhas não críticas: a revisão tem uma falha crítica e pode não fornecer uma solução precisa e abrangente do sumário dos estudos disponíveis que abordam a questão de interesse.</p> <p>Criticamente baixa</p> <p>Mais de uma falha crítica com ou sem falhas não críticas: a revisão tem mais de uma falha crítica e não deve ser confiável para fornecer um resumo preciso e abrangente dos estudos disponíveis.</p> <p>* Múltiplos pontos fracos não críticos podem diminuir a confiança na revisão e pode ser apropriado mover a avaliação geral de confiança de moderada para baixa.</p>

Diante deste preâmbulo, apresentamos no Quadro 10 a análise e interpretação individual dos itens do *checklist* da Ferramenta AMSTAR 2 e suas respectivas respostas, com vistas à avaliação da qualidade metodológica das revisões identificadas de forma individualizada.

Quadro 11: Avaliação e interpretação do *checklist* da Ferramenta AMSTAR 2.

Itens do Checklist	Respostas	Interpretação
1-As perguntas de pesquisa e os critérios de inclusão para a revisão incluem os componentes do PICO?	Sim – 2 Não - 5	Apenas duas revisões (nº 3 e 7), contemplaram este item, adaptando sua análise para PIO. Cinco revisões não atenderam a este quesito.
2-O relatório da revisão contém uma declaração explícita de que os métodos de revisão foram estabelecidos antes da realização da revisão e o relatório justificou quaisquer desvios significativos do protocolo?	Sim – 4 Parcialmente sim – 1 Não - 2	A inclusão de um protocolo de revisão não é um parâmetro comum a todos os estudos. Via de regra, identificamos subitens isolados, sem o cumprimento de todas as questões que contemplam os critérios de busca.
3-Os autores da revisão explicaram a seleção dos desenhos de estudo para inclusão na revisão?	Sim- 1 Não- 6	Apenas uma revisão (nº7), incluiu todas as justificativas para seus critérios de inclusão.
4-Os autores da revisão usaram uma estratégia abrangente de pesquisa de literatura?	Sim-zero Parcialmente sim- 4 Não-3	Todas as referências identificadas não atenderam a quesitos de pesquisa tais como: lista de referências bibliográficas, <i>grey literature</i> , opinião de especialistas, etc. Quatro delas contemplaram os itens básicos.
5-Os autores da revisão realizaram a seleção do estudo em duplicado?	Sim-3 Não-4	Apenas três revisões realizaram o método em <i>peer review</i> , com no mínimo dois revisores independentes que concordaram com a seleção dos estudos.
6-Os autores da revisão realizaram a extração de dados em duplicado?	Sim-2 Não-5	Apenas duas revisões conduziram a extração dos dados em <i>peer review</i> , com no mínimo dois revisores independentes concordando com tal extração.

<p>7- Os autores da revisão fornecem uma lista de estudos excluídos e justificam as exclusões?</p>	<p>Sim-2</p> <p>Parcialmente sim-2</p> <p>Não-3</p>	<p>Nem todas as revisões justificam as exclusões dos estudos na íntegra, notadamente no que concerne a exigência de cada artigo individualmente.</p>
<p>8- Os autores da revisão descrevem os estudos incluídos em detalhes adequados?</p>	<p>Sim-1</p> <p>Parcialmente sim-3</p> <p>Não-3</p>	<p>Apenas uma revisão contempla o detalhamento sugerido em sua totalidade, que embora relacionado ao componente do PICO, não tem relação com o item 1.</p>
<p>9- Os autores da revisão usaram uma técnica satisfatória para avaliar o risco de viés (RoB) em estudos individuais que foram incluídos na revisão?</p>	<p>Não aplicável.</p>	<p>Nenhuma das revisões incluídas neste estudo elaborou risco de viés nos estudos individuais incluídos.</p>
<p>10- Os autores da revisão relataram as fontes de financiamento para os estudos incluídos na revisão?</p>	<p>Sim-zero</p> <p>Não-7</p>	<p>Nenhuma das revisões cita as fontes de financiamento individualmente de cada estudo incluído.</p>
<p>11- Se a metanálise foi realizada, os autores da revisão usaram métodos apropriados para a combinação estatística de resultados?</p>	<p>Não aplicável.</p>	<p>Nenhuma das revisões incluídas neste estudo elaborou metanálise.</p>
<p>12- Se a metanálise foi realizada, os autores da revisão avaliaram o impacto potencial do risco de viés em estudos individuais sobre os resultados da metanálise ou outra síntese de evidências?</p>	<p>Não aplicável.</p>	<p>Nenhuma das revisões incluídas neste estudo elaborou metanálise.</p>
<p>13- Os autores da revisão consideraram risco de viés em estudos individuais ao interpretar / discutir os resultados da revisão?</p>	<p>Sim-1</p> <p>Não-6</p>	<p>Apenas uma revisão (nº7) avaliou risco de viés em cada estudo selecionado.</p>
<p>14- Os autores da revisão forneceram uma explicação satisfatória e discussão de qualquer</p>	<p>Sim-3</p>	<p>Três revisões mencionam a presença de heterogeneidade nas variáveis determinadas,</p>

heterogeneidade observada nos resultados da revisão?	Não-4	que foram aceites neste estudo.
15-Se eles realizaram síntese quantitativa, os autores da revisão realizaram uma investigação adequada do viés de publicação (pequeno viés de estudo) e discutiram seu provável impacto nos resultados da revisão?	Não aplicável.	Nenhuma das revisões incluídas neste estudo elaborou metanálise.
16- Os autores da revisão relataram quaisquer fontes potenciais de conflito de interesses, incluindo algum financiamento recebido para realizar a revisão?	Sim-5 Não-2	Apenas duas revisões não mencionam este tópico.

Os itens em negrito no quadro acima são considerados domínios críticos e serão pertinentes na avaliação geral de confiança dos resultados das revisões, adaptada a esta dissertação, que será apresentada, individualmente, no Quadro 12 a seguir. Os resultados do *checklist* estão incluídos no anexo C.

Quadro 12: Avaliação da confiança geral nos resultados da revisão

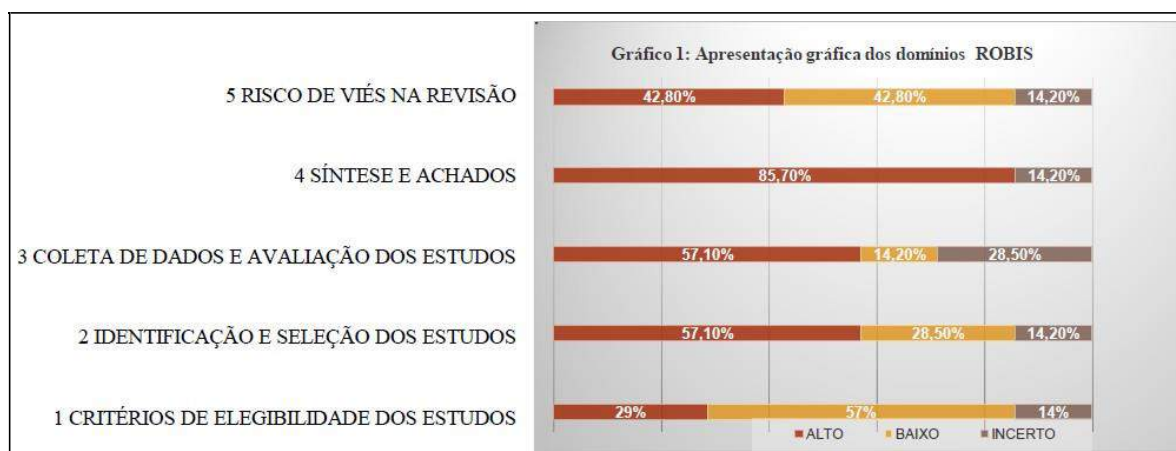
Autor	Itens críticos	Itens não críticos	Grau de confiança
Fewtrell et al.	4	6	Criticamente baixa
Maurer e Meyer	4	8	Criticamente baixa
Debia et al.	4	4	Criticamente baixa
Akter et al.	4	7	Criticamente baixa
Turkez et al.	4	8	Criticamente baixa
Secondo et al.	3	4	Criticamente baixa
Gulumian et al.	1	2	Baixa

No que compete à interpretação da ferramenta ROBIS sobre a análise do risco de viés das revisões selecionadas, foi realizada a avaliação dos domínios do ROBIS, correspondentes as fases 2 e 3, individualmente. Das sete revisões selecionadas, constatamos três revisões avaliadas como “baixo potencial de viés”, três revisões consideradas de “alto potencial de viés” e uma de classificação “incerta”. À vista disto, tais resultados sumarizados são apresentados no quadro 13. A avaliação completa está demonstrada no *checklist* desta ferramenta no anexo H, como já mencionado.

Em complemento à apresentação do quadro de sumários dos domínios do ROBIS, Whiting et al. (2016), preconizam a utilização de apresentações gráficas e afirmam que podem ser úteis para resumir tais avaliações em várias revisões. Ao usar a exibição gráfica, os revisores podem considerar mais adequado medir esse valor com base no número de estudos incluídos na revisão ou no número total de participantes em cada revisão, em vez de simplesmente em avaliações individuais. Isto posto, apresentamos no gráfico 1 um modelo de apresentação gráfica sugerida para resultados ROBIS referentes às revisões selecionadas no presente estudo. As estatísticas demonstram equivalência entre a categorização final de “alto risco de viés” (42,8%) e “baixo risco de viés” (42,8%) nas revisões estudadas, com pequeno percentual de avaliação “incerta” (14,2%), como ratifica o gráfico 1. Igualmente foi performada a avaliação estatística de todos os domínios ROBIS, tal qual também menciona o respectivo gráfico.

Quadro 13: Sumário dos domínios ROBIS (risco de vieses).

Revisão	1. Critérios de eleg. dos estudos	2. Identificação e seleção dos estudos	3. Coleta de dados e aval. dos estudos	4. Síntese e achados	5. Risco de viés na revisão
Fewtrell et al.	Baixo: não houve menção de um protocolo de revisão, mas menciona critérios de inclusão/exclusão, com avaliações pré-definidas. Referência a algumas pesquisas adicionais.	Alto: As bases de dados parecem ser satisfatórias, no entanto, não há referência a métodos adicionais para identificação de artigos relevantes. Não foi possível julgar a adequação da estratégia de busca. Sem relato de protocolo. Breve referência a pesquisa em <i>peer review</i> . Não há informação sobre o papel dos revisores na avaliação de títulos e resumos.	Alto: A qualidade do estudo não foi totalmente avaliada.	Alto: A síntese é susceptível a produzir resultados enviesados porque os potenciais vieses foram ignorados. Metanálise não foi realizada. Não há referência a protocolo.	Alto: A Fase 2 identificou algumas áreas potenciais de risco de viés, como na estratégia de busca, bem como falta de avaliação formal de qualidade. Ausência de métodos adicionais de pesquisa, tais como, referenciais bibliográficos, pesquisa em <i>grey literature</i> , citações, pesquisa manual, etc.
Maurer e Meyer	Alto: Não há informações suficientes sobre os critérios de elegibilidade para julgar se estudos apropriados foram incluídos na revisão. Não está claro se os critérios foram estabelecidos previamente. Há restrição quanto a língua e ausência de delimitação e avaliação da qualidade dos estudos.	Alto: Alguns estudos elegíveis para revisão foram provavelmente perdidos. Base de dados insuficiente (apenas PubMed). A restrição de artigos no idioma inglês implica que há um alto risco de que estudos relevantes não tenham sido incluídos nesta revisão. Não foi possível julgar se a estratégia de busca estava adequada. Não foram utilizados métodos adicionais de pesquisa. Sem relato claro de combinação de termos. Sem informações sobre data da pesquisa e sobre <i>peer review</i> .	Alto: Algum risco de viés pode ter sido introduzido por meio da coleta de dados ou processo de avaliação do risco de viés. Ausência de avaliação formal da qualidade da evidência demonstra que o risco de viés nos estudos incluídos não é claro. Sem informações sobre <i>peer review</i> e avaliação do risco de viés. Informações pouco detalhadas dos estudos incluídos.	Alto: Potenciais vieses foram ignorados. Presença de inadequações na Metodologia. Não houve discussão ou avaliação da heterogeneidade na análise.	Alto: Nenhuma das limitações identificadas foi considerada na revisão. Não houve menção sobre a qualidade dos estudos. As limitações da pesquisa e a restrição apenas à língua inglesa limitam a revisão.
Debia et al.	Baixo: Todas as questões foram respondidas como "Sim". Portanto, conclui-se que não foi identificado potencial risco de viés sobre a especificação dos critérios de elegibilidade. Evidenciamos a especificação da pergunta e dos objetivos da revisão, bem como a identificação prévia e justificativa dos critérios de elegibilidade.	Baixo: A pesquisa parece razoável e é transparente. Os métodos utilizados para pesquisar referências e selecionar estudos para inclusão foram claramente relatados.	Alto: Algum viés pode ter sido introduzido por meio de coleta de dados ou processo de avaliação do risco de viés, pois houve breve informação sobre tal risco.	Alto: Potenciais vieses foram ignorados. Não houve discussão ou avaliação da heterogeneidade na análise.	Baixo: A despeito de ignorar potenciais vieses e avaliação da heterogeneidade, na fase 2 os estudos foram claramente relatados. As conclusões foram baseadas na evidência e consideraram a relevância dos estudos incluídos.
Akter et al.	Incerto: Sem relato de protocolo prévio. Critérios de elegibilidade não especificados. As informações reportadas foram insuficientes para avaliar risco de viés.	Incerto: Sem informações sobre base de dados, buscas adicionais e estratégias de busca. Não há relato de quantos revisores rastream títulos e resumos. As informações reportadas foram insuficientes para avaliar o risco de viés.	Incerto: Ausência de informação sobre <i>peer review</i> . As informações reportadas foram insuficientes para avaliar o risco de viés.	Alto: Possivelmente potenciais vieses foram ignorados. Inadequações na metodologia.	Incerto: As informações reportadas foram insuficientes para avaliar o risco de viés.
Turkez et al.	Alto: Não há menção de um protocolo oficial da revisão ou pré-especificação clara dos objetivos da revisão. Ausência de detalhamento sobre os critérios de elegibilidade e limitação a língua inglesa.	Alto: Apenas uma base de dados foi utilizada, sem relato de métodos adicionais de pesquisa. Não foi possível julgar se a estratégia de busca foi adequada. Não houve menção sobre os métodos de identificação e seleção dos estudos. A restrição de artigos no idioma inglês implica em alto risco de viés, pois sugere que estudos relevantes não tenham sido incluídos nesta revisão.	Incerto: Ausência de informação sobre <i>peer review</i> . As informações reportadas foram insuficientes para avaliar o risco de viés.	Alto: Possivelmente potenciais vieses foram ignorados. Inadequações na metodologia. Poucas informações sobre síntese e resultados.	Alto: Os potenciais riscos de viés identificados na Fase 2 não foram considerados nas conclusões da revisão. As conclusões não foram confirmadas pela evidência e não consideraram a relevância dos estudos incluídos para a pergunta da pesquisa.
Secondo et al.	Baixo: Todas as questões foram respondidas como sim ou provavelmente sim. Portanto, conclui-se que não foi identificado potencial risco de viés sobre a especificação dos critérios de elegibilidade. Evidenciamos a especificação da pergunta e dos objetivos da revisão, bem como a identificação prévia e justificativa dos critérios de elegibilidade.	Alto: Alguns estudos para revisão foram provavelmente perdidos. Apenas uma base de dados foi utilizada (PubMed). Sem informações complementares de estratégias de busca (referências bibliográficas, citações, opinião de especialistas, etc). Sem informações sobre termos utilizados para pesquisa sem relato de <i>peer review</i> . A restrição de artigos no idioma inglês implica que há um alto risco de que estudos relevantes não tenham sido incluídos nesta revisão. Adequação parcial da estratégia de busca.	Alto: Algum risco de viés pode ter sido introduzido por meio da coleta de dados. Não há descrição de avaliação formal do risco de viés.	Alto: Os autores não declararam se as análises de sensibilidade foram utilizadas para avaliar a robustez dos resultados. Foi utilizado protocolo PRISMA. Menção sobre heterogeneidade em síntese narrativa. Não há relato de avaliação de risco de viés.	Baixo: Não obstante ignorar potenciais vieses e análise de sensibilidade, os estudos foram claramente relatados. As conclusões foram baseadas na evidência e consideraram a relevância dos estudos incluídos.
Gulumian et al.	Baixo: Todas as questões foram respondidas como "Sim". Portanto, conclui-se que não foi identificado potencial risco de viés sobre a especificação dos critérios de elegibilidade. Evidenciamos a especificação da pergunta e dos objetivos da revisão, bem como a identificação prévia e justificativa dos critérios de elegibilidade.	Baixo: Dada a questão da revisão e os critérios de elegibilidade avaliados no Domínio 1, esforço considerável foi realizado para identificar o maior número de estudos possíveis. Utilização de vários métodos de pesquisa por meio de uma estratégia de busca sensível e apropriada, além de serem tomadas medidas para minimizar o viés.	Baixo: O risco de viés foi avaliado usando critérios adequados. A extração de dados e a avaliação do risco de viés envolveu no mínimo dois revisores. As características dos estudos e os resultados relevantes foram extraídos.	Baixo: É improvável que a síntese produza resultados enviesados, pois limitações nos dados foram superadas ou de pouco impacto. Todos os estudos relevantes foram incluídos. Referência a protocolo publicado e acessível executados e considerados estudos de heterogeneidade das revisões incluídas. Elaborada análise de risco de viés em ferramenta própria.	Baixo: É provável que os resultados da revisão sejam confiáveis. Fase 2 sem risco de viés identificado. Conclusões basearam-se na evidência e consideraram a relevância dos estudos incluídos.

Gráfico 1: Apresentação gráfica para resultados ROBIS das revisões em estudo.

7 DISCUSSÃO

Sob este cenário, este estudo, como mencionado, tem por objetivo geral, avaliar a qualidade de Revisões Sistemáticas sobre a toxicidade das nanopartículas de prata em células *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, em mamíferos, incluindo humanos e seus desdobramentos, tais como: avaliar a qualidade metodológica das revisões realizadas, avaliar vieses potencialmente presentes nas revisões analisadas e discutir potenciais repercussões e necessidades de controle, bem como aperfeiçoamento da avaliação da qualidade de tais revisões sistemáticas. Sob esta premissa, discorreremos na introdução sobre os riscos potenciais relativos à exposição a nanomateriais, em especial das AgNP, escopo desta pesquisa. Neste contexto, cabe ressaltar que revisões e metanálises sistemáticas fornecem dados científicos valiosos para a comunidade científica e podem contribuir na tomada de decisões sob tais potenciais riscos e possíveis precauções a serem tomadas. Uma das vantagens das revisões sistemáticas, como referido, é a combinação de resultados e conclusões de estudos múltiplos, evitando assim que os pesquisadores tenham que ler vários artigos sobre o mesmo tópico. Ademais, as análises quantitativas (metanálises) podem combinar os resultados de cada estudo para obter uma estimativa do efeito em estudo, ensejando a análise de fontes de heterogeneidade e, conseqüentemente, aumentando a precisão e o poder estatístico da revisão. Para supervisionar a abordagem metodológica de revisões e metanálises sistemáticas publicadas, o desempenho de estudos de avaliação de qualidade e risco de viés é precípuo. Há relatos de que estudos que avaliaram a qualidade das revisões no campo biomédico foram publicados desde 1987. No âmbito da nanotecnologia, sobretudo a nanomedicina, se é reduzido o número de revisões sistemáticas e metanálises encontradas na literatura, estudos de avaliação da qualidade destas revisões é ainda mais limitado, reforçando a citação anterior de que não encontramos nenhum *quality assessment* sobre este tema. Pode-se deduzir, neste estudo, que a correlação entre as pontuações das duas listas de verificação utilizada foi negativa, indicando maior possibilidade de erros e maior risco de viés no sistema de pontuação implementado. Embora apresentando investigações de certa similitude, com eixo comum na questão da toxicidade, as revisões sistemáticas incluídas neste estudo tiveram alta heterogeneidade metodológica. Considerando a avaliação dos domínios críticos da Ferramenta AMSTAR 2, como demonstrado no Quadro 10 e considerados nesta pesquisa, cinco estudos referiram o uso de protocolo prévio. No que diz respeito ao Quadro 11, que faz referência à avaliação e interpretação do *checklist* da ferramenta AMSTAR 2, cabe ressaltar que, em alguns itens deste instrumento, a resposta foi “Parcialmente Sim”. Salientamos que, de acordo com sua diretriz, apenas as respostas “Sim” auferem

pontuação. Entretanto, a depender do contexto da revisão, de sua relevância e do domínio analisado, julgamos que a resposta “Parcialmente Sim”, poderia ser perfeitamente interpretada como “Sim”, à luz de tais variáveis analisadas, tendo potencial para ampliar, sobretudo, sua pontuação. Evidenciamos, também, que nenhuma revisão atendeu aos pré-requisitos de ampla pesquisa, tais como referências bibliográficas, *grey literature*, opinião de especialistas, etc. Em análise de outro domínio crítico, apenas duas revisões justificam as exclusões dos estudos na íntegra. E, por fim, demonstramos que apenas uma revisão considerou o risco de viés em estudos individuais ao interpretar ou discutir os resultados da revisão. Apenas uma revisão refere o uso do protocolo PRISMA e nenhuma relata ter seguido as recomendações do Manual Cochrane de Análises Sistemáticas de Intervenções. Das sete revisões selecionadas, apenas uma realizou uma avaliação de qualidade de seus estudos à luz dos resultados. Esta análise é crucial porque desvenda características importantes para os leitores, incluindo a qualidade metodológica e o risco de parcialidade dos estudos incluídos e outorga a formulação de diretrizes para a melhoria de estudos futuros.

No que concerne à interpretação da utilização da Ferramenta ROBIS, como já relatado, a mesma é dividida em quatro domínios (veja o Quadro 13 para o resumo dos resultados e no anexo H para resultados completos). No que diz respeito ao domínio 1, que avaliou as preocupações quanto à especificação dos critérios de elegibilidade do estudo, quatro revisões alcançaram um baixo risco de viés na classificação geral. Com relação ao domínio 2 que examina a identificação e seleção dos estudos, houve predomínio de alto risco de viés, posto que quatro revisões foram assim enquadradas. O domínio 3 avaliou as preocupações com os métodos usados para coleccionar os dados e avaliar os estudos, e quatro estudos alcançaram um alto risco de avaliação de viés, dois estudos tiveram grau incerto e apenas um de baixo risco. No que se refere ao domínio 4, que avaliou as inquietações quanto à síntese e achados, seis revisões obtiveram um grau elevado de risco de viés. A seção final, que corresponde à Fase 3, fornece uma classificação para o risco geral de viés das revisões; três conseguiram uma baixa classificação para risco geral de viés, três uma classificação alta, ou seja, alta probabilidade de risco de viés e uma foi classificada como incerta.

Até a presente data, a AMSTAR é uma das principais escalas para avaliar a qualidade de uma revisão sistemática. Entretanto, como relatado, consideramos, a despeito do maior detalhamento do *checklist*, a sua atualização para Ferramenta AMSTAR 2, uma avaliação mais complexa e com diretrizes mais rigorosas. Em geral, houve consistência entre ROBIS e AMSTAR. Apenas uma avaliação alcançou uma classificação geral elevada (pontuação > 6) com o AMSTAR 2 (embora a AMSTAR não tenha sido projetada para ter uma pontuação fi-

nal). Essa revisão também apresentou baixo risco de viés no ROBIS. Ainda assim, houve discrepâncias na classificação da revisão de Debia et al. que conseguiu um baixo risco de viés, mas marcou apenas 4 pontos na ferramenta AMSTAR, demonstrando que esta classificação pode ser variável, sobretudo de acordo com os domínios críticos da AMSTAR 2 e do ROBIS individualizados ao perfil da revisão. Como nenhuma revisão selecionada executou metanálise, as sínteses narrativas foram muito mais difíceis de avaliar particularmente no domínio 4. Há pouca informação nas diretrizes de orientação do ROBIS sobre como pontuar as questões de sinalização onde nenhuma síntese quantitativa foi realizada.

8 CONCLUSÕES

Em síntese, duas ferramentas de avaliação de qualidade e risco de viés foram utilizadas no presente estudo. Apesar de serem bem aceitas, essas ferramentas podem desencorajar a consulta por muitos pesquisadores devido à sua extensão e à complexidade dos dados. Uma limitação das listas de verificação utilizadas é a falta de uma avaliação quantitativa, ou seja, essas ferramentas apenas analisam a qualidade das avaliações, mas não valorizam uma pontuação final como recomendação do *guideline*. No presente estudo, duas revisões marcaram o valor zero em *score* único na Ferramenta AMSTAR 2. Apesar da falta de uma escala de referência para avaliar a qualidade das avaliações usando um sistema de pontuação, foi proposto que estudos com uma pontuação de <3 pontos podem ser de baixa qualidade. Cabe ressaltar que, no presente *quality assessment*, nenhuma das revisões alcançou todos os critérios nos *checklists* utilizados. Isso indica que não foram priorizados manuais disponíveis ou diretrizes para a preparação dessas referidas revisões sistemáticas. Diante disso, há uma irrefutável indicação da premência de padronização metodológica em futuras revisões.

No que concerne a possíveis considerações para estudos futuros, as revisões focadas na toxicidade e exposição a nanomateriais, em especial à nanopartícula de prata e seus possíveis desfechos devem ser desenvolvidas de acordo com manuais e diretrizes existentes, seguindo um rigoroso processo de busca (incluindo a *grey literature*) e seleção de artigos, conforme amplamente discutido neste estudo. Além disso, a qualidade dos estudos incluídos deve ser avaliada e a heterogeneidade e o risco de viés devem ser ponderados utilizando testes específicos e gráficos (por exemplo, *funnel plot*, teste de Egger) e, seguramente, as ferramentas descritas neste estudo. No que diz respeito aos critérios de elegibilidade, as revisões referentes a este tópico devem levar em consideração fatores que podem alterar ou interferir sobre a toxicidade de nanopartículas de prata (AgNPs) e outros nanomateriais em células *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, em testes em mamíferos, sobretudo em humanos.

Reiteramos aqui, portanto, que o foco principal deste estudo, como já relatado, é a imprescindibilidade da ampliação da apreciação da qualidade das revisões, que devem seguir, rigorosamente, as parametrizações recomendadas já descritas, com vistas a possibilitar que pesquisadores tenham fácil acesso a tais estudos, objetivando a implementação de políticas públicas que outorguem medidas de controle e proteção dos expostos, bem como a concepção de indicadores biológicos e *screening* de vigilância médica para trabalhadores e consumidores

que manipulam tais materiais. Cabe ressaltar que a qualidade de tais revisões está diretamente relacionada com a qualidade da ciência que se demanda produzir na atualidade.

Os resultados desta pesquisa demonstraram que, a despeito de uma série de mudanças e elaboração de novas ferramentas que prestigiam a qualidade da pesquisa científica, não houve, até o momento, alterações substanciais na implementação de ações com tal objetivo no que concerne ao objeto toxicidade da nanopartícula. Este estudo, conseqüentemente, aponta para tais dificuldades e ressalta a importância de que se configurem ações que privilegiem a pesquisa científica, bem como a saúde de um modo geral, como base da geração de políticas públicas em saúde, sobretudo, de trabalhadores que manuseiam tais materiais.

REFERÊNCIAS

1. _____. O direito das nanotecnologias e a (necessária) reconstrução dos elementos estruturantes da categoria do "direito subjetivo". In: ENGELMANN, Wilson; ROCHA, Leonel Severo; STRECK, Lenio Luiz (orgs.) Constituição, sistemas sociais e hermenêutica: anuário do programa de Pós-graduação em Direito da UNISINOS: mestrado e doutorado. Porto Alegre: Livraria do Advogado Editora; São Leopoldo: UNISINOS, 2014. p. 339-359.
2. ABDI - Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. Nanotecnologia na área da saúde: mercado, segurança e regulação. 2012. Disponível em: <<http://www.abdi.com.br/Estudo/GUTERRES%20E%20POHLMANN%20APRESENTACAO%20FINAL%20corrigida.pdf>> Acesso em: 12 jul. 2016.
3. ABDI - Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. Relatório de Acompanhamento Setorial. Nanotecnologia na área da saúde: mercado, segurança e regulação. Jan. 2013. Disponível em: <<http://www.abdi.com.br/Estudo/relatorio-nanotecnologia.pdf>> Acesso em: 14 jul. 2016.
4. AKTER, M. et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research*, 2 nov. 2017.
5. ANDRADE, L. R. B.; AMARAL, F. G.; WAISSMANN, W. Análise de propostas de gestão de riscos em ambientes com atividades envolvendo nanomateriais. *Vigilância Sanitária em Debate*, v. 1, n. 4, 30 nov. / 2013.
6. BEAUVOIR, S. DE. *Mémoires d'une jeune fille rangée*. Paris: Gallimard, 2000.
7. BEER, C. et al. Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion? *Toxicology Letters*, v. 208, n. 3, p. 286–292, 5 fev. 2012.
8. BENN, T. M.; WESTERHOFF, P. Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics. *Environmental Science & Technology*, v. 42, n. 11, p. 4133–4139, 1 jun. 2008.
9. BOCCUNI, F. et al. Measurement techniques of exposure to nanomaterials in the workplace for low- and medium-income countries: A systematic review. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 220, n. 7, p. 1089–1097, out. 2017.
10. BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos randomizados. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
11. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. ROBIS – Risk of Bias in Systematic Reviews: ferramenta para avaliar o risco de viés em revisões sistemáticas: orientações de uso / Ministério

- rio da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tecnologia. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 52 p.: il. ISBN 978-85-334- 2536-1.
12. BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema GRADE – manual de graduação da qualidade da evidência e força de recomendação para tomada de decisão em saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
 13. BRAYDICH-STOLLE, L. et al. In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells. *Toxicological Sciences*, v. 88, n. 2, p. 412–419, 1 dez. 2005.
 14. BUERKI-THURNHERR, T.; VON, M.; WICK, P. Knocking at the door of the unborn child: engineered nanoparticles at the human placental barrier. *Swiss Medical Weekly*, 5 abr. 2012.
 15. CAGAN, ROSS. “The San Francisco Declaration on Research Assessment”. *Disease Models & Mechanisms* 6, nº 4 (julho de 2013): 869–70. <https://doi.org/10.1242/dmm.012955>.
 16. CAMPAGNOLO, LUISA et al. Physico-Chemical Properties Mediating Reproductive and Developmental Toxicity of Engineered Nanomaterials. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 26, p. 4488–4494, 2012.
 17. CARVALHO, Délton Winter de. As dimensões da incerteza e as graduações de intensidade para aplicação dos princípios da prevenção e precaução na decisão jurídica face aos riscos ambientais extremos. In: ENGELMANN, Wilson; ROCHA, Leonel Severo; STRECK, Lenio Luiz (orgs.) *Constituição, sistemas sociais e hermenêutica: anuário do programa de Pós-graduação em Direito da UNISINOS: mestrado e doutorado*. Porto Alegre: Livraria do Advogado Editora; São Leopoldo: UNISINOS, 2014. p. 67-86.
 18. CASSEE, F. R. Introduction: Reasons for concern. *XIV International Congress of Toxicology*, v. 259, Supplement, p. S71, 10 out. 2016.
 19. CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. *Toxicol Lett*, v. 176, 2008.
 20. COSTA, A. B. et al. Construção de uma escala para avaliar a qualidade metodológica de revisões sistemáticas. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 20, n. 8, p. 2441–2452, ago. 2015.
 21. DA SILVA, D. W.; ENGELMANN, W. Nanotecnologias e Meio Ambiente, os riscos e a urgência de regulação: uma análise do diálogo entre as fontes do direito. 10º Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental, out. 2016.
 22. DEBIA, M. et al. A Systematic Review of Reported Exposure to Engineered Nanomaterials. *The Annals of Occupational Hygiene*, v. 60, n. 8, p. 916–935, 1 out. 2016.

23. DELGADO, ISABELLA FERNANDES; PAUMGARTTEN, FRANCISCO J.R. Current challenges in toxicological research: Evaluation of the developmental toxicity of manufactured nanomaterials. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, v. 1, n. 4, p. 11–24, 2013.
24. EASTLAKE, A.; ZUMWALDE, R.; GERACI, C. Can control banding be useful for the safe handling of nanomaterials? A systematic review. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 18, n. 6, p. 169, 22 jun. 2016.
25. EASTLAKE, A.; ZUMWALDE, R.; GERACI, C. Can control banding be useful for the safe handling of nanomaterials? A systematic review. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 18, n. 6, p. 169, 22 jun. 2016.
26. EMA, M. et al. A review of reproductive and developmental toxicity of silver nanoparticles in laboratory animals. *Reproductive Toxicology*, 2017.
27. ENGELMANN, Wilson. As nanotecnologias como um fator de aproximação democrática dos países da América Latina: em busca de moldes regulatórios. In: ENGELMANN, Wilson; SPRICIGO, Carlos M. (orgs.) *Constitucionalismo democrático na América Latina: desafios do século XXI*. Curitiba: Multideia, 2015. p. 105-122.
28. ENGELMANN, Wilson; FLORES, André Stringhi; WEYERMÜLLER, André Rafael. *Nanotecnologias, marcos regulatórios e direito ambiental: construindo um diálogo transdisciplinar na busca de marcos regulatórios em nanotecnologias*. 1. ed. Curitiba: Honoris Causa, 2010.
29. ENGELMANN, Wilson; HOHENDORFF, Raquel Von; FROHLICH, Afonso. Das nanotecnologias aos nanocosméticos: conhecendo as novidades na escala nanométrica. In: ENGELMANN, Wilson. *Nanocosméticos e o Direito à Informação*. Erechim: Devian, 2015. Pg. 15-76. HOHENDORFF, Raquel Von; COIMBRA, Rodrigo; ENGELMANN, Wilson. As nanotecnologias, os riscos e as interfaces com o direito à saúde do trabalhador. *RIL*. Brasília. a.53. n. 209. p.151-172.jan. /mar. /2016.
30. EUROPEAN COMMISSION; DIRECTORATE GENERAL FOR HEALTH & CONSUMERS. *Opinion on nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance*. Luxembourg: European Commission, 2014.
31. FEWTRELL, L.; MAJURU, B.; HUNTER, P. R. A re-assessment of the safety of silver in household water treatment: rapid systematic review of mammalian in vivo genotoxicity studies. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, v. 16, n. 1, p. 66, 20 jun. 2017.

32. GRADE WORKING GROUP. Disponível em: <http://gradeworkinggroup.org/society/index.htm>. Acessado em fev/2017.
33. GRAND VIEW RESEARCH – MARKET RESEARCH & CONSULTING (2012) - Global Silver Nanoparticles Market Will Reach \$2.54 Billion by 2022: Grand View Research, Inc. <http://www.grandviewresearch.com/industryanalysis/silver-nanoparticles-market> Acessado em 21/12/2017.
34. GULUMIAN, M. et al. Systematic Review of Screening and Surveillance Programs to Protect Workers from Nanomaterials. PLOS ONE, v. 11, n. 11, p. e0166071, 9 nov. 2016.
35. HOUGAARD, K. S. et al. A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.), v. 56, p. 118–140, 15 ago. 2015.
36. ILLUMINATO, I., Friends of the Earth U.S. (2016). Nanoparticles in Baby Formula: Tiny new ingredients are a big concern.
37. JAGANNATH, V. A. et al. Quality assessment of systematic reviews of health care interventions using AMSTAR. Indian Pediatrics, v. 48, n. 5, p. 383–385, maio 2011.
38. JEONG, G. N. et al. Histochemical study of intestinal mucins after administration of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. Archives of Toxicology, v. 84, n. 1, p. 63–69, jan. 2010.
39. JI, J. H. et al. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. Inhalation Toxicology, v. 19, n. 10, p. 857–871, ago. 2007.
40. JOHNSTON, H. J. et al. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. Critical Reviews in Toxicology, v. 40, n. 4, p. 328–346, 1 abr. 2010.
41. JUNGER, W. L.; PONCE DE LEON, A. Poluição do ar e baixo peso ao nascer no MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL, 2002. Cadernos de Saúde Pública, v. 23, p. S588–S598, 2007.
42. KELLY, R. J. Occupational medicine implications of engineered nanoscale particulate matter. Journal of Chemical Health and Safety, v. 16, n. 1, p. 24–39, jan. 2009.
43. KIM, W.-Y. et al. Histological study of gender differences in accumulation of silver nanoparticles in kidneys of Fischer 344 rats. Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A, v. 72, n. 21–22, p. 1279–1284, 2009.
44. KULVIETIS, V. et al. Transport of nanoparticles through the placental barrier. The Tohoku Journal of Experimental Medicine, v. 225, n. 4, p. 225–234, 2011.
45. LABORATÓRIO DE QUÍMICA DO ESTADO SÓLIDO DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – <http://lqes.igq.unicamp.br> . Acessado em jan./2017.

46. LALOY, J. et al. Impact of Silver Nanoparticles on Haemolysis, Platelet Function and Coagulation. *Nanobiomedicine*, v. 1, 2014.
47. LANDRIGAN, P. J. et al. Chemical contaminants in breast milk and their impacts on children's health: an overview. *Environmental Health Perspectives*, v. 110, n. 6, p. A313– A315, jun. 2002.
48. LARESE, F. F. et al. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology*, v. 255, n. 1–2, p. 33–37, 8 jan. 2009.
49. LEE, J. H. et al. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats. *Particle and Fibre Toxicology*, v. 10, p. 36, 1 ago. 2013.
50. LI, W. The era of nanotechnology and omics sciences. *European Journal of BioMedical Research*, v. 1, p. 1, 9 abr. 2015.
51. LITTELL, J. H.; CORCORAN, J.; PILLAI, V. K. *Systematic reviews and meta-analysis*. Oxford; New York: Oxford University Press, 2008.
52. LIU, Y.; LI, H.; XIAO, K. Distribution and biological effects of nanoparticles in the reproductive system. *Current Drug Metabolism*, v. 17, n. 5, p. 478–496, 2016.
53. LOURO, H.; BORGES, T.; SILVA, M. J. Nanomateriais manufacturados: novos desafios para a saúde pública. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, v. 31, n. 2, p. 188–200, jul. 2013.
54. LUBICK, N. Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles—or both? *Environmental Science & Technology*, v. 42, n. 23, p. 8617–8617, 1 dez. 2008.
55. MAUDGALYA, T. et al. A critical appraisal of epidemiological studies investigating the effects of ultrafine particles on human health. *Human Factors and Ergonomics in Manufacturing*, v. 18, n. 3, p. 358–373, maio 2008.
56. MAURER, L. L.; MEYER, J. N. A systematic review of evidence for silver nanoparticle-induced mitochondrial toxicity. *Environmental Science: Nano*, v. 3, n. 2, p. 311–322, 2016.
57. MAYNARD, A., *The Conversation*. Nanoparticles in baby formula: should parents be worried? Maio. 2016. Disponível em: <<http://www.theconversation.com/nanoparticles-in-baby-formula-should-parents-be-worried-59246>>. Acesso em: 31 jan. 2017.
58. MCTI - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Diálogos setoriais para a regulação de produtos baseados em nanotecnologia. Nov. 2014. Disponível em: <http://sectordialogues.org/sites/default/files/acoes/documentos/dialogos_setoriais_-_nanotecnologia_portugues.pdf> Acesso em 19 jul. 2016.

59. MEAD, M. N. Contaminants in Human Milk: Weighing the Risks against the Benefits of Breastfeeding. *Environmental Health Perspectives*, v. 116, n. 10, p. A426–A434, out. 2008.
60. MEDEIROS, A.; GOUVEIA, N. Relação entre baixo peso ao nascer e a poluição do ar no Município de São Paulo. *Revista de Saúde Pública*, v. 39, p. 965–972, 2005.
61. MELNIK, E. A. et al. Transfer of Silver Nanoparticles through the Placenta and Breast Milk during in vivo Experiments on Rats. *Acta Naturae*, v. 5, n. 3, p. 107–115, 2013.
62. MIHALACHE, R. et al. Occupational exposure limits for manufactured nanomaterials, a systematic review. *Nanotoxicology*, v. 11, n. 1, p. 7–19, 2017.
63. MORASCHINI, V.; DOS SP BARBOZA, E. Quality assessment of systematic reviews on alveolar socket preservation. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, v. 45, n. 9, p. 1126–1134, 2016.
64. MORISHITA, Y. et al. Distribution of Silver Nanoparticles to Breast Milk and Their Biological Effects on Breast-Fed Offspring Mice. *ACS Nano*, v. 10, n. 9, p. 8180–8191, 27 set. 2016.
65. MYOJO, T.; NAGATA, T.; VERBEEK, J. The Effectiveness of Specific Risk Mitigation Techniques Used in the Production and Handling of Manufactured Nanomaterials: A Systematic Review. *Journal of UOEH*, v. 39, n. 3, p. 187–199, 2017.
66. NAGANO, K. Biodistribution of nanosilica particles in pregnant mice and the potential risk on the reproductive development. *Yakugaku Zasshi*, v. 131, n. 2, p. 225–228, 2011.
67. NANOMÉDECINE. Cahier Technologies Les Nanomédicaments. Les dossiers de La Recherche, Paris, n. 2, p. 93, février – mars 2013.
68. NANOTECHNOLOGY AND EMERGING TECHNOLOGIES NEWS FROM NANOWERK – <http://nanowerk.com>
69. NORMAS REGULAMENTADORAS. Portal do Trabalho e Emprego. Ministério do Trabalho e Emprego. Disponível em <http://portal.mte.gov.br/legislacao/normas-regulamentadoras-1.htm> Acesso em 14 ago. 2015.
70. OBERDÖRSTER, G. et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation toxicology*, v. 16, n. 6–7, p. 437–445, 2004.
71. OBERDÖRSTER, G. Lung clearance of inhaled insoluble and soluble particles. *Journal of Aerosol Medicine*, v. 1, n. 4, p. 289–330, 1988.
72. OECD (2016). *Nanomaterials in Waste Streams: Current Knowledge on Risks and Impacts*, OECD. Publishing, Paris. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1787/9789264249752-en>>. Acesso em 31 mar 2016.

73. PARK, K. et al. Bioavailability and Toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats. *Archives of Pharmacal Research*, v. 34, n. 1, p. 153–158, jan. 2011.
74. PARK, M. V. D. Z. et al. In vitro developmental toxicity test detects inhibition of stem cell differentiation by silica nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 240, n. 1, p. 108–116, 1 out. 2009.
75. PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. *Química Nova*, v. 33, p. 421–430, 2010.
76. PASTORINO, R. et al. Quality Assessment of Studies Published in Open Access and Subscription Journals: Results of a Systematic Evaluation. *PLoS ONE*, v. 11, n. 5, 11 maio 2016.
77. PIETROIUSTI, A.; CAMPAGNOLO, L.; FADEEL, B. Interactions of Engineered Nanoparticles with Organs Protected by Internal Biological Barriers. *Small*, v. 9, n. 9-10, p. 1557–1572, 2013.
78. POLLOCK, M.; FERNANDES, R. M.; HARTLING, L. Evaluation of AMSTAR to assess the methodological quality of systematic reviews in overviews of reviews of healthcare interventions. *BMC Medical Research Methodology*, v. 17, p. 48, 23 mar. 2017.
79. QUANG HUY TRAN AND VAN QUY NGUYEN AND ANH-TUAN LE. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, v. 4, n. 3, p. 033001, 2013.
80. RICH, D. Q. et al. Differences in Birth Weight Associated with the 2008 Beijing Olympics Air Pollution Reduction: Results from a Natural Experiment. *Environmental health perspectives*, v. 123, n. 9, p. 880, 2015.
81. SAHU, S. C. et al. Contribution of ionic silver to genotoxic potential of nanosilver in human liver HepG2 and colon Caco2 cells evaluated by the cytokinesis-block micronucleus assay. *Journal of applied toxicology: JAT*, v. 36, n. 4, p. 532–542, abr. 2016.
82. SÃO PAULO. Assembleia Legislativa. Projetos. Projeto de Lei 1456/2015. Regula-menta e torna obrigatória a rotulagem de produtos de nanotecnologia e de produtos que dela fazem uso. Disponível em: < <http://www.al.sp.gov.br/propositura/?id=1286924> > Acesso em 28 jun. 2016.
83. SAUNDERS, M. Transplacental transport of nanomaterials. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 1, n. 6, p. 671–684, 1 nov. 2009.
84. SECONDO, L. E.; LIU, N. J.; LEWINSKI, N. A. Methodological considerations when conducting in vitro, air–liquid interface exposures to engineered nanoparticle aerosols. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 47, n. 3, p. 225–262, 2017.

85. SHEA, B. J. et al. AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both. *BMJ*, v. 358, 21 set. 2017.
86. SHEA, B. J. et al. AMSTAR is a reliable and valid measurement tool to assess the methodological quality of systematic reviews. *Journal of Clinical Epidemiology*, v. 62, n. 10, p. 1013–1020, out. 2009.
87. SHEA, B. J. et al. Development of AMSTAR: a measurement tool to assess the methodological quality of systematic reviews. *BMC Medical Research Methodology*, v. 7, p. 10, 15 fev. 2007.
88. SIMAK, J.; PAOLI, S. D. The effects of nanomaterials on blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2017.
89. SOARES, T. Título: Efeito de nanopartículas de prata em neutrófilos humanos. Setembro/2014. 92 f. Dissertação do 2º ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Controlo de Qualidade. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Departamento de Ciências Químicas. Laboratório de Química Aplicada. Universidade do Porto, Cidade do Porto, Portugal, 2014.
90. SÖDERSTJERNA, E; et al. Gold- and Silver Nanoparticles Affect the Growth Characteristics of Human Embryonic Neural Precursor Cells. *PLoS ONE*. 8, 3, 1-13, Mar. 2013. ISSN: 19326203.
91. SOUSA NANJI, L. et al. [Analysis of the Cochrane Review: Interventions for Improving Upper Limb Function after Stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014,11:CD010820]. *Acta medica portuguesa*, v. 28, n. 5, p. 551—553, 2015.
92. SUNG, J. H. et al. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicological sciences*, v. 108, n. 2, p. 452–461, 2008.
93. TANG, J. et al. Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 9, n. 8, p. 4924–4932, ago. 2009.
94. TEIXEIRA, P. & VALLE, S. *Biossegurança: Uma abordagem Multidisciplinar*. Editora. FIOCRUZ. 1996. Rio de Janeiro.
95. TEUBNER, Gunther. *Direito, Sistema e Policontextualidade*. Apresentação: Dorothee Susanne Rüdiger. Introdução: Rodrigo Octávio Broglia Mendes. Piracicaba: Editora Unimep, 2005. 300 p. ISBN 85-85541-60-1.
96. THE PLOS MEDICINE EDITORS. The Impact Factor Game. *PLoS Medicine*, v. 3, n. 6, p. e291, 6 jun. 2006.

97. TURKEZ, H.; CELIK, K.; CAKMAK, B. Biosafety Evaluation of Nanoparticles in View of Genotoxicity and Carcinogenicity Studies: A Systematic Review. *Key Engineering Materials*, v. 543, p. 200–203, mar. 2013.
98. VANCE, M. E. et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, v. 6, n. 1, p. 1769–1780, 21 ago. 2015.
99. VASYUKOVA, I.; GUSEV, A.; TKACHEV, A. Reproductive toxicity of carbon nanomaterials: a review. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, v. 98, p. 012001, 6 nov. 2015.
100. WHATMORE, R. W. Nanotechnology--what is it? Should we be worried? *Occupational Medicine (Oxford, England)*, v. 56, n. 5, p. 295–299, ago. 2006.
101. WHITING, P. et al. ROBIS: A new tool to assess risk of bias in systematic reviews was developed. *Journal of Clinical Epidemiology*, v. 69, p. 225–234, jan. 2016.
102. WHO guidelines on protecting workers from potential risks of manufactured nanomaterials. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
103. WICK, P. et al. Human placenta: An efficient barrier for nanomaterials? *European Cells and Materials*, v. 20, n. 3, p. 270, 2010.
104. WIJNHOFEN, S.; PEIJNENBURG, W.; HERBERTS, C. NANO-SILVER—A REVIEW OF AVAILABLE DATA AND KNOWLEDGE GAPS IN HUMAN AND ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT. 2009.
105. XIA, X. R. et al. Mapping the Surface Adsorption Forces of Nanomaterials in Biological Systems. *ACS Nano*, v. 5, n. 11, p. 9074–9081, 22 nov. 2011.
106. XIA, X.-R.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; RIVIERE, J. E. An index for characterization of nanomaterials in biological systems. *Nature Nanotechnology*, v. 5, n. 9, p. 671–675, set. 2010.
107. XUE, Y. et al. Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice. *Journal of applied toxicology: JAT*, v. 32, n. 11, p. 890–899, nov. 2012.
108. YAN ADRIAN, S. C. et al. Potential Toxicity of Silver Nanoparticles (AgNP) to Human Placenta. v. 259, n. sS, p. S192–S192, 2016.
109. ZOLTOWSKI, A. P. C. et al. Methodological quality of systematic reviews in brazilian psychology journals quality of systematic reviews in psychology. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, v. 30, n. 1, p. 97–104, mar. 2014.

**APÊNDICE A – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DAS REVISÕES INCLUÍDAS
NO ESTUDO.**

1. AKTER, M. et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research*, 2 nov. 2017.
2. DEBIA, M. et al. A Systematic Review of Reported Exposure to Engineered Nanomaterials. *The Annals of Occupational Hygiene*, v. 60, n. 8, p. 916–935, 1 out. 2016.
3. FEWTRELL, L.; MAJURU, B.; HUNTER, P. R. A re-assessment of the safety of silver in household water treatment: rapid systematic review of mammalian in vivo genotoxicity studies. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, v. 16, n. 1, p. 66, 20 jun. 2017.
4. GULUMIAN, M. et al. Systematic Review of Screening and Surveillance Programs to Protect Workers from Nanomaterials. *PLOS ONE*, v. 11, n. 11, p. e0166071, 9 nov. 2016.
5. MAURER, L. L.; MEYER, J. N. A systematic review of evidence for silver nanoparticle-induced mitochondrial toxicity. *Environmental Science: Nano*, v. 3, n. 2, p. 311–322, 2016.
6. SECONDO, L. E.; LIU, N. J.; LEWINSKI, N. A. Methodological considerations when conducting in vitro, air–liquid interface exposures to engineered nanoparticle aerosols. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 47, n. 3, p. 225–262, 2017.
7. TURKEZ, H.; CELIK, K.; CAKMAK, B. Biosafety Evaluation of Nanoparticles in View of Genotoxicity and Carcinogenicity Studies: A Systematic Review. *Key Engineering Materials*, v. 543, p. 200–203, mar. 2013.

**APÊNDICE B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DAS REVISÕES EXCLUÍDAS
NO ESTUDO.**

1. BOCCUNI, F. et al. Measurement techniques of exposure to nanomaterials in the workplace for low- and medium-income countries: A systematic review. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 220, n. 7, p. 1089–1097, out. 2017.
2. EASTLAKE, A.; ZUMWALDE, R.; GERACI, C. Can control banding be useful for the safe handling of nanomaterials? A systematic review. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 18, n. 6, p. 169, 22 jun. 2016.
3. LIU, Y.; LI, H.; XIAO, K. Distribution and biological effects of nanoparticles in the reproductive system. *Current Drug Metabolism*, v. 17, n. 5, p. 478–496, 2016.
4. MAUDGALYA, T. et al. A critical appraisal of epidemiological studies investigating the effects of ultrafine particles on human health. *Human Factors and Ergonomics in Manufacturing*, v. 18, n. 3, p. 358–373, maio 2008.
5. MIHALACHE, R. et al. Occupational exposure limits for manufactured nanomaterials, a systematic review. *Nanotoxicology*, v. 11, n. 1, p. 7–19, 2017.
6. MYOJO, T.; NAGATA, T.; VERBEEK, J. The Effectiveness of Specific Risk Mitigation Techniques Used in the Production and Handling of Manufactured Nanomaterials: A Systematic Review. *Journal of UOEH*, v. 39, n. 3, p. 187–199, 2017.
7. SAHU, S. C. et al. Contribution of ionic silver to genotoxic potential of nanosilver in human liver HepG2 and colon Caco2 cells evaluated by the cytokinesis-block micronucleus assay. *Journal of applied toxicology: JAT*, v. 36, n. 4, p. 532–542, abr. 2016.
8. YAN ADRIAN, S. C. et al. Potential Toxicity of Silver Nanoparticles (AgNP) to Human Placenta. v. 259, n. sS, p. S192–S192, 2016.

**ANEXO A - AMSTAR 2: A CRITICAL APPRAISAL TOOL FOR SYSTEMATIC
REVIEWS THAT INCLUDE RANDOMISED OR NON-RANDOMISED STUDIES OF
HEALTHCARE INTERVENTIONS, OR BOTH.**



RESEARCH METHODS & REPORTING

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

The number of published systematic reviews of studies of healthcare interventions has increased rapidly and these are used extensively for clinical and policy decisions. Systematic reviews are subject to a range of biases and increasingly include non-randomised studies of interventions. It is important that users can distinguish high quality reviews. Many instruments have been designed to evaluate different aspects of reviews, but there are few comprehensive critical appraisal instruments. AMSTAR was developed to evaluate systematic reviews of randomised trials. In this paper, we report on the updating of AMSTAR and its adaptation to enable more detailed assessment of systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both. With moves to base more decisions on real world observational evidence we believe that AMSTAR 2 will assist decision makers in the identification of high quality systematic reviews, including those based on non-randomised studies of healthcare interventions.

Beverley J Shea *senior methodologist, clinical investigator, and adjunct professor*^{1,2,3}, Barnaby C Reeves *professor*⁴, George Wells *director and professor*^{2,5}, Mirene Thuku *research associate*², Candyce Hamel *senior clinical research associate*¹, Julian Moran *research student*⁶, David Moher *senior scientist, associate professor, and university research chair*^{1,2}, Peter Tugwell *senior scientist and professor*^{1,2,3,7}, Vivian Welch *clinical investigator and assistant professor*^{2,8}, Elizabeth Kristjansson *professor*⁹, David A Henry *professor and senior scientist*^{9,10,11}

¹Ottawa Hospital Research Institute, Clinical Epidemiology Program, Ottawa, Canada; ²Bruyère Research Institute, Ottawa, Canada; ³School of Epidemiology and Public Health, Faculty of Medicine, University of Ottawa, Ottawa, Canada; ⁴School of Clinical Science, University of Bristol, Bristol, UK; ⁵University of Ottawa Heart Institute, Ottawa, Canada; ⁶The Hospital for Sick Children, the Genetics and Genome Biology Program, Toronto, Canada; ⁷Department of Medicine, The Ottawa Hospital, Ottawa, Canada; ⁸Centre for Research in Educational and Community Services, School of Psychology, Faculty of Social Sciences, University of Ottawa, Ottawa, Canada; ⁹Centre for Research in Evidence-Based Practice, Bond University, Gold Coast, Australia; ¹⁰Dalla Lana School of Public Health, University of Toronto, Toronto, Canada; ¹¹Institute for Clinical Evaluative Sciences, Toronto, Canada

With the rapid increase in biomedical publishing, keeping up with primary research has become almost impossible for healthcare practitioners and policy makers.¹ Consequently, healthcare decision makers rely on systematic reviews as one of the key tools for achieving evidence-based healthcare.² Systematic reviews provide an opportunity to base decisions on accurate, succinct, credible, and comprehensive summaries of the best available evidence on a topic.³

Uncritically accepting the results of a single systematic review has risks. One of us (DM) led efforts to improve standards for reporting of systematic reviews, which led to the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) statement.⁴ The reporting guide for systematic

reviews of observational (non-randomised) studies is MOOSE (Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology).⁴ The quality of reporting of a systematic review may, however, more accurately reflect authors' ability to write in a comprehensible manner rather than the way they conducted their review. This underscores the need for guidelines that evaluate the way in which reviews are planned and conducted.^{5,6}

The Cochrane Collaboration Handbook provides a comprehensive guide for review authors, but it does not provide a concise critical appraisal instrument for completed reviews.⁷ Several instruments have been designed to evaluate individual studies that are being included in systematic reviews or how certain steps (eg, meta-analysis, testing for publication bias)

Correspondence to: B J Shea bevshe@ottawa.ca

For personal use only: all rights reserved. <http://www.bmj.com/permissions>

Subscribe: <http://www.bmj.com/subscribe>

Summary points

Systematic reviews of studies of healthcare interventions often (but not always) include non-randomised studies

AMSTAR is a popular instrument for critically appraising systematic reviews of randomised controlled clinical trials

AMSTAR underwent further development to enable appraisal of systematic reviews of randomised and nonrandomised studies of healthcare interventions

The revised instrument (AMSTAR 2) retains 10 of the original domains, has 16 items in total (compared with 11 in the original), has a simpler response categories than the original AMSTAR, includes a new comprehensive user guide, and has an overall rating based on weaknesses in critical domains

AMSTAR 2 is not intended to generate an overall score

With a view to base more decisions on real world observational evidence, AMSTAR 2 should assist in the identification of high quality systematic reviews

should be conducted.^{1,2} But relatively few instruments assess all important steps in the conduct of a review.^{3,4}

AMSTAR (A Measurement Tool to Assess systematic Reviews), published in 2007, is one of the most widely used instruments.^{5,6} AMSTAR was designed by us and our colleagues as a practical critical appraisal tool for use by health professionals and policy makers who do not necessarily have advanced training in epidemiology, to enable them to carry out rapid and reproducible assessments of the quality of conduct of systematic reviews of randomised controlled trials of interventions.⁵ Since publication, several critiques of the instrument have been published.⁷⁻¹¹ These critiques plus feedback received at workshops and developments in the science of systematic reviews pointed to a need to revise and update the original AMSTAR instrument.

Inclusion of non-randomised studies in systematic reviews

Almost half of published systematic reviews now include non-randomised studies of intervention effects.¹² There are many concerns about the conduct and reporting of systematic reviews of non-randomised studies.¹³⁻¹⁶ To summarise, non-randomised studies of healthcare interventions (an important focus of this revision of AMSTAR) are subject to a range of biases that are either not preventable or are less noticeable in randomised controlled trials, thus requiring different risk of bias assessments. Observational studies are increasingly conducted within large population databases, sometimes with hundreds of thousands or even millions of recipients of healthcare interventions. These generate precise estimates of intervention effects, which may be inaccurate because of residual biases. If these estimates are combined with those from the (generally smaller) randomised controlled trials, the meta-estimates will be weighted towards the observational study estimates. The original AMSTAR instrument did not include an assessment of the risk of bias in non-randomised studies included in a review, which is a key issue given the diversity of designs that such studies may use and the biases that may affect them.

Development of AMSTAR 2

The development and validation of the original AMSTAR instrument (published in 2007) has been described in detail elsewhere.^{5,6} Briefly, the original list of items was created from the results of a scoping review of the then available rating instruments. This review identified many overlapping appraisal items, mainly from two extensively cited reports.^{17,18} The list of items from these reports were combined and reduced by factor analysis. After pilot testing, items were reworded as needed and the reliability and usability of the tool was assessed. A modified version was validated externally and performed well against the global judgements of a panel of content experts.⁵ The

publications describing the original AMSTAR instrument were widely cited and the instrument has been used and critiqued extensively.^{19,20}

We convened an expert group, comprising authors of the original instrument, members with expertise in the conduct of non-randomised studies, development of appraisal instruments, biostatistics, and study designs. The expert group met for a day in Ottawa, Canada and members were presented with the results of updated literature reviews on relevant critical appraisal instruments, the results of surveys of AMSTAR users, recorded experience of participants in AMSTAR workshops at Cochrane Colloquiums in 2015 and 2016, feedback from the AMSTAR website (www.amstar.ca), and published critiques of the original instrument.⁸⁻¹¹ The perspective adopted by the expert group was to increase the value of AMSTAR as a broad critical appraisal instrument designed primarily for systematic reviews of studies of healthcare interventions. The expert group considered that revisions should address all aspects of the conduct of a systematic review, and the challenges of including non-randomised studies. They also thought the revised instrument should function as a teaching aid and as a concise checklist for those conducting reviews. The revisions were not intended to deal with the special requirements of diagnostic test reviews, individual patient data meta-analyses or network meta-analyses, scoping reviews, or realist reviews.^{21,22}

We used a nominal group technique to propose and then prioritise specific changes to the instrument and to agree on the draft wording of items. Based on their experience of the instrument and the presentations made at the meeting, participants were asked to record their ideas independently and privately. The ideas were then enumerated in a round-robin format. One idea was collected from everyone, in turn, and presented to the group by the facilitator. This process was continued until all ideas had been listed. Individuals then privately recorded their judgements and rankings. These were aggregated statistically to derive the group judgements. The following changes were agreed on (these are not listed in order of priority as all were considered important enough to mandate modifications to the instrument):

- Simplify the response categories
- Align the definition of research questions with the PICO (population, intervention, control group, outcome) framework
- Seek justification for the review authors' selection of different study designs (randomised and non-randomised) for inclusion in systematic reviews
- Seek more details on reasons for exclusion of studies from the review
- Determine whether the review authors had made a sufficiently detailed assessment of risk of bias for the included studies (whether randomised or non-randomised)

- Determine whether risk of bias with included studies was considered adequately during statistical pooling of results (if this was performed)
- Determine whether risk of bias with included studies was considered adequately when interpreting and discussing the review findings.

A description was formulated for each of the draft items. A small subgroup refined the wording of the items and assembled the draft instrument for testing. Initial pilot testing was performed by group members. Draft versions were presented at workshops held at the Cochrane Colloquium in 2015 and 2016, where feedback directed further modifications and refining of the instrument. The version of the instrument presented here was subject to inter-rater reliability and usability testing.

Comparison with the original instrument

The supplementary figure provides details of the new instrument (AMSTAR 2). Ten domains were retained from the original tool, with changes to the wording of items based on feedback about the original instrument and experience of testing drafts of the new instrument. Two domains were given more detailed coverage in AMSTAR 2 than in the original instrument: duplicate study selection and data extraction now have their own items (they were combined in the original tool). The possible influence of funding sources is now considered separately for individual studies included in the review and for the review itself. Previously they were combined in one item. We added more detailed and separate considerations of risk of bias for randomised and non-randomised studies. Both sub-items are based on content from the Cochrane risk of bias instruments for randomised and non-randomised (ROBINS-I) studies.^{41,42} One domain was removed—consideration of grey literature, previously a separate item, is now handled in the item on literature searching.

In total, four domains were added. Two of these came directly from the ROBINS-I tool—namely, elaboration of the PICO and the way in which risk of bias was handled during evidence synthesis.⁴³ One of the other new domains—discussion of possible causes and significance of heterogeneity—is an elaboration of content in the original AMSTAR tool. Another new domain—justification of selection of study designs—was part of the adaptation of AMSTAR to deal with non-randomised designs.

The domain specific questions in AMSTAR 2 are framed so that a “Yes” answer denotes a positive result. We removed the “not applicable” and “cannot answer” options in the original AMSTAR instrument because we believe that all domains are relevant to contemporary systematic reviews of healthcare interventions. If no information is provided to rate an item, the review authors should not be given the benefit of doubt and the item should be rated as a “No.” We have provided a “partial Yes” response in some instances where we considered it worthwhile to identify partial adherence to the standard.

Rationale for selection of items

Here we summarise our thinking behind the items in AMSTAR 2, which are numbered as in the instrument (see supplementary figure). Supplementary appendix 1 provides a more complete user's guide.

1. *Did the research questions and inclusion criteria for the review include the components of PICO?*

It is common practice to use the PICO description (population, intervention, control group, and outcome) as a consistent and easily memorised framework for a study question. Sometimes a timeframe should be added if this is critical in determining the likelihood of a study capturing relevant clinical outcomes (eg, an effect of the intervention is only expected after several years).

2. *Did the report of the review contain an explicit statement that the review methods were established prior to the conduct of the review and did the report justify any significant deviations from the protocol?*

Systematic reviews are a form of observational research, and the methods for the review should be agreed on before the review commences. Adherence to a well developed protocol reduces the risk of bias in the review. Authors should show that they worked with a written protocol with independent verification.

3. *Did the review authors explain their selection of the study designs for inclusion in the review?*

For some questions, for instance the effects of policy changes, or for ethical reasons, non-randomised studies may be the only studies addressing the review question. With an expansion of AMSTAR 2 to appraise reviews that include non-randomised controlled trials or non-randomised studies, or both, it is important that authors justify the inclusion of different study designs in systematic reviews. The authors should indicate that they followed a strategy. When both randomised and non-randomised studies address the same question about the effects of an intervention, we believe that authors should consider whether a review that is not limited to randomised controlled trials will give an incomplete summary of the important effects of a treatment.

4. *Did the review authors use a comprehensive literature search strategy?*

The importance of a adequate literature searching in systematic reviews is well established.⁴⁴ This item was carried over with minimal changes to the wording from the original instrument. We have made the response options clearer in AMSTAR 2 and provide more detailed guidance on completion of the item, particularly in relation to the identification of non-randomised studies (see supplementary appendix 1).

5. *Did the review authors perform study selection in duplicate?*

Best practice requires two review authors to determine eligibility of studies for inclusion in systematic reviews.⁴⁵ This involves checking the characteristics of a study against the elements of the research question. In the original AMSTAR, this item covered determining both study eligibility and data extraction. The expert group believed that they were sufficiently distinct processes to merit separate items in AMSTAR 2.

6. *Did the review authors perform data extraction in duplicate?*

The expert group recognised that data extraction might be more complex for non-randomised studies of healthcare interventions as it usually involves extraction of measures of treatment effects and other associations that have been adjusted for potential confounding, rather than raw outcome data from treated and control groups. A study report may present multiple treatment effects; judgment is therefore needed to select the one that conforms best to the PICO question and is at lowest risk from confounding.

7. *Did the review authors provide a list of included studies and justify the exclusions?*

In the revised instrument we consider excluded and included studies separately. Excluded studies should be accounted for fully by review authors, otherwise there is a risk that they remain invisible and the impact of their exclusion from the review is unknown.

8. Did the review authors describe the included studies in adequate detail?

The revised instrument requires review authors to provide detail about research designs, study populations, interventions, comparisons, and outcomes. The detail should be sufficient for appraisers to make a judgment about the extent to which the studies were appropriately chosen (in relation to the PICO) and whether the study populations and interventions were relevant to their questions. This information is needed to determine the extent to which the results of different studies should be combined, help explain heterogeneity, and assist those applying the results.

9. Did the review authors use a satisfactory technique for assessing the risk of bias (RoB) in individual studies that were included in the review?

Bias can be introduced at several stages in the design, planning, conduct, and analysis of a study. This item replaces a less detailed item on "scientific quality." The item specifies domains of bias for randomised and non-randomised studies that should have been considered by reviewers, based on the relevant Cochrane instruments.^{42,43} In AMSTAR 2 we ask whether the review authors made an adequate assessment of study level efforts to avoid, control, or adjust for baseline confounding, selection biases, bias in measurement of exposures and outcomes, and selective reporting of analyses or outcomes, or both. The guidance document (see supplementary appendix 1) and the ROBINS-I report provide more detail.⁴⁴ We decided not to include assessment of time varying confounding, performance biases, and biases due to missing data, although they are currently included in ROBINS-I.⁴⁵ This was because of the complex nature of techniques used to adjust for these potential sources of bias and the frequent lack of data (in contemporary primary studies) to enable assessment of these items. Version 2.0 of the Cochrane risk of bias instrument for randomised controlled trials is now available in draft form, and AMSTAR 2 will be aligned with this in the future.⁴⁶

10. Did the review authors report on the sources of funding for the studies included in the review?

We added a consideration of funding sources in the light of evidence from several sources that the results of industry funded studies sometimes favoured sponsored products, and that industry funded studies were less likely to be published than those that were independently funded.^{47,48} Such influences may not be detected as flaws in design or methods (item 9).

11. If meta-analysis was performed, did the review authors use appropriate methods for statistical combination of results?

This is a modified version of an item in the original instrument and is judged separately for randomised and non-randomised studies. Review authors should have stated explicitly in the review protocol the principles on which they based their decision to perform meta-analysis of data from the included studies. This includes the extent to which the studies are compatible (in terms of patients, controls, and interventions) and the value of a single pooled effect (for instance from several compatible but underpowered studies). Where reviewers consider it appropriate to conduct a meta-analysis, the inclusion of non-randomised studies increases the complexity of the analyses and may increase heterogeneity (see supplementary appendix 1).

12. If meta-analysis was performed, did the review authors assess the potential impact of RoB in individual studies on the results of the meta-analysis or other evidence synthesis?

This is a new item that requires reviewers to examine how results vary with inclusion or exclusion of primary studies judged to be at high risk of bias. In cases where review authors have chosen to include only high quality randomised controlled trials there may be little discussion of the potential impact of bias on the results. But where they have included randomised controlled trials of variable quality or non-randomised studies they should assess the impact of study level risk of bias on the results of the review.⁴⁹

13. Did the review authors account for RoB in primary studies when interpreting/discussing the results of the review?

This is a modification of an item from the original instrument. With a greater emphasis on assessing risk of bias, the expectation is that reviewers will make explicit reference to the potential impacts of risk of bias when interpreting and discussing the results of their review and in drawing conclusions or making recommendations.

14. Did the review authors provide a satisfactory explanation for, and discussion of, any heterogeneity observed in the results of the review?

This item is carried over with modified wording from the original instrument. It is important that reviewers investigate possible causes of heterogeneity, including variation in those elements included in the PICO framework (see item 1) and those arising from design and methodological considerations (see item 9). With the inclusion of non-randomised studies, variations in design and analysis may contribute to heterogeneity.

15. If they performed quantitative synthesis did the review authors carry out an adequate investigation of publication bias (small study bias) and discuss its likely impact on the results of the review?

This item is carried over from the original instrument but with modified wording. Publication bias is an important problem but it can be difficult for authors to resolve completely. Typically, statistical tests (several are available) or graphical displays are used and if the results are positive they indicate the presence of publication bias. Negative test results are not a guarantee of the absence of publication bias as they are insensitive. A minimum of 10 studies are required to show funnel plot asymmetry.⁵ The underlying tendency to selectively publish small positive studies may be compounded by the effects of lower methodological quality of small studies, a greater tendency to selectively report results, and increased clinical heterogeneity when conducted in patient subgroups.⁴⁴

16. Did the review authors report any potential sources of conflict of interest including any funding they received for conducting the review?

This item is carried over with modified wording from the original instrument and is now separate from consideration of funding of the primary studies included in the review (item 10). As with primary studies, review authors should report their funding sources.⁴⁴

Identification of critical domains

All steps in the conduct of a systematic review and meta-analysis are important, but we believe that seven domains can critically affect the validity of a review and its conclusions (box 1). Two of these concern risk of bias, whether it has been assessed adequately and how it can influence the results of a review. The prominence we give to risk of bias is because AMSTAR 2 is

going to be used to appraise many systematic reviews that include non-randomised studies.

We recognise that the items listed in box 1 will not always be regarded as critical; for example, risk of bias related items may be considered less important when a review is confined to high quality randomised or controlled trials. Other circumstances where the critical nature of items may be questioned are when a review team is using meta-analysis to summarise a known literature base (eg, the output from one or more established clinical trial collaborative groups). In this circumstance the adequacy of the literature search (item 4), listing of excluded studies (item 7), and possibility of publication bias (item 15) may not be considered critical. If a meta-analysis was not performed, the item covering the appropriateness of the meta-analytical methods (item 11) will not apply. However, it is important in this circumstance that appraisers are alert to the possible impact of risk of bias when review authors select individual studies to highlight in a narrative summary.

Flaws in the items that we have identified as critical may not be fatal if further information (eg, directly from the review authors) indicates that the original response option was wrong. This may provide reassurance about the review findings or enable an amendment of the review through additional analyses. We emphasise that our listing is a suggestion and appraisers may add or substitute other critical domains. For example, the failure to include non-randomised studies (item 3) in a review of adverse outcomes of treatment may be a critical flaw, as would the inability to explain large variations in treatment effects across a body of studies (item 14).

Applying AMSTAR 2 to systematic reviews

If one or more systematic reviews will be the basis of important practice and policy decisions we recommend that the appraisal team agree on how the AMSTAR 2 items should be applied. This includes the practice or policy context and the questions that should be addressed, based on the relevant PICO components. For example, available systematic reviews may have included studies with different comparators or different follow-up times, and their relevance to the policy relevant questions needs to be established. The likely sources of bias should also be agreed on. For instance, in observational studies of intervention effects, confounding by indication (or disease severity) may be problematic when interventions are reserved for certain subgroups of patients.⁵⁷ It is good practice to recruit new users of a technology or drug into studies to avoid prevalence bias.⁵⁸ If the start of one intervention tends to be delayed the choice of comparator may introduce immortal time bias.⁵⁹ Measurement errors can misclassify exposure and outcomes and may be unbalanced across comparison groups. Selective reporting among multiple analyses and outcomes may give an inaccurate measure of intervention effects.

Supplementary appendix 1 provides guidance on sections of AMSTAR 2. Some of the judgments (particularly whether review authors have adequately assessed risk of bias with individual non-randomised studies) are complex, and advice on both methodology and content may be needed. Clinical knowledge is so critical necessary to determine if the review authors have made an adequate assessment of the relevant PICO elements (item 1), and to identify potential confounders.

We strongly recommend that individual item ratings are not combined to create an overall score.⁶⁰ Rather, users should consider the potential impact of an inadequate rating for each item.

In box 2 we propose a scheme for interpreting weaknesses detected in critical and non-critical items. This is advisory and appraisers should decide which items are most important for the reviews under consideration.

Inter-rater reliability of AMSTAR 2

We measured inter-rater agreement with three pairs of raters and three sets of systematic reviews (see supplementary appendix 2). The first pair of raters was involved in the development of AMSTAR 2 (coauthors MT and CH). They individually appraised 20 systematic reviews derived from a rapid search (conducted in 2015 on the terms "systematic review" and "meta-analysis" in the title) using Google Scholar. From the first 200 we selected 20 systematic reviews of any healthcare intervention. The other two pairs of raters were experienced in the appraisal of systematic reviews and were not involved in the development of AMSTAR or AMSTAR 2. They applied AMSTAR 2 during their routine work, performing appraisals of systematic reviews of two topics: interventions to reduce medication errors (14 reviews) and non-pharmaceutical therapies for Parkinson's disease (20 reviews) (see references in supplementary appendix 2). In both cases systematic reviews had been identified through comprehensive literature searches (details available on request). All raters had access to the user guide (see supplementary appendix 1), applied the instrument individually, and did not try to achieve consensus. In total, six raters applied the instrument to 54 systematic reviews, of which 20 included only randomised controlled trials, 18 included only non-randomised studies of interventions, and 16 included a mixture of both designs.

Supplementary appendix 2 provides summaries of the κ scores for agreement between the three pairs of raters across the three sets of reviews. The values varied substantially across items and between pairs of raters. Most values were in an acceptable range, with 46 of the 50 κ scores falling in the range of moderate or better agreement and 30 displaying good or better agreement. There were no large differences between raters, and those who had been involved in the development of AMSTAR 2 did not have higher levels of agreement than the rater who was not involved. Items 9, 12, and 13 are concerned with measurement of risk of bias and how this is handled during discussion of the meta-analysis and interpretation of the results. The ranges of κ scores for these items were similar to those seen with other items in the instrument (see supplementary appendix 2). For items 9 and 11 the κ values for risk of bias judgments for randomised controlled trials were similar to those for non-randomised studies.

Usability of AMSTAR 2

The completion times for the 20 reviews used by reviewers 1 and 2 ranged from 15–32 minutes. These estimates do not include the time taken to read the reviews. This is almost twice the time taken to complete the original AMSTAR instrument (range 10–15 minutes), when it was applied to systematic reviews that were limited to randomised controlled trials.⁶ The comments from the reviewer included that the removal of the "can't answer" and "not applicable" response options in the original instrument forced them to make judgments; that it takes longer to evaluate the non-randomised and mixed study reviews, but this requires the reviewer to confront important methodological issues; that it was curious for review authors to mention the presence or absence of publication bias, but not provide any evidence; and that review authors would discuss their potential competing interests but not how they managed them.

Box 1 AMSTAR 2 critical domains

- Protocol registered before commencement of the review (item 2)
- Adequacy of the literature search (item 4)
- Justification for excluding individual studies (item 7)
- Risk of bias from individual studies being included in the review (item 8)
- Appropriateness of meta-analytical methods (item 11)
- Consideration of risk of bias when interpreting the results of the review (item 12)
- Assessment of presence and likely impact of publication bias (item 15)

Box 3 Rating overall confidence in the results of the review**High**

More than one non-critical weakness: the overall confidence in accurate and comprehensive summary of the results of the available studies that address the question of interest

Moderate

More than one non-critical weakness of the systematic review has more than one weakness but no critical flaws. It may provide an accurate summary of the results of the available studies that were included in the review

Low

One critical flaw with no other critical weaknesses: the evidence base is critical flawed may not provide an accurate and comprehensive summary of the available studies that address the question of interest

Critically low

More than one critical flaw with or without non-critical weaknesses: the evidence base has one or more critical flaws and should not be relied on to provide accurate and comprehensive summary of the available studies

Multiple non-critical weaknesses may diminish confidence in the review and it may be appropriate to move the overall appraisal down from moderate to low confidence

Discussion

AMSTAR 2 is a major revision of the original AMSTAR instrument, which was designed to appraise systematic reviews that included randomised controlled trials.^{33,34} The main modifications include simplified response categories; a more detailed consideration of risk of bias with included studies, and how this was handled by review authors in summarising and interpreting the results of their reviews; better alignment with the PRCO framework for research questions; a more detailed justification of selection of study designs for inclusion in a review; and more information on studies that were excluded from reviews. In addition, we emphasised defining critical domains before starting an appraisal of a systematic review. Identification of weak areas in these domains should determine confidence in the results of a systematic review.

We stress that responses to AMSTAR 2 items should not be used to derive an overall score.^{33,34} The original AMSTAR instrument was often used for this purpose and this was facilitated by the website (www.warrn.ca). We accept that an overall score may disguise critical weaknesses that should determine confidence in the results of a systematic review and we recommend that users adopt the rating process based on identification of critical domains (see box 2), or some variation based on these principles.⁸

We envisage that AMSTAR 2, like its predecessor, may have a role as a convenient teaching aid and as a brief check list for those conducting systematic reviews. However, we stress that the instrument does not explain in detail the logic and methods of conducting systematic reviews, and those looking for comprehensive advice should consult the Cochrane Handbook.⁵

The consideration of risk of bias in individual studies is equally important for randomised and non-randomised studies of healthcare interventions but is generally better understood with the former. Large non-randomised studies, often conducted in large administrative databases, are increasingly being used to assess the real world impact of a wide range of healthcare

technologies and practices. Although such studies often use sophisticated methods, residual confounding or failure to deal with other sources of bias may lead to inaccurate estimates of effect. Inclusion of large observational studies in meta-analyses may generate precise but biased estimates of intervention effects.³⁵

The items in AMSTAR 2 that deal with risk of bias identify domains specified in the Cochrane risk of bias instruments for randomised and non-randomised studies.^{33,34} These represent a consensus, in each case developed with input from more than 30 experts in methodology. However, AMSTAR 2 does not currently specify which risk of bias instruments review authors should have used to assess non-randomised studies included in a systematic review. The ROBINS-I instrument, which is the most comprehensive tool for non-randomised studies evaluating the effects of healthcare interventions, was released in 2016 and it is unrealistic to expect authors of reviews started before its release to have used it.³⁶ Presently, AMSTAR 2 leaves it to the review authors and those appraising the review to verify themselves that the risk of bias instrument used by review authors has sufficient discriminatory ability for the specified risk of bias domains. A review by Sanderson and colleagues identified 86 tools for assessing quality of observational studies, without a clear preference among them.³⁷ The authors pointed to the need to agree on critical domains for assessing susceptibility to bias in observational epidemiology. In part this review led to the development of ROBINS-4.³⁸ Popular appraisal instruments for individual studies, such as the Newcastle-Ottawa Scale and the Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN) checklist may not score on validity alone.^{39,40} The Newcastle-Ottawa Scale appears to lack sensitivity and is sometimes used to generate an overall score, something that is not recommended because it may disguise critical weaknesses in a review.⁴¹

AMSTAR 2, as a critical appraisal instrument for systematic reviews, joins several published instruments designed for this purpose.^{42,43} Two prominent examples are concerned with

guidelines for reporting systematic reviews, rather than their conduct.¹⁴ Two highly cited instruments were the basis for the development of the original AMSTAR tool.^{15,16} Two published instruments are direct derivatives of the original AMSTAR.^{16,17} Another publication includes a checklist used to appraise systematic reviews that are being included in an umbrella review.⁸ Overlap between the content of this checklist and the original AMSTAR is considerable.¹⁸

AMSTAR 2 provides a broad assessment of quality, including flaws that may have arisen through poor conduct of the review (with uncertain impact on findings). In this respect it differs from another instrument, the Risk Of Bias In Systematic reviews (ROBIS).¹⁹ ROBIS is a sophisticated three phase instrument that focuses specifically on the risk of bias introduced by the conduct of the review. It covers most types of research question, including diagnosis, prognosis, and aetiology. In contrast, AMSTAR 2 is intended to be used for reviews of healthcare interventions. Inevitably there is overlap in the items considered by ROBIS and AMSTAR 2; indeed, two investigators (BCR, BIS) were involved in the development of both.

In developing AMSTAR 2 we sought to maintain its familiar and popular stepwise checklist approach and augmented this by the addition and modification of items. AMSTAR 2 will be familiar to users of the original instrument, although more demanding to use for reasons discussed previously. Because AMSTAR 2 is structured around the key sequential steps in the conduct of a systematic review, it may be used as a brief teaching aid or as a checklist by those conducting systematic reviews.

Unlike the original instrument, AMSTAR 2 identifies critical weaknesses (see box 1) that should reduce confidence in the findings of a review, and it asks users to prioritise how this list will vary for the review topic. We understand that there will be debate about membership of this list and propose that users may wish to prioritise a different list of critical items for a specific PICO research question or setting.

We did not perform an extensive validation of the revised AMSTAR 2 tool. In its development, 10 domains were retained from the original validated tool, albeit with some wording changes based on feedback and extensive experience of using it. Two domains were given more detailed coverage: duplicate study selection and data extraction now have their own items (they were combined in the original tool); we have added more detailed, and separate, considerations of risk of bias for randomised and non-randomised studies. The sub-items were derived from widely used Cochrane instruments. One domain was removed; consideration of grey literature, previously a separate item, is now handled in the item on literature searching. In total, five domains were added. Two of these come directly from the ROBIS-I tool—namely, elaboration of PICO in the review and the way in which risk of bias was handled during evidence synthesis.¹⁹ One of the other new domains, discussion of possible causes and importance of heterogeneity, is elaboration of content in the original AMSTAR tool.¹⁵ The final domain, justification of selection of study designs, is justified by adapting AMSTAR to deal with non-randomised designs. We do not think this needs validation because we believe it is obvious that authors of systematic reviews should justify why they have included study designs that are more susceptible to bias.

The levels of agreement achieved by the three pairs of raters varied across items, but they were moderate to substantial for most items. Notably, the agreement between two raters involved in the development of AMSTAR 2 was no higher than that

achieved by experienced raters who had not been involved in development. We did not expect perfect agreement, and differences between raters reflect the demanding nature of some item level judgments and should prompt group discussion of their causes and importance, and, if needed, consultation with experts in subject matter and methods.

In developing AMSTAR 2 we relied heavily on the consensus of the expert panel, but we also received extensive feedback from users of the original instrument in the form of direct communications, website comments, and evaluations made at teaching workshops at Cochrane Colloquium. In the later phases of development of AMSTAR 2 we had access to, and discussed, recently published critiques of AMSTAR.^{16,21}

Our experience of creating and using the original AMSTAR instrument is that judgments need to be made and users may sometimes decide to make modifications to the instrument.^{15,16} We encourage investigators to provide feedback, and, if they adapt the instrument for particular settings, to report their experience at www.amstar.ca.

We thank for their assistance in the development of the AMSTAR critical appraisal instruments: Lex Bouey, Maarten Boer, Alvaro Casarico-Laina, Jeremy Githrow, Ranjeeta Mallick, Jordi Pardo-Pardo and Ludasa Shormauer, and for providing the eligibility studies reported in this manuscript: Brian Hilton, Pauline Barbeau, Fareeha Yardi, Wafa Basha, and Roxanne Werd.

Contributors: SJS, DAH, GW, and PT conceived the project. SJS and DAH oversee the project. SJS and DAH led the working group. All authors contributed to the development of AMSTAR 2 and to writing associated guidance. SJS, DAH, BCR, and PT led the drafting and redrafting of the manuscript. All other authors reviewed and commented on drafts of the manuscript. SJS and DAH are the guarantors.

Funding: This work was supported by an operating grant from the Canadian Institutes for Health Research (grant No MOP-130470). BCR is supported in part by the UK National Institute for Health Research Grant Central and Biomedical Research Unit.

Competing interests: All authors have completed the ICMJE uniformed disclosure form at http://www.icmje.org/online_disclosure.pdf and declare no support from any organisation for the submitted work; no financial relationships with any organisations that might have an interest in the submitted work in the previous three years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

Provenance and peer review: Not commissioned; externally peer reviewed.

1. Kessler H, Glasziou P, Chalmers J, Kennedy J. The Meta-analysis Systematic Review: An excellent review tool. *BMJ* 2012;345:f1002. doi:10.1136/bmj.f1002. [CrossRef] [PubMed]

2. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, et al. PRISMA 2015 reporting guideline: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses. *BMJ* 2015;349:g765. doi:10.1136/bmj.g765. [CrossRef] [PubMed]

3. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, et al. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *BMJ* 2007;335:w1088. doi:10.1136/bmj.w1088. [CrossRef] [PubMed]

4. Zhang D, Wells G, Moher D, et al. The impact of duplicate studies in systematic reviews: a protocol for a meta-analysis. *BMJ* 2012;345:f1002. doi:10.1136/bmj.f1002. [CrossRef] [PubMed]

5. Higgins JPT, Green S (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. Version 5.1.0 (updated March 2011). The Cochrane Collaboration, 2011. www.handbook.cochrane.org.

6. Cochrane Area Chairs P, Hayward S, Nassiri P, Altman DG. Process assessing the quality of the reporting of randomised controlled trials and observational studies: an international effort to improve quality in research. *J Clin Epidemiol* 2011;64:1041. doi:10.1016/j.jclinepi.2011.07.007. [CrossRef] [PubMed]

7. Whiting P, Moher D, Peterson J, et al. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. *BMJ* 2002;325:977. doi:10.1136/bmj.325.7236.977. [CrossRef] [PubMed]

8. Wang W, Chong C, Hill SL. Development of a quality assessment tool for systematic reviews of observational studies (QARS) of HIV prevention in the setting and with the involvement of stakeholders. *BMC Public Health* 2016;16:110. doi:10.1186/s12874-016-0307-0. [CrossRef] [PubMed]

RESEARCH METHODS & REPORTING

9. Verhaegh AK, de Vet HC, de Boer MA, et al. The Delphi list: a criteria list for quality assessment of systematic reviews of diagnostic test accuracy. *Ann Acad Med Singapore* 2008;37:371-83. doi:10.1177/0962280208319200
10. Dwan EM, Altman DG, Aronson JF, et al. Systematic review of randomised trials of acupuncture for chronic pain: protocol for a meta-analysis. *BMJ Open* 2013;7:e005411. doi:10.1136/bmjopen-2013-005411
11. Murray J, Poole J, Clarke DJ, et al. Designing evidence-based research from systematic reviews of health care. *The Cambridge Quality Checklist*. *J Adv Nurs* 2008;62:172-80. doi:10.1111/j.1365-2648.2007.04400.x
12. Trueman C, Hackett LK, Koo S, Clarke JH, Moore LK, de Vet HC. Rating the methodological quality of randomised controlled trials on the basis of reporting in a search protocol for the Cochrane Database. *Qual Life Res* 2012;26:663-71. doi:10.1007/s11136-011-9980-9
13. Moola S, Anderson N, Towse A, Nijman R, Moher D. Reliability of clinical trials to assess quality in meta-analyses or (re)analyses of randomised controlled trials. *Ann Acad Med Singapore* 2012;41:104-7. doi:10.1177/0962280211419028
14. Thompson J, Altman DG, Berlin JA, et al. A proposed standard for reporting of meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2003;327:1633-6. doi:10.1136/bmj.327.7424.1633
15. Deris JJ, Altman DG, Hoozemans MJ. Statistical methods for meta-analysis: heterogeneity and confidence intervals. *Stat Med* 2002;21:155-74. doi:10.1002/sim.1000
16. Deris JJ, Altman DG, Hoozemans MJ, Clarke JH, Clarke JH. Meta-analysis of randomised controlled trials. *N Engl J Med* 2007;356:867-77. doi:10.1056/NEJM.2007.08.20.035677
17. Clarke JH, Altman DG. Methods of analysis of randomised trials in meta-analysis and systematic reviews. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
18. Clarke JH, Altman DG, Viera J, et al. Inconsistency in meta-analyses: measurement, interpretation, and reporting. *Ann Intern Med* 2002;137:122-30. doi:10.7326/0000-9239-137-2-20020701-00005
19. Wang J, Stewart J, Higgins JP, et al. Heterogeneity, inconsistency, inconsistency, and inconsistency in systematic reviews: development of Cochrane Reviewers' Risk of Bias (RoB) tool for randomised trials of quality of systematic reviews. *BMJ* 2011;343:e7523. doi:10.1136/bmj.e7523
20. Song F, Eastwood JM, Ho VA, et al. Development of AMSTAR: a revised instrument to assess the methodological quality of systematic reviews. *BMJ* 2011;343:e7523. doi:10.1136/bmj.e7523
21. Song F, Ho VA, Eastwood JM, et al. AMSTAR: a revised instrument to assess the methodological quality of systematic reviews. *J Clin Epidemiol* 2012;65:960-73. doi:10.1016/j.jclinepi.2012.03.010
22. Song F, Ho VA, Eastwood JM, et al. AMSTAR: a revised instrument to assess the methodological quality of systematic reviews. *J Clin Epidemiol* 2012;65:960-73. doi:10.1016/j.jclinepi.2012.03.010
23. Song F, Ho VA, Eastwood JM, et al. AMSTAR: a revised instrument to assess the methodological quality of systematic reviews. *J Clin Epidemiol* 2012;65:960-73. doi:10.1016/j.jclinepi.2012.03.010
24. Song F, Ho VA, Eastwood JM, et al. AMSTAR: a revised instrument to assess the methodological quality of systematic reviews. *J Clin Epidemiol* 2012;65:960-73. doi:10.1016/j.jclinepi.2012.03.010
25. King J, Chappell R, Clarke DJ, et al. From systematic reviews to clinical recommendations for evidence-based practice: the role of meta-analysis. *Qual Life Res* 2012;26:1123-30. doi:10.1007/s11136-011-9980-9
26. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
27. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
28. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
29. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
30. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
31. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
32. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
33. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
34. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
35. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
36. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
37. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
38. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
39. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
40. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
41. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
42. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
43. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
44. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
45. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
46. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
47. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
48. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
49. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112
50. Page P, Haidich A, Pantazis N, et al. Evidence of bias and inconsistency in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 2002;325:112-27. doi:10.1136/bmj.325.7382.112

Accepted: 04 09 2017

Publicly available: Published online first. For permission to reuse (beyond strict copyright) please go to <http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

ANEXO B – FERRAMENTA AMSTAR 2

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

1. Did the research questions and inclusion criteria for the review include the components of PICO?		
For Yes:	Optional (recommended)	
<input type="checkbox"/> Population	<input type="checkbox"/> Timeframe for follow-up	<input type="checkbox"/> Yes
<input type="checkbox"/> Intervention		<input type="checkbox"/> No
<input type="checkbox"/> Comparator group		
<input type="checkbox"/> Outcome		
2. Did the report of the review contain an explicit statement that the review methods were established prior to the conduct of the review and did the report justify any significant deviations from the protocol?		
For Partial Yes: The authors state that they had a written protocol or guide that included ALL the following:	For Yes: As for partial yes, plus the protocol should be registered and should also have specified:	
<input type="checkbox"/> review question(s)	<input type="checkbox"/> a meta-analysis/synthesis plan, if appropriate, <i>and</i>	<input type="checkbox"/> Yes
<input type="checkbox"/> a search strategy	<input type="checkbox"/> a plan for investigating causes of heterogeneity	<input type="checkbox"/> Partial Yes
<input type="checkbox"/> inclusion/exclusion criteria	<input type="checkbox"/> justification for any deviations from the protocol	<input type="checkbox"/> No
<input type="checkbox"/> a risk of bias assessment		
3. Did the review authors explain their selection of the study designs for inclusion in the review?		
For Yes, the review should satisfy ONE of the following:		
<input type="checkbox"/> Explanation for including only RCTs		<input type="checkbox"/> Yes
<input type="checkbox"/> OR Explanation for including only NRSI		<input type="checkbox"/> No
<input type="checkbox"/> OR Explanation for including both RCTs and NRSI		
4. Did the review authors use a comprehensive literature search strategy?		
For Partial Yes (all the following):	For Yes, should also have (all the following):	
<input type="checkbox"/> searched at least 2 databases (relevant to research question)	<input type="checkbox"/> searched the reference lists / bibliographies of included studies	<input type="checkbox"/> Yes
<input type="checkbox"/> provided key word and/or search strategy	<input type="checkbox"/> searched trial/study registries	<input type="checkbox"/> Partial Yes
<input type="checkbox"/> justified publication restrictions (e.g. language)	<input type="checkbox"/> included/consulted content experts in the field	<input type="checkbox"/> No
	<input type="checkbox"/> where relevant, searched for grey literature	
	<input type="checkbox"/> conducted search within 24 months of completion of the review	
5. Did the review authors perform study selection in duplicate?		
For Yes, either ONE of the following:		
<input type="checkbox"/> at least two reviewers independently agreed on selection of eligible studies and achieved consensus on which studies to include		<input type="checkbox"/> Yes
<input type="checkbox"/> OR two reviewers selected a sample of eligible studies <u>and</u> achieved good agreement (at least 80 percent), with the remainder selected by one reviewer.		<input type="checkbox"/> No

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>6. Did the review authors perform data extraction in duplicate?</p>		
<p>For Yes, either ONE of the following:</p>		
<input type="checkbox"/> at least two reviewers achieved consensus on which data to extract from included studies	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
<input type="checkbox"/> OR two reviewers extracted data from a sample of eligible studies and achieved good agreement (at least 80 percent), with the remainder extracted by one reviewer.		
<p>7. Did the review authors provide a list of excluded studies and justify the exclusions?</p>		
<p>For Partial Yes:</p> <input type="checkbox"/> provided a list of all potentially relevant studies that were read in full-text form but excluded from the review	<p>For Yes, must also have:</p> <input type="checkbox"/> Justified the exclusion from the review of each potentially relevant study	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> Partial Yes <input type="checkbox"/> No
<p>8. Did the review authors describe the included studies in adequate detail?</p>		
<p>For Partial Yes (ALL the following):</p> <input type="checkbox"/> described populations <input type="checkbox"/> described interventions <input type="checkbox"/> described comparators <input type="checkbox"/> described outcomes <input type="checkbox"/> described research designs	<p>For Yes, should also have ALL the following:</p> <input type="checkbox"/> described population in detail <input type="checkbox"/> described intervention in detail (including doses where relevant) <input type="checkbox"/> described comparator in detail (including doses where relevant) <input type="checkbox"/> described study's setting <input type="checkbox"/> timeframe for follow-up	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> Partial Yes <input type="checkbox"/> No
<p>9. Did the review authors use a satisfactory technique for assessing the risk of bias (RoB) in individual studies that were included in the review?</p>		
<p>RCT: For Partial Yes, must have assessed RoB from</p> <input type="checkbox"/> unconcealed allocation, and <input type="checkbox"/> lack of blinding of patients and assessors when assessing outcomes (unnecessary for objective outcomes such as all-cause mortality)	<p>For Yes, must also have assessed RoB from:</p> <input type="checkbox"/> allocation sequence that was not truly random, and <input type="checkbox"/> selection of the reported result from among multiple measurements or analyses of a specified outcome	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> Partial Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Includes only NRSI
<p>NRSI For Partial Yes, must have assessed RoB:</p> <input type="checkbox"/> from confounding, and <input type="checkbox"/> from selection bias	<p>For Yes, must also have assessed RoB:</p> <input type="checkbox"/> methods used to ascertain exposures and outcomes, and <input type="checkbox"/> selection of the reported result from among multiple measurements or analyses of a specified outcome	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> Partial Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Includes only RCTs
<p>10. Did the review authors report on the sources of funding for the studies included in the review?</p>		
<p>For Yes</p> <input type="checkbox"/> Must have reported on the sources of funding for individual studies included in the review. Note: Reporting that the reviewers looked for this information but it was not reported by study authors also qualifies		<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>11. If meta-analysis was performed did the review authors use appropriate methods for statistical combination of results?</p>	
<p>RCT: For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> The authors justified combining the data in a meta-analysis <input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> AND they used an appropriate weighted technique to combine study results and adjusted for heterogeneity if present. <input type="checkbox"/> No</p> <p><input type="checkbox"/> AND investigated the causes of any heterogeneity <input type="checkbox"/> No meta-analysis conducted</p>	
<p>For NRSI For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> The authors justified combining the data in a meta-analysis <input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> AND they used an appropriate weighted technique to combine study results, adjusting for heterogeneity if present <input type="checkbox"/> No</p> <p><input type="checkbox"/> AND they statistically combined effect estimates from NRSI that were adjusted for confounding, rather than combining raw data, or justified combining raw data when adjusted effect estimates were not available <input type="checkbox"/> No meta-analysis conducted</p> <p><input type="checkbox"/> AND they reported separate summary estimates for RCTs and NRSI separately when both were included in the review</p>	
<p>12. If meta-analysis was performed, did the review authors assess the potential impact of RoB in individual studies on the results of the meta-analysis or other evidence synthesis?</p>	
<p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> included only low risk of bias RCTs <input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> OR, if the pooled estimate was based on RCTs and/or NRSI at variable RoB, the authors performed analyses to investigate possible impact of RoB on summary estimates of effect. <input type="checkbox"/> No</p> <p style="text-align: right;"><input type="checkbox"/> No meta-analysis conducted</p>	
<p>13. Did the review authors account for RoB in individual studies when interpreting/ discussing the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> included only low risk of bias RCTs <input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> OR, if RCTs with moderate or high RoB, or NRSI were included the review provided a discussion of the likely impact of RoB on the results <input type="checkbox"/> No</p>	
<p>14. Did the review authors provide a satisfactory explanation for, and discussion of, any heterogeneity observed in the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> There was no significant heterogeneity in the results <input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> OR if heterogeneity was present the authors performed an investigation of sources of any heterogeneity in the results and discussed the impact of this on the results of the review <input type="checkbox"/> No</p>	
<p>15. If they performed quantitative synthesis did the review authors carry out an adequate investigation of publication bias (small study bias) and discuss its likely impact on the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> performed graphical or statistical tests for publication bias and discussed the likelihood and magnitude of impact of publication bias <input type="checkbox"/> Yes</p> <p style="text-align: right;"><input type="checkbox"/> No</p> <p style="text-align: right;"><input type="checkbox"/> No meta-analysis conducted</p>	

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

16. Did the review authors report any potential sources of conflict of interest, including any funding they received for conducting the review?	
For Yes:	
<input type="checkbox"/> The authors reported no competing interests OR	<input type="checkbox"/> Yes
<input type="checkbox"/> The authors described their funding sources and how they managed potential conflicts of interest	<input type="checkbox"/> No

To cite this tool: Shea BJ, Reeves BC, Wells G, Thuku M, Hamel C, Moran J, Moher D, Tugwell P, Welch V, Kristjansson E, Henry DA. AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both. *BMJ*. 2017 Sep 21;358:j4008.

**ANEXO C – FERRAMENTA AMSTAR 2. *CHECKLIST* DAS REVISÕES
INCLUÍDAS.**

Artigo 1

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>1. Did the research questions and inclusion criteria for the review include the components of PICO?</p>		
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Population <input type="checkbox"/> Intervention <input type="checkbox"/> Comparator group <input type="checkbox"/> Outcome 	<p>Optional (recommended)</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Timeframe for follow-up 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No
<p>2. Did the report of the review contain an explicit statement that the review methods were established prior to the conduct of the review and did the report justify any significant deviations from the protocol?</p>		
<p>For Partial Yes: The authors state that they had a written protocol or guide that included ALL the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> review question(s) <input checked="" type="checkbox"/> a search strategy <input checked="" type="checkbox"/> inclusion/exclusion criteria <input type="checkbox"/> a risk of bias assessment 	<p>For Yes: As for partial yes, plus the protocol should be registered and should also have specified:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> a meta-analysis/synthesis plan, if appropriate, and <input type="checkbox"/> a plan for investigating causes of heterogeneity <input type="checkbox"/> justification for any deviations from the protocol 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> Partial Yes <input checked="" type="checkbox"/> No
<p>3. Did the review authors explain their selection of the study designs for inclusion in the review?</p>		
<p>For Yes, the review should satisfy ONE of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Explanation for including only RCTs <input type="checkbox"/> OR Explanation for including only NRSI <input type="checkbox"/> OR Explanation for including both RCTs and NRSI 		<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No
<p>4. Did the review authors use a comprehensive literature search strategy?</p>		
<p>For Partial Yes (all the following):</p> <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> searched at least 2 databases (relevant to research question) <input checked="" type="checkbox"/> provided key word and/or search strategy <input checked="" type="checkbox"/> justified publication restrictions (e.g. language) 	<p>For Yes, should also have (all the following):</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> searched the reference lists / bibliographies of included studies <input type="checkbox"/> searched trial/study registries <input type="checkbox"/> included/consulted content experts in the field <input type="checkbox"/> where relevant, searched for grey literature <input type="checkbox"/> conducted search within 24 months of completion of the review 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> Partial Yes <input type="checkbox"/> No
<p>5. Did the review authors perform study selection in duplicate?</p>		
<p>For Yes, either ONE of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> at least two reviewers independently agreed on selection of eligible studies and achieved consensus on which studies to include <input type="checkbox"/> OR two reviewers selected a sample of eligible studies and achieved good agreement (at least 80 percent), with the remainder selected by one reviewer. 		<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>6. Did the review authors perform data extraction in duplicate?</p> <p>For Yes, either ONE of the following:</p> <p><input type="checkbox"/> at least two reviewers achieved consensus on which data to extract from included studies</p> <p><input type="checkbox"/> OR two reviewers extracted data from a sample of eligible studies and achieved good agreement (at least 80 percent), with the remainder extracted by one reviewer.</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>
<p>7. Did the review authors provide a list of excluded studies and justify the exclusions?</p> <p>For Partial Yes:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> provided a list of all potentially relevant studies that were read in full-text form but excluded from the review</p> <p>For Yes, must also have:</p> <p><input type="checkbox"/> Justified the exclusion from the review of each potentially relevant study</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p>
<p>8. Did the review authors describe the included studies in adequate detail?</p> <p>For Partial Yes (ALL the following):</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described populations</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described interventions</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described comparators</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described outcomes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described research designs</p> <p>For Yes, should also have ALL the following:</p> <p><input type="checkbox"/> described population in detail</p> <p><input type="checkbox"/> described intervention in detail (including doses where relevant)</p> <p><input type="checkbox"/> described comparator in detail (including doses where relevant)</p> <p><input type="checkbox"/> described study's setting</p> <p><input type="checkbox"/> timeframe for follow-up</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p>
<p>9. Did the review authors use a satisfactory technique for assessing the risk of bias (RoB) in individual studies that were included in the review?</p> <p>RCTs</p> <p>For Partial Yes, must have assessed RoB from:</p> <p><input type="checkbox"/> uncontrolled allocation, and</p> <p><input type="checkbox"/> lack of blinding of patients and assessors when assessing outcomes (unnecessary for objective outcomes such as all-cause mortality)</p> <p>For Yes, must also have assessed RoB from:</p> <p><input type="checkbox"/> allocation sequence that was not truly random, and</p> <p><input type="checkbox"/> selection of the reported result from among multiple measurements or analyses of a specified outcome</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p> <p><input type="checkbox"/> Includes only NRSI</p>
<p>NRSI</p> <p>For Partial Yes, must have assessed RoB:</p> <p><input type="checkbox"/> from confounding, and</p> <p><input type="checkbox"/> from selection bias</p> <p>For Yes, must also have assessed RoB:</p> <p><input type="checkbox"/> methods used to ascertain exposures and outcomes, and</p> <p><input type="checkbox"/> selection of the reported result from among multiple measurements or analyses of a specified outcome</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p> <p><input type="checkbox"/> Includes only RCTs</p>
<p>10. Did the review authors report on the sources of funding for the studies included in the review?</p> <p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> Must have reported on the sources of funding for individual studies included in the review. Note: Reporting that the reviewers looked for this information but it was not reported by study authors also qualifies</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

11. If meta-analysis was performed did the review authors use appropriate methods for statistical combination of results?	
RCTs	
For Yes:	
<input type="checkbox"/> The authors justified combining the data in a meta-analysis	<input type="checkbox"/> Yes
<input type="checkbox"/> AND they used an appropriate weighted technique to combine study results and adjusted for heterogeneity if present	<input type="checkbox"/> No
<input type="checkbox"/> AND investigated the causes of any heterogeneity	<input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted
For NRSI	
For Yes:	
<input type="checkbox"/> The authors justified combining the data in a meta-analysis	<input type="checkbox"/> Yes
<input type="checkbox"/> AND they used an appropriate weighted technique to combine study results, adjusting for heterogeneity if present	<input type="checkbox"/> No
<input type="checkbox"/> AND they statistically combined effect estimates from NRSI that were adjusted for confounding, rather than combining raw data, or justified combining raw data when adjusted effect estimates were not available	<input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted
<input type="checkbox"/> AND they reported separate summary estimates for RCTs and NRSI separately when both were included in the review	
12. If meta-analysis was performed, did the review authors assess the potential impact of RoB in individual studies on the results of the meta-analysis or other evidence synthesis?	
For Yes:	
<input type="checkbox"/> included only low risk of bias RCTs	<input type="checkbox"/> Yes
<input type="checkbox"/> OR, if the pooled estimate was based on RCTs and/or NRSI at variable RoB, the authors performed analyses to investigate possible impact of RoB on summary estimates of effect.	<input type="checkbox"/> No
	<input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted
13. Did the review authors account for RoB in individual studies when interpreting/ discussing the results of the review?	
For Yes:	
<input type="checkbox"/> included only low risk of bias RCTs	<input type="checkbox"/> Yes
<input type="checkbox"/> OR, if RCTs with moderate or high RoB, or NRSI were included the review provided a discussion of the likely impact of RoB on the results	<input checked="" type="checkbox"/> No
14. Did the review authors provide a satisfactory explanation for, and discussion of, any heterogeneity observed in the results of the review?	
For Yes:	
<input type="checkbox"/> There was no significant heterogeneity in the results	<input checked="" type="checkbox"/> Yes
<input checked="" type="checkbox"/> OR if heterogeneity was present the authors performed an investigation of sources of any heterogeneity in the results and discussed the impact of this on the results of the review	<input type="checkbox"/> No
15. If they performed quantitative synthesis did the review authors carry out an adequate investigation of publication bias (small study bias) and discuss its likely impact on the results of the review?	
For Yes:	
<input type="checkbox"/> performed graphical or statistical tests for publication bias and discussed the likelihood and magnitude of impact of publication bias	<input type="checkbox"/> Yes
	<input type="checkbox"/> No
	<input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

16. Did the review authors report any potential sources of conflict of interest, including any funding they received for conducting the review?	
For Yes:	
<input checked="" type="checkbox"/> The authors reported no competing interests OR	<input checked="" type="checkbox"/> Yes
<input type="checkbox"/> The authors described their funding sources and how they managed potential conflicts of interest	<input type="checkbox"/> No

To cite this tool: Shea BJ, Reeves BC, Wells G, Thuku M, Hamel C, Moran J, Moher D, Tugwell P, Welch V, Kristjansson E, Henry DA. AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both. *BMJ*. 2017 Sep 21;358:j4008.

Artigo 2

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

1. Did the research questions and inclusion criteria for the review include the components of PICO?		
For Yes:	Optional (recommended)	
<input type="checkbox"/> Population	<input type="checkbox"/> Timeframe for follow-up	<input type="checkbox"/> Yes
<input type="checkbox"/> Intervention		<input checked="" type="checkbox"/> No
<input type="checkbox"/> Comparator group		
<input type="checkbox"/> Outcome		
2. Did the report of the review contain an explicit statement that the review methods were established prior to the conduct of the review and did the report justify any significant deviations from the protocol?		
For Partial Yes: The authors state that they had a written protocol or guide that included ALL the following:	For Yes: As for partial yes, plus the protocol should be registered and should also have specified:	
<input checked="" type="checkbox"/> review question(s)	<input type="checkbox"/> a meta-analysis/synthesis plan, if appropriate, and	<input type="checkbox"/> Yes
<input checked="" type="checkbox"/> a search strategy	<input type="checkbox"/> a plan for investigating causes of heterogeneity	<input type="checkbox"/> Partial Yes
<input checked="" type="checkbox"/> inclusion/exclusion criteria	<input type="checkbox"/> justification for any deviations from the protocol	<input checked="" type="checkbox"/> No
<input type="checkbox"/> a risk of bias assessment		
3. Did the review authors explain their selection of the study designs for inclusion in the review?		
For Yes, the review should satisfy ONE of the following:		
<input type="checkbox"/> Explanation for including only RCTs		<input type="checkbox"/> Yes
<input type="checkbox"/> OR Explanation for including only NRSI		<input checked="" type="checkbox"/> No
<input type="checkbox"/> OR Explanation for including both RCTs and NRSI		
4. Did the review authors use a comprehensive literature search strategy?		
For Partial Yes (all the following):	For Yes, should also have (all the following):	
<input type="checkbox"/> searched at least 2 databases (relevant to research question)	<input type="checkbox"/> searched the reference lists / bibliographies of included studies	<input type="checkbox"/> Yes
<input type="checkbox"/> provided key word and/or search strategy	<input type="checkbox"/> searched trial/study registries	<input type="checkbox"/> Partial Yes
<input type="checkbox"/> justified publication restrictions (e.g. language)	<input type="checkbox"/> included/consulted content experts in the field	<input checked="" type="checkbox"/> No
	<input type="checkbox"/> where relevant, searched for grey literature	
	<input type="checkbox"/> conducted search within 24 months of completion of the review	
5. Did the review authors perform study selection in duplicate?		
For Yes, either ONE of the following:		
<input type="checkbox"/> at least two reviewers independently agreed on selection of eligible studies and achieved consensus on which studies to include		<input type="checkbox"/> Yes
<input type="checkbox"/> OR two reviewers selected a sample of eligible studies and achieved good agreement (at least 80 percent), with the remainder selected by one reviewer.		<input checked="" type="checkbox"/> No

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>6. Did the review authors perform data extraction in duplicate?</p> <p>For Yes, either ONE of the following:</p> <p><input type="checkbox"/> at least two reviewers achieved consensus on which data to extract from included studies</p> <p><input type="checkbox"/> OR two reviewers extracted data from a sample of eligible studies and achieved good agreement (at least 80 percent), with the remainder extracted by one reviewer.</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>
<p>7. Did the review authors provide a list of excluded studies and justify the exclusions?</p> <p>For Partial Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> provided a list of all potentially relevant studies that were read in full-text form but excluded from the review</p>			<p>For Yes, must also have:</p> <p><input type="checkbox"/> Justified the exclusion from the review of each potentially relevant study</p> <p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>
<p>8. Did the review authors describe the included studies in adequate detail?</p> <p>For Partial Yes (ALL the following):</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described nonulations</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described interventions</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described comparators</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described outcomes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described research designs</p>			<p>For Yes, should also have ALL the following:</p> <p><input type="checkbox"/> described nonulation in detail</p> <p><input type="checkbox"/> described intervention in detail (including doses where relevant)</p> <p><input type="checkbox"/> described comparator in detail (including doses where relevant)</p> <p><input type="checkbox"/> described study's setting</p> <p><input type="checkbox"/> timeframe for follow-up</p> <p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p>
<p>9. Did the review authors use a satisfactory technique for assessing the risk of bias (RoB) in individual studies that were included in the review?</p> <p>RCTs</p> <p>For Partial Yes, must have assessed RoB from:</p> <p><input type="checkbox"/> unconscealed allocation, and</p> <p><input type="checkbox"/> lack of blinding of patients and assessors when assessing outcomes (unnecessary for objective outcomes such as all-cause mortality)</p>			<p>For Yes, must also have assessed RoB from:</p> <p><input type="checkbox"/> allocation sequence that was not truly random, and</p> <p><input type="checkbox"/> selection of the reported result from among multiple measurements or analyses of a specified outcome</p> <p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p> <p><input type="checkbox"/> Includes only NRSI</p>
<p>NRSI</p> <p>For Partial Yes, must have assessed RoB:</p> <p><input type="checkbox"/> from confounding, and</p> <p><input type="checkbox"/> from selection bias</p>			<p>For Yes, must also have assessed RoB:</p> <p><input type="checkbox"/> methods used to ascertain exposures and outcomes, and</p> <p><input type="checkbox"/> selection of the reported result from among multiple measurements or analyses of a specified outcome</p> <p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p> <p><input type="checkbox"/> Includes only RCTs</p>
<p>10. Did the review authors report on the sources of funding for the studies included in the review?</p> <p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> Must have reported on the sources of funding for individual studies included in the review. Note: Reporting that the reviewers looked for this information but it was not reported by study authors also qualifies</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>11. If meta-analysis was performed did the review authors use appropriate methods for statistical combination of results?</p>	
<p>RCTs For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> The authors justified combining the data in a meta-analysis <input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> AND they used an appropriate weighted technique to combine study results and adjusted for heterogeneity if present. <input type="checkbox"/> No</p> <p><input type="checkbox"/> AND investigated the causes of any heterogeneity <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted</p>	
<p>For NRSI For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> The authors justified combining the data in a meta-analysis <input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> AND they used an appropriate weighted technique to combine study results, adjusting for heterogeneity if present. <input type="checkbox"/> No</p> <p><input type="checkbox"/> AND they statistically combined effect estimates from NRSI that were adjusted for confounding, rather than combining raw data, or justified combining raw data when adjusted effect estimates were not available. <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted</p> <p><input type="checkbox"/> AND they reported separate summary estimates for RCTs and NRSI separately when both were included in the review</p>	
<p>12. If meta-analysis was performed, did the review authors assess the potential impact of RoB in individual studies on the results of the meta-analysis or other evidence synthesis?</p>	
<p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> included only low risk of bias RCTs <input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> OR, if the pooled estimate was based on RCTs and/or NRSI at variable RoB, the authors performed analyses to investigate possible impact of RoB on summary estimates of effect. <input type="checkbox"/> No</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted</p>	
<p>13. Did the review authors account for RoB in individual studies when interpreting/ discussing the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> included only low risk of bias RCTs <input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> OR, if RCTs with moderate or high RoB, or NRSI were included the review provided a discussion of the likely impact of RoB on the results <input checked="" type="checkbox"/> No</p>	
<p>14. Did the review authors provide a satisfactory explanation for, and discussion of, any heterogeneity observed in the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> There was no significant heterogeneity in the results <input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> OR if heterogeneity was present the authors performed an investigation of sources of any heterogeneity in the results and discussed the impact of this on the results of the review <input checked="" type="checkbox"/> No</p>	
<p>15. If they performed quantitative synthesis did the review authors carry out an adequate investigation of publication bias (small study bias) and discuss its likely impact on the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> performed graphical or statistical tests for publication bias and discussed the likelihood and magnitude of impact of publication bias <input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted <input type="checkbox"/> No</p>	

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

16. Did the review authors report any potential sources of conflict of interest, including any funding they received for conducting the review?

For Yes:

- The authors reported no competing interests OR Yes
- The authors described their funding sources and how they managed potential conflicts of interest No

To cite this tool: Shea BJ, Reeves BC, Wells G, Thuku M, Hamel C, Moran J, Moher D, Tugwell P, Welch V, Kristjansson E, Henry DA. AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both. *BMJ*. 2017 Sep 21;358:j4008.

Artigo 3

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>1. Did the research questions and inclusion criteria for the review include the components of PICOT?</p>		
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> Population <input checked="" type="checkbox"/> Intervention <input type="checkbox"/> Comparator group <input checked="" type="checkbox"/> Outcome 	<p>Optional (recommended)</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Timeframe for follow-up 	<ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
<p>2. Did the report of the review contain an explicit statement that the review methods were established prior to the conduct of the review and did the report justify any significant deviations from the protocol?</p>		
<p>For Partial Yes: The authors state that they had a written protocol or guide that included ALL the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> review question(s) <input checked="" type="checkbox"/> a search strategy <input checked="" type="checkbox"/> inclusion/exclusion criteria <input checked="" type="checkbox"/> a risk of bias assessment 	<p>For Yes: As for partial yes, plus the protocol should be registered and should also have specified:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> a meta-analysis/synthesis plan, if appropriate, and <input type="checkbox"/> a plan for investigating causes of heterogeneity <input type="checkbox"/> justification for any deviations from the protocol 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> Partial Yes <input type="checkbox"/> No
<p>3. Did the review authors explain their selection of the study designs for inclusion in the review?</p>		
<p>For Yes, the review should satisfy ONE of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Explanation for including only RCTs <input type="checkbox"/> OR Explanation for including only NRSI <input type="checkbox"/> OR Explanation for including both RCTs and NRSI 		<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No
<p>4. Did the review authors use a comprehensive literature search strategy?</p>		
<p>For Partial Yes (all the following):</p> <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> searched at least 2 databases (relevant to research question) <input checked="" type="checkbox"/> provided key word and/or search strategy <input checked="" type="checkbox"/> justified publication restrictions (e.g. language) 	<p>For Yes, should also have (all the following):</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> searched the reference lists / bibliographies of included studies <input type="checkbox"/> searched trial/study registries <input type="checkbox"/> included/consulted content experts in the field <input type="checkbox"/> where relevant, searched for grey literature <input type="checkbox"/> conducted search within 24 months of completion of the review 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> Partial Yes <input type="checkbox"/> No
<p>5. Did the review authors perform study selection in duplicate?</p>		
<p>For Yes, either ONE of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> at least two reviewers independently agreed on selection of eligible studies and achieved consensus on which studies to include <input type="checkbox"/> OR two reviewers selected a sample of eligible studies and achieved good agreement (at least 80 percent), with the remainder selected by one reviewer. 		<ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>6. Did the review authors perform data extraction in duplicate?</p>		
<p>For Yes, either ONE of the following:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> at least two reviewers achieved consensus on which data to extract from included studies</p> <p><input type="checkbox"/> OR two reviewers extracted data from a sample of eligible studies and achieved good agreement (at least 80 percent), with the remainder extracted by one reviewer.</p>		<p><input checked="" type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p>
<p>7. Did the review authors provide a list of excluded studies and justify the exclusions?</p>		
<p>For Partial Yes:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> provided a list of all potentially relevant studies that were read in full-text form but excluded from the review</p>	<p>For Yes, must also have:</p> <p><input type="checkbox"/> Justified the exclusion from the review of each potentially relevant study</p>	<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p>
<p>8. Did the review authors describe the included studies in adequate detail?</p>		
<p>For Partial Yes (ALL the following):</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described population</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described interventions</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described comparators</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described outcomes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described research designs</p>	<p>For Yes, should also have ALL the following:</p> <p><input type="checkbox"/> described population in detail</p> <p><input type="checkbox"/> described intervention in detail (including doses where relevant)</p> <p><input type="checkbox"/> described comparator in detail (including doses where relevant)</p> <p><input type="checkbox"/> described study's setting</p> <p><input type="checkbox"/> timeframe for follow-up</p>	<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p>
<p>9. Did the review authors use a satisfactory technique for assessing the risk of bias (RoB) in individual studies that were included in the review?</p>		
<p>RCTs</p> <p>For Partial Yes, must have assessed RoB from:</p> <p><input type="checkbox"/> un concealed allocation, and</p> <p><input type="checkbox"/> lack of blinding of patients and assessors when assessing outcomes (unnecessary for objective outcomes such as all-cause mortality)</p>	<p>For Yes, must also have assessed RoB from:</p> <p><input type="checkbox"/> allocation sequence that was not truly random, and</p> <p><input type="checkbox"/> selection of the reported result from among multiple measurements or analyses of a specified outcome</p>	<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p> <p><input type="checkbox"/> Includes only NRSI</p>
<p>NRSI</p> <p>For Partial Yes, must have assessed RoB:</p> <p><input type="checkbox"/> from confounding, and</p> <p><input type="checkbox"/> from selection bias</p>	<p>For Yes, must also have assessed RoB:</p> <p><input type="checkbox"/> methods used to ascertain exposures and outcomes, and</p> <p><input type="checkbox"/> selection of the reported result from among multiple measurements or analyses of a specified outcome</p>	<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p> <p><input type="checkbox"/> Includes only RCTs</p>
<p>10. Did the review authors report on the sources of funding for the studies included in the review?</p>		
<p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> Must have reported on the sources of funding for individual studies included in the review. Note: Reporting that the reviewers looked for this information but it was not reported by study authors also qualifies</p>		<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>11. If meta-analysis was performed did the review authors use appropriate methods for statistical combination of results?</p>	
<p>RCTs For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> The authors justified combining the data in a meta-analysis</p> <p><input type="checkbox"/> AND they used an appropriate weighted technique to combine study results and adjusted for heterogeneity if present.</p> <p><input type="checkbox"/> AND investigated the causes of any heterogeneity</p>	<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted</p>
<p>For NRSI For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> The authors justified combining the data in a meta-analysis</p> <p><input type="checkbox"/> AND they used an appropriate weighted technique to combine study results, adjusting for heterogeneity if present</p> <p><input type="checkbox"/> AND they statistically combined effect estimates from NRSI that were adjusted for confounding, rather than combining raw data, or justified combining raw data when adjusted effect estimates were not available</p> <p><input type="checkbox"/> AND they reported separate summary estimates for RCTs and NRSI separately when both were included in the review</p>	<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted</p>
<p>12. If meta-analysis was performed, did the review authors assess the potential impact of RoB in individual studies on the results of the meta-analysis or other evidence synthesis?</p>	
<p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> included only low risk of bias RCTs</p> <p><input type="checkbox"/> OR, if the pooled estimate was based on RCTs and/or NRSI at variable RoB, the authors performed analyses to investigate possible impact of RoB on summary estimates of effect.</p>	<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted</p>
<p>13. Did the review authors account for RoB in individual studies when interpreting/ discussing the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> included only low risk of bias RCTs</p> <p><input type="checkbox"/> OR, if RCTs with moderate or high RoB, or NRSI were included the review provided a discussion of the likely impact of RoB on the results.</p>	<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>
<p>14. Did the review authors provide a satisfactory explanation for, and discussion of, any heterogeneity observed in the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> There was no significant heterogeneity in the results.</p> <p><input type="checkbox"/> OR if heterogeneity was present the authors performed an investigation of sources of any heterogeneity in the results and discussed the impact of this on the results of the review</p>	<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>
<p>15. If they performed quantitative synthesis did the review authors carry out an adequate investigation of publication bias (small study bias) and discuss its likely impact on the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> performed graphical or statistical tests for publication bias and discussed the likelihood and magnitude of impact of publication bias</p>	<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted</p>

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

16. Did the review authors report any potential sources of conflict of interest, including any funding they received for conducting the review?

For Yes:



The authors reported no competing interests OR

The authors described their funding sources and how they managed potential conflicts of interest



Yes



No

To cite this tool: Shea BJ, Reeves BC, Wells G, Thuku M, Hamel C, Moran J, Moher D, Tugwell P, Welch V, Kristjansson E, Henry DA. AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both. *BMJ*. 2017 Sep 21;358:j4008.

Artigo 4

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>1. Did the research questions and inclusion criteria for the review include the components of PICO?</p>		
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Population <input type="checkbox"/> Intervention <input type="checkbox"/> Comparator group <input type="checkbox"/> Outcome 	<p>Optional (recommended)</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Timeframe for follow-up 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No
<p>2. Did the report of the review contain an explicit statement that the review methods were established prior to the conduct of the review and did the report justify any significant deviations from the protocol?</p>		
<p>For Partial Yes: The authors state that they had a written protocol or guide that included ALL the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> review question(s) <input type="checkbox"/> a search strategy <input type="checkbox"/> inclusion/exclusion criteria <input type="checkbox"/> a risk of bias assessment 	<p>For Yes: As for partial yes, plus the protocol should be registered and should also have specified:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> a meta-analysis/synthesis plan, if appropriate, and <input type="checkbox"/> a plan for investigating causes of heterogeneity <input type="checkbox"/> justification for any deviations from the protocol 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> Partial Yes <input checked="" type="checkbox"/> No
<p>3. Did the review authors explain their selection of the study designs for inclusion in the review?</p>		
<p>For Yes, the review should satisfy ONE of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Explanation for including only RCTs <input type="checkbox"/> OR Explanation for including only NRSI <input type="checkbox"/> OR Explanation for including both RCTs and NRSI 		<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No
<p>4. Did the review authors use a comprehensive literature search strategy?</p>		
<p>For Partial Yes (all the following):</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> searched at least 2 databases (relevant to research question) <input type="checkbox"/> provided key word and/or search strategy <input type="checkbox"/> justified publication restrictions (e.g. language) 	<p>For Yes, should also have (all the following):</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> searched the reference lists / bibliographies of included studies <input type="checkbox"/> searched trial/study registries <input type="checkbox"/> included/consulted content experts in the field <input type="checkbox"/> where relevant, searched for grey literature <input type="checkbox"/> conducted search within 24 months of completion of the review 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> Partial Yes <input checked="" type="checkbox"/> No
<p>5. Did the review authors perform study selection in duplicate?</p>		
<p>For Yes, either ONE of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> at least two reviewers independently agreed on selection of eligible studies and achieved consensus on which studies to include <input type="checkbox"/> OR two reviewers selected a sample of eligible studies and achieved good agreement (at least 80 percent), with the remainder selected by one reviewer. 		<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>6. Did the review authors perform data extraction in duplicate?</p> <p>For Yes, either ONE of the following:</p> <p><input type="checkbox"/> at least two reviewers achieved consensus on which data to extract from included studies</p> <p><input type="checkbox"/> OR two reviewers extracted data from a sample of eligible studies and achieved good agreement (at least 80 percent), with the remainder extracted by one reviewer.</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>
<p>7. Did the review authors provide a list of excluded studies and justify the exclusions?</p> <p>For Partial Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> provided a list of all potentially relevant studies that were read in full-text form but excluded from the review</p> <p>For Yes, must also have:</p> <p><input type="checkbox"/> Justified the exclusion from the review of each potentially relevant study</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>
<p>8. Did the review authors describe the included studies in adequate detail?</p> <p>For Partial Yes (ALL the following):</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described populations</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described interventions</p> <p><input type="checkbox"/> described comparators</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described outcomes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described research designs</p> <p>For Yes, should also have ALL the following:</p> <p><input type="checkbox"/> described population in detail</p> <p><input type="checkbox"/> described intervention in detail (including doses where relevant)</p> <p><input type="checkbox"/> described comparator in detail (including doses where relevant)</p> <p><input type="checkbox"/> described study's setting</p> <p><input type="checkbox"/> timeframe for follow-up</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>
<p>9. Did the review authors use a satisfactory technique for assessing the risk of bias (RoB) in individual studies that were included in the review?</p> <p>RCTs</p> <p>For Partial Yes, must have assessed RoB from:</p> <p><input type="checkbox"/> unconcealed allocation, and</p> <p><input type="checkbox"/> lack of blinding of patients and assessors when assessing outcomes (unnecessary for objective outcomes such as all-cause mortality)</p> <p>For Yes, must also have assessed RoB from:</p> <p><input type="checkbox"/> allocation sequence that was not truly random, and</p> <p><input type="checkbox"/> selection of the reported result from among multiple measurements or analyses of a specified outcome</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p> <p><input type="checkbox"/> Includes only NRSI</p>
<p>NRSI</p> <p>For Partial Yes, must have assessed RoB:</p> <p><input type="checkbox"/> from confounding, and</p> <p><input type="checkbox"/> from selection bias</p> <p>For Yes, must also have assessed RoB:</p> <p><input type="checkbox"/> methods used to ascertain exposures and outcomes, and</p> <p><input type="checkbox"/> selection of the reported result from among multiple measurements or analyses of a specified outcome</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p> <p><input type="checkbox"/> Includes only RCTs</p>
<p>10. Did the review authors report on the sources of funding for the studies included in the review?</p> <p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> Must have reported on the sources of funding for individual studies included in the review. Note: Reporting that the reviewers looked for this information but it was not reported by study authors also qualifies</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>11. If meta-analysis was performed did the review authors use appropriate methods for statistical combination of results?</p>	
<p>RCTs For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> The authors justified combining the data in a meta-analysis <input type="checkbox"/> AND they used an appropriate weighted technique to combine study results and adjusted for heterogeneity if present. <input type="checkbox"/> AND investigated the causes of any heterogeneity 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted
<p>For NRSI For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> The authors justified combining the data in a meta-analysis <input type="checkbox"/> AND they used an appropriate weighted technique to combine study results, adjusting for heterogeneity if present <input type="checkbox"/> AND they statistically combined effect estimates from NRSI that were adjusted for confounding, rather than combining raw data, or justified combining raw data when adjusted effect estimates were not available <input type="checkbox"/> AND they reported separate summary estimates for RCTs and NRSI separately when both were included in the review 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted
<p>12. If meta-analysis was performed, did the review authors assess the potential impact of RoB in individual studies on the results of the meta-analysis or other evidence synthesis?</p>	
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> included only low risk of bias RCTs <input type="checkbox"/> OR, if the pooled estimate was based on RCTs and/or NRSI at variable RoB, the authors performed analyses to investigate possible impact of RoB on summary estimates of effect. 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted
<p>13. Did the review authors account for RoB in individual studies when interpreting/ discussing the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> included only low risk of bias RCTs <input type="checkbox"/> OR, if RCTs with moderate or high RoB, or NRSI were included the review provided a discussion of the likely impact of RoB on the results 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No
<p>14. Did the review authors provide a satisfactory explanation for, and discussion of, any heterogeneity observed in the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> There was no significant heterogeneity in the results <input type="checkbox"/> OR if heterogeneity was present the authors performed an investigation of sources of any heterogeneity in the results and discussed the impact of this on the results of the review 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No
<p>15. If they performed quantitative synthesis did the review authors carry out an adequate investigation of publication bias (small study bias) and discuss its likely impact on the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> performed graphical or statistical tests for publication bias and discussed the likelihood and magnitude of impact of publication bias 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

16. Did the review authors report any potential sources of conflict of interest, including any funding they received for conducting the review?

For Yes:



The authors reported no competing interests OR



The authors described their funding sources and how they managed potential conflicts of interest



Yes



No

To cite this tool: Shea BJ, Reeves BC, Wells G, Thuku M, Hamel C, Moran J, Moher D, Tugwell P, Welch V, Kristjansson E, Henry DA. AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both. *BMJ*. 2017 Sep 21;358:j4008.

Artigo 5

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>1. Did the research questions and inclusion criteria for the review include the components of PICO?</p>		
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Population <input type="checkbox"/> Intervention <input type="checkbox"/> Comparator group <input type="checkbox"/> Outcome 	<p>Optional (recommended)</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Timeframe for follow-up 	<p><input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No</p>
<p>2. Did the report of the review contain an explicit statement that the review methods were established prior to the conduct of the review and did the report justify any significant deviations from the protocol?</p>		
<p>For Partial Yes: The authors state that they had a written protocol or guide that included ALL the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> review question(s) <input checked="" type="checkbox"/> a search strategy <input type="checkbox"/> inclusion/exclusion criteria <input type="checkbox"/> a risk of bias assessment 	<p>For Yes: As for partial yes, plus the protocol should be registered and should also have specified:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> a meta-analysis/synthesis plan, if appropriate, and <input type="checkbox"/> a plan for investigating causes of heterogeneity <input type="checkbox"/> justification for any deviations from the protocol 	<p><input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> Partial Yes <input checked="" type="checkbox"/> No</p>
<p>3. Did the review authors explain their selection of the study designs for inclusion in the review?</p>		
<p>For Yes, the review should satisfy ONE of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Explanation for including only RCTs <input type="checkbox"/> OR Explanation for including only NRSI <input type="checkbox"/> OR Explanation for including both RCTs and NRSI 		<p><input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No</p>
<p>4. Did the review authors use a comprehensive literature search strategy?</p>		
<p>For Partial Yes (all the following):</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> searched at least 2 databases (relevant to research question) <input type="checkbox"/> provided key word and/or search strategy <input type="checkbox"/> justified publication restrictions (e.g. language) 	<p>For Yes, should also have (all the following):</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> searched the reference lists / bibliographies of included studies <input type="checkbox"/> searched trial/study registries <input type="checkbox"/> included/consulted content experts in the field <input type="checkbox"/> where relevant, searched for grey literature <input type="checkbox"/> conducted search within 24 months of completion of the review 	<p><input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> Partial Yes <input checked="" type="checkbox"/> No</p>
<p>5. Did the review authors perform study selection in duplicate?</p>		
<p>For Yes, either ONE of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> at least two reviewers independently agreed on selection of eligible studies and achieved consensus on which studies to include <input type="checkbox"/> OR two reviewers selected a sample of eligible studies and achieved good agreement (at least 80 percent), with the remainder selected by one reviewer. 		<p><input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No</p>

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>6. Did the review authors perform data extraction in duplicate?</p> <p>For Yes, either ONE of the following:</p> <p><input type="checkbox"/> at least two reviewers achieved consensus on which data to extract from included studies</p> <p><input type="checkbox"/> OR two reviewers extracted data from a sample of eligible studies and achieved good agreement (at least 80 percent), with the remainder extracted by one reviewer.</p>		<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>
<p>7. Did the review authors provide a list of excluded studies and justify the exclusions?</p> <p>For Partial Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> provided a list of all potentially relevant studies that were read in full-text form but excluded from the review</p>		<p>For Yes, must also have:</p> <p><input type="checkbox"/> Justified the exclusion from the review of each potentially relevant study</p> <p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>
<p>8. Did the review authors describe the included studies in adequate detail?</p> <p>For Partial Yes (ALL the following):</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described populations</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described interventions</p> <p><input type="checkbox"/> described comparators</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described outcomes</p> <p><input type="checkbox"/> described research designs</p>		<p>For Yes, should also have ALL the following:</p> <p><input type="checkbox"/> described population in detail</p> <p><input type="checkbox"/> described intervention in detail (including doses where relevant)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described comparator in detail (including doses where relevant)</p> <p><input type="checkbox"/> described study's setting</p> <p><input type="checkbox"/> timeframe for follow-up</p> <p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>
<p>9. Did the review authors use a satisfactory technique for assessing the risk of bias (RoB) in individual studies that were included in the review?</p> <p>RCTs</p> <p>For Partial Yes, must have assessed RoB from:</p> <p><input type="checkbox"/> unbalanced allocation, and</p> <p><input type="checkbox"/> lack of blinding of patients and assessors when assessing outcomes (unnecessary for objective outcomes such as all-cause mortality)</p>		<p>For Yes, must also have assessed RoB from:</p> <p><input type="checkbox"/> allocation sequence that was not truly random, and</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> selection of the reported result from among multiple measurements or analysis of a specified outcome</p> <p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p> <p><input type="checkbox"/> Includes only NRSI</p>
<p>NRSI</p> <p>For Partial Yes, must have assessed RoB:</p> <p><input type="checkbox"/> from confounding, and</p> <p><input type="checkbox"/> from selection bias</p>		<p>For Yes, must also have assessed RoB:</p> <p><input type="checkbox"/> methods used to ascertain exposures and outcomes, and</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> selection of the reported result from among multiple measurements or analysis of a specified outcome</p> <p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p> <p><input type="checkbox"/> Includes only RCTs</p>
<p>10. Did the review authors report on the sources of funding for the studies included in the review?</p> <p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> Must have reported on the sources of funding for individual studies included in the review. Note: Reporting that the reviewers looked for this information but it was not reported by study authors also qualifies</p>		<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>11. If meta-analysis was performed did the review authors use appropriate methods for statistical combination of results?</p>	
<p>RCTs For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> The authors justified combining the data in a meta-analysis <input type="checkbox"/> AND they used an appropriate weighted technique to combine study results and adjusted for heterogeneity if present. <input type="checkbox"/> AND investigated the causes of any heterogeneity 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted
<p>For NRSI For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> The authors justified combining the data in a meta-analysis <input type="checkbox"/> AND they used an appropriate weighted technique to combine study results, adjusting for heterogeneity if present <input type="checkbox"/> AND they statistically combined effect estimates from NRSI that were adjusted for confounding, rather than combining raw data, or justified combining raw data when adjusted effect estimates were not available. <input type="checkbox"/> AND they reported separate summary estimates for RCTs and NRSI separately when both were included in the review 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted
<p>12. If meta-analysis was performed, did the review authors assess the potential impact of RoB in individual studies on the results of the meta-analysis or other evidence synthesis?</p>	
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> included only low risk of bias RCTs <input type="checkbox"/> OR, if the pooled estimate was based on RCTs and/or NRSI of variable RoB, the authors performed analyses to investigate possible impact of RoB on summary estimates of effect. 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted
<p>13. Did the review authors account for RoB in individual studies when interpreting/ discussing the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> included only low risk of bias RCTs <input type="checkbox"/> OR, if RCTs with moderate or high RoB, or NRSI were included the review provided a discussion of the likely impact of RoB on the results 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No
<p>14. Did the review authors provide a satisfactory explanation for, and discussion of, any heterogeneity observed in the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> There was no significant heterogeneity in the results <input type="checkbox"/> OR if heterogeneity was present the authors performed an investigation of sources of any heterogeneity in the results and discussed the impact of this on the results of the review 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No
<p>15. If they performed quantitative synthesis did the review authors carry out an adequate investigation of publication bias (small study bias) and discuss its likely impact on the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> performed graphical or statistical tests for publication bias and discussed the likelihood and magnitude of impact of publication bias 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

16. Did the review authors report any potential sources of conflict of interest, including any funding they received for conducting the review?

For Yes:

- The authors reported no competing interests OR
- The authors described their funding sources and how they managed potential conflicts of interest

Yes
 No

To cite this tool: Shea BJ, Reeves BC, Wells G, Thuku M, Hamel C, Moran J, Moher D, Tugwell P, Welch V, Kristjansson E, Henry DA. AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both. *BMJ*. 2017 Sep 21;358:j4008.

Artigo 6

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>1. Did the research questions and inclusion criteria for the review include the components of PICO?</p>		
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Population <input type="checkbox"/> Intervention <input type="checkbox"/> Comparative group <input type="checkbox"/> Outcome 	<p>Optional (recommended):</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Timeframe for follow-up 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No
<p>2. Did the report of the review contain an explicit statement that the review methods were established prior to the conduct of the review and did the report justify any significant deviations from the protocol?</p>		
<p>For Partial Yes: The authors state that they had a written protocol or guide that included ALL the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> review question(s) <input checked="" type="checkbox"/> a search strategy <input checked="" type="checkbox"/> inclusion/exclusion criteria <input type="checkbox"/> a risk of bias assessment 	<p>For Yes: As for partial yes, plus the protocol should be registered and should also have specified:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> a meta-analysis/synthesis plan, if appropriate, and <input type="checkbox"/> a plan for investigating causes of heterogeneity <input type="checkbox"/> justification for any deviations from the protocol 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> Partial Yes <input checked="" type="checkbox"/> No
<p>3. Did the review authors explain their selection of the study designs for inclusion in the review?</p>		
<p>For Yes, the review should satisfy ONE of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Explanation for including only RCTs <input type="checkbox"/> OR Explanation for including only NRSI <input type="checkbox"/> OR Explanation for including both RCTs and NRSI 		<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No
<p>4. Did the review authors use a comprehensive literature search strategy?</p>		
<p>For Partial Yes (all the following):</p> <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> searched at least 2 databases (relevant to research question) <input checked="" type="checkbox"/> provided key word and/or search strategy <input checked="" type="checkbox"/> justified publication restrictions (e.g. language) 	<p>For Yes, should also have (all the following):</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> searched the reference lists / bibliographies of included studies <input type="checkbox"/> searched trial/study registries <input type="checkbox"/> included/consulted content experts in the field <input type="checkbox"/> where relevant, searched for grey literature <input type="checkbox"/> conducted search within 24 months of completion of the review 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> Partial Yes <input type="checkbox"/> No
<p>5. Did the review authors perform study selection in duplicate?</p>		
<p>For Yes, either ONE of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> at least two reviewers independently agreed on selection of eligible studies and achieved consensus on which studies to include <input type="checkbox"/> OR two reviewers selected a sample of eligible studies and achieved good agreement (at least 80 percent), with the remainder selected by one reviewer. 		<ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>6. Did the review authors perform data extraction in duplicate?</p> <p>For Yes, either ONE of the following:</p> <p><input type="checkbox"/> at least two reviewers achieved consensus on which data to extract from included studies</p> <p><input type="checkbox"/> OR two reviewers extracted data from a sample of eligible studies and achieved good agreement (at least 80 percent), with the remainder extracted by one reviewer.</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>
<p>7. Did the review authors provide a list of excluded studies and justify the exclusions?</p> <p>For Partial Yes:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> provided a list of all potentially relevant studies that were read in full-text form but excluded from the review</p> <p>For Yes, must also have:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> justified the exclusion from the review of each potentially relevant study</p>			<p><input checked="" type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p>
<p>8. Did the review authors describe the included studies in adequate detail?</p> <p>For Partial Yes (ALL the following):</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described populations</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described interventions</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described comparators</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described outcomes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described research designs</p> <p>For Yes, should also have ALL the following:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described population in detail</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described intervention in detail (including doses where relevant)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described comparator in detail (including doses where relevant)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> described study's setting</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> timeframe for follow-up</p>			<p><input checked="" type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p>
<p>9. Did the review authors use a satisfactory technique for assessing the risk of bias (RoB) in individual studies that were included in the review?</p> <p>RCTs</p> <p>For Partial Yes, must have assessed RoB from:</p> <p><input type="checkbox"/> unconcealed allocation, and</p> <p><input type="checkbox"/> lack of blinding of patients and assessors when assessing outcomes (unnecessary for objective outcomes such as all-cause mortality)</p> <p>For Yes, must also have assessed RoB from:</p> <p><input type="checkbox"/> allocation sequence that was not truly random, and</p> <p><input type="checkbox"/> selection of the reported result from among multiple measurements or analyses of a specified outcome</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p> <p><input type="checkbox"/> Includes only NRSI</p>
<p>NRSI</p> <p>For Partial Yes, must have assessed RoB:</p> <p><input type="checkbox"/> from confounding, and</p> <p><input type="checkbox"/> from selection bias</p> <p>For Yes, must also have assessed RoB:</p> <p><input type="checkbox"/> methods used to ascertain exposures and outcomes, and</p> <p><input type="checkbox"/> selection of the reported result from among multiple measurements or analyses of a specified outcome</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p> <p><input type="checkbox"/> Includes only RCTs</p>
<p>10. Did the review authors report on the sources of funding for the studies included in the review?</p> <p>For Yes:</p> <p><input type="checkbox"/> Must have reported on the sources of funding for individual studies included in the review. Note: Reporting that the reviewers looked for this information but it was not reported by study authors also qualifies</p>			<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>11. If meta-analysis was performed did the review authors use appropriate methods for statistical combination of results?</p>	
<p>RCTs For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> The authors justified combining the data in a meta-analysis <input type="checkbox"/> AND they used an appropriate weighted technique to combine study results and adjusted for heterogeneity if present. <input type="checkbox"/> AND investigated the causes of any heterogeneity 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted
<p>For NRSI For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> The authors justified combining the data in a meta-analysis <input type="checkbox"/> AND they used an appropriate weighted technique to combine study results, adjusting for heterogeneity if present <input type="checkbox"/> AND they statistically combined effect estimates from NRSI that were adjusted for confounding, rather than combining raw data, or justified combining raw data when adjusted effect estimates were not available <input type="checkbox"/> AND they reported separate summary estimates for RCTs and NRSI separately when both were included in the review 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted
<p>12. If meta-analysis was performed, did the review authors assess the potential impact of RoB in individual studies on the results of the meta-analysis or other evidence synthesis?</p>	
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> included only low risk of bias RCTs <input type="checkbox"/> OR, if the pooled estimate was based on RCTs and/or NRSI at variable RoB, the authors performed analyses to investigate possible impact of RoB on summary estimates of effect. 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted
<p>13. Did the review authors account for RoB in individual studies when interpreting/ discussing the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> included only low risk of bias RCTs <input type="checkbox"/> OR, if RCTs with moderate or high RoB, or NRSI were included the review provided a discussion of the likely impact of RoB on the results 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No
<p>14. Did the review authors provide a satisfactory explanation for, and discussion of, any heterogeneity observed in the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> There was no significant heterogeneity in the results <input checked="" type="checkbox"/> OR if heterogeneity was present the authors performed an investigation of sources of any heterogeneity in the results and discussed the impact of this on the results of the review 	<ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
<p>15. If they performed quantitative synthesis did the review authors carry out an adequate investigation of publication bias (small study bias) and discuss its likely impact on the results of the review?</p>	
<p>For Yes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> performed graphical or statistical tests for publication bias and discussed the likelihood and magnitude of impact of publication bias 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

16. Did the review authors report any potential sources of conflict of interest, including any funding they received for conducting the review?

For Yes:

- The authors reported no competing interests OR
 The authors described their funding sources and how they managed potential conflicts of interest

Yes
 No

To cite this tool: Shea BJ, Reeves BC, Wells G, Thuku M, Hamel C, Moran J, Moher D, Tugwell P, Welch V, Kristjansson E, Henry DA. AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both. *BMJ*. 2017 Sep 21;358:j4008.

Artigo 7

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

<p>1. Did the research questions and inclusion criteria for the review include the components of PICO?</p>		
<p>For Yes:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Population</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Intervention</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Comparator group</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Outcome</p>	<p>Optional (recommended)</p> <p><input type="checkbox"/> Timeframe for follow-up</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p>
<p>2. Did the report of the review contain an explicit statement that the review methods were established prior to the conduct of the review and did the report justify any significant deviations from the protocol?</p>		
<p>For Partial Yes: The authors state that they had a written protocol or guide that included ALL the following:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> review question(s)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> a search strategy</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> inclusion/exclusion criteria</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> a risk of bias assessment</p>	<p>For Yes: As for partial yes, plus the protocol should be registered and should also have specified:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> a meta-analysis/synthesis plan, if appropriate, <i>and</i></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> a plan for investigating causes of heterogeneity</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> justification for any deviations from the protocol</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p>
<p>3. Did the review authors explain their selection of the study designs for inclusion in the review?</p>		
<p>For Yes, the review should satisfy ONE of the following:</p> <p><input type="checkbox"/> Explanation for including only RCTs</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> OR Explanation for including only NRSI</p> <p><input type="checkbox"/> OR Explanation for including both RCTs and NRSI</p>		<p><input checked="" type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p>
<p>4. Did the review authors use a comprehensive literature search strategy?</p>		
<p>For Partial Yes (all the following):</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> searched at least 2 databases (relevant to research question)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> provided key word and/or search strategy</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> justified publication restrictions (e.g. language)</p>	<p>For Yes, should also have (all the following):</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> searched the reference lists / bibliographies of included studies</p> <p><input type="checkbox"/> searched trial/study registries</p> <p><input type="checkbox"/> included/consulted content experts in the field</p> <p><input type="checkbox"/> where relevant, searched for grey literature</p> <p><input type="checkbox"/> conducted search within 24 months of completion of the review</p>	<p><input type="checkbox"/> Yes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Partial Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p>
<p>5. Did the review authors perform study selection in duplicate?</p>		
<p>For Yes, either ONE of the following:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> at least two reviewers independently agreed on selection of eligible studies and achieved consensus on which studies to include</p> <p><input type="checkbox"/> OR two reviewers selected a sample of eligible studies <i>and</i> achieved good agreement (at least 80 percent), with the remainder selected by one reviewer.</p>		<p><input checked="" type="checkbox"/> Yes</p> <p><input type="checkbox"/> No</p>

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

6. Did the review authors perform data extraction in duplicate?

For Yes, either ONE of the following:

- at least two reviewers achieved consensus on which data to extract from included studies
- OR two reviewers extracted data from a sample of eligible studies and achieved good agreement (at least 80 percent), with the remainder extracted by one reviewer.

Yes
 No

7. Did the review authors provide a list of excluded studies and justify the exclusions?

For Partial Yes:

- provided a list of all potentially relevant studies that were read in full-text form but excluded from the review

For Yes, must also have:

- Justified the exclusion from the review of each potentially relevant study

Yes
 Partial Yes
 No

8. Did the review authors describe the included studies in adequate detail?

For Partial Yes (ALL the following):

- described populations
- described interventions
- described comparators
- described outcomes
- described research designs

For Yes, should also have ALL the following:

- described population in detail
- described intervention in detail (including doses where relevant)
- described comparator in detail (including doses where relevant)
- described study's setting
- timeframe for follow-up

Yes
 Partial Yes
 No

9. Did the review authors use a satisfactory technique for assessing the risk of bias (RoB) in individual studies that were included in the review?

RCTs

For Partial Yes, must have assessed RoB from

- unconcealed allocation, *and*
- lack of blinding of patients and assessors when assessing outcomes (unnecessary for objective outcomes such as all-cause mortality)

For Yes, must also have assessed RoB from:

- allocation sequence that was not truly random, *and*
- selection of the reported result from among multiple measurements or analyses of a specified outcome

Yes
 Partial Yes
 No
 Includes only NRSI

NRSI

For Partial Yes, must have assessed RoB:

- from confounding, *and*
- from selection bias

For Yes, must also have assessed RoB:

- methods used to ascertain exposures and outcomes, *and*
- selection of the reported result from among multiple measurements or analyses of a specified outcome

Yes
 Partial Yes
 No
 Includes only RCTs

10. Did the review authors report on the sources of funding for the studies included in the review?

For Yes

- Must have reported on the sources of funding for individual studies included in the review. Note: Reporting that the reviewers looked for this information but it was not reported by study authors also qualifies

Yes
 No

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

11. If meta-analysis was performed did the review authors use appropriate methods for statistical combination of results?

RCTs

For Yes:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> The authors justified combining the data in a meta-analysis | <input type="checkbox"/> Yes |
| <input type="checkbox"/> AND they used an appropriate weighted technique to combine study results and adjusted for heterogeneity if present. | <input type="checkbox"/> No |
| <input type="checkbox"/> AND investigated the causes of any heterogeneity | <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted |

For NRSI

For Yes:

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> The authors justified combining the data in a meta-analysis | <input type="checkbox"/> Yes |
| <input type="checkbox"/> AND they used an appropriate weighted technique to combine study results, adjusting for heterogeneity if present | <input type="checkbox"/> No |
| <input type="checkbox"/> AND they statistically combined effect estimates from NRSI that were adjusted for confounding, rather than combining raw data, or justified combining raw data when adjusted effect estimates were not available | <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted |
| <input type="checkbox"/> AND they reported separate summary estimates for RCTs and NRSI separately when both were included in the review | |

12. If meta-analysis was performed, did the review authors assess the potential impact of RoB in individual studies on the results of the meta-analysis or other evidence synthesis?

For Yes:

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> included only low risk of bias RCTs | <input type="checkbox"/> Yes |
| <input type="checkbox"/> OR, if the pooled estimate was based on RCTs and/or NRSI at variable RoB, the authors performed analyses to investigate possible impact of RoB on summary estimates of effect. | <input type="checkbox"/> No |
| | <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted |

13. Did the review authors account for RoB in individual studies when interpreting/ discussing the results of the review?

For Yes:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> included only low risk of bias RCTs | <input checked="" type="checkbox"/> Yes |
| <input checked="" type="checkbox"/> OR, if RCTs with moderate or high RoB, or NRSI were included the review provided a discussion of the likely impact of RoB on the results | <input type="checkbox"/> No |

14. Did the review authors provide a satisfactory explanation for, and discussion of, any heterogeneity observed in the results of the review?

For Yes:

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> There was no significant heterogeneity in the results | <input checked="" type="checkbox"/> Yes |
| <input checked="" type="checkbox"/> OR if heterogeneity was present the authors performed an investigation of sources of any heterogeneity in the results and discussed the impact of this on the results of the review | <input type="checkbox"/> No |

15. If they performed quantitative synthesis did the review authors carry out an adequate investigation of publication bias (small study bias) and discuss its likely impact on the results of the review?

For Yes:

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> performed graphical or statistical tests for publication bias and discussed the likelihood and magnitude of impact of publication bias | <input type="checkbox"/> Yes |
| | <input type="checkbox"/> No |
| | <input checked="" type="checkbox"/> No meta-analysis conducted |

AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both

16. Did the review authors report any potential sources of conflict of interest, including any funding they received for conducting the review?

For Yes:



The authors reported no competing interests OR



The authors described their funding sources and how they managed potential conflicts of interest



Yes



No

To cite this tool: Shea BJ, Reeves BC, Wells G, Thuku M, Hamel C, Moran J, Moher D, Tugwell P, Welch V, Kristjansson E, Henry DA. AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both. *BMJ*. 2017 Sep 21;358:j4008.

**ANEXO D – ROBIS: A NEW TOOL TO ASSESS RISK OF BIAS IN SYSTEMATIC
REVIEWS WAS DEVELOPED.**



ROBIS: A new tool to assess risk of bias in systematic reviews was developed

Penny Whiting^{a,b,c,*}, Jelena Savovic^{a,b}, Julian P.T. Higgins^{a,d}, Deborah M. Caldwell^a, Barnaby C. Reeves^e, Beverley Shea^f, Philippa Davies^{a,b}, Jos Kleijnen^{c,g}, Rachel Churchill^h, the ROBIS group

^aSchool of Social and Community Medicine, University of Bristol, Canynge Hall, 39 Whatley Road, Bristol BS8 2PS, UK

^bThe National Institute for Health Research Collaboration for Leadership in Applied Health Research and Care West at University Hospitals Bristol NHS Foundation Trust, 9th Floor, Whitefriars, Lewins Mead, Bristol BS1 2NT

^cKleijnen Systematic Reviews Ltd, Unit 6, Escrick Business Park, Riccall Road, Escrick, York YO19 6FD, UK

^dCentre for Reviews and Dissemination, University of York, York YO10 3DD, UK

^eSchool of Clinical Sciences, University of Bristol, Bristol Royal Infirmary, Level Queen's Building, 69 St Michael's Hill, Bristol BS2 8DZ, UK

^fCommunity Information and Epidemiological Technologies Institute of Population Health, 1 Stewart Street, Room 319, Ottawa, Ontario, K1N 6N5, Canada

^gSchool for Public Health and Primary Care (CAPRI), Maastricht University, PO Box 616, 6200 MD, Maastricht, The Netherlands

Accepted 5 June 2015; Published online 16 June 2015

Abstract

Objective: To develop ROBIS, a new tool for assessing the risk of bias in systematic reviews (rather than in primary studies).

Study Design and Setting: We used four-stage approach to develop ROBIS: define the scope, review the evidence base, hold a face-to-face meeting, and refine the tool through piloting.

Results: ROBIS is currently aimed at four broad categories of reviews mainly within health care settings: interventions, diagnosis, prognosis, and etiology. The target audience of ROBIS is primarily guideline developers, authors of overviews of systematic reviews ("reviews of reviews"), and review authors who might want to assess or avoid risk of bias in their reviews. The tool is completed in three phases: (1) assess relevance (optional), (2) identify concerns with the review process, and (3) judge risk of bias. Phase 2 covers four domains through which bias may be introduced into a systematic review: study eligibility criteria; identification and selection of studies; data collection and study appraisal; and synthesis and findings. Phase 3 assesses the overall risk of bias in the interpretation of review findings and whether this considered limitations identified in any of the phase 2 domains. Signaling questions are included to help judge concerns with the review process (phase 2) and the overall risk of bias in the review (phase 3); these questions flag aspects of review design related to the potential for bias and aim to help assessors judge risk of bias in the review process, results, and conclusions.

Conclusions: ROBIS is the first rigorously developed tool designed specifically to assess the risk of bias in systematic reviews. © 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: Evidence; Meta-analysis; Quality; Risk of bias; Systematic review; Tool

The ROBIS group members: Lars Beckmann (Institute for Quality and Efficiency in Health Care [IQWiG], Cologne, Germany), Patrick Bossuyt (University of Amsterdam), Deborah Caldwell (University of Bristol)*, Rachel Churchill (University of Bristol)*, Philippa Davies (University of Bristol)*, Kay Dickens (US Cochrane Center), Kerry Dwan (University of Liverpool), Julie Glanville (York Health Economics Consortium, University of York), Julian Higgins (University of Bristol)*, Jos Kleijnen (KSR York Ltd and University of Maastricht)*, Julia Kreis (Institute for Quality and Efficiency in Health Care [IQWiG], Cologne, Germany), Toby Lasserson (Cochrane Editorial Unit)*, Fergus Macbeth (Wales Cancer Trials Unit), Silvia Minozzi (Lazio Regional Health Service), Karel GM Moons (University of Utrecht), Matthew Page (Monash University), Barney Reeves (University of Bristol)*, Nancy Santesso (McMaster University), Jelena Savovic (University of Bristol)*, Christopher H Schmid (Brown University), Beth Shaw (NICED), Beverley Shea (University of Ottawa)*, David Tovey (Cochrane Editorial Unit)*, Peter Tugwell

(University of Ottawa), Meera Viswanathan (RTI International), Jasvinder Singh (University of Alabama at Birmingham & Birmingham Veterans Affairs Medical Center), Penny Whiting (University of Bristol)*, George Wells (University of Ottawa)*, Robert Wolff (KSR York Ltd). The members designated with an asterisk (*) are also steering group members.

Conflicts of interest: None.

Funding: This work was funded by the Medical Research Council as part of the MRC–National Institute for Health Research (NIHR) Methodology Research Programme (Grant number MR/K01465X/1). B.C.R.'s time in contributing to the study was funded by the NIHR Bristol Biomedical Research Unit in Cardiovascular Disease. D.M.C. is supported by a Medical Research Council (UK) Population Health Science fellowship (G0902118).

* Corresponding author. Tel.: +44 117 34 212 73.

E-mail address: penny.whiting@bristol.ac.uk (P. Whiting).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclinepi.2015.06.005>

0895-4356/© 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Systematic reviews are generally considered to provide the most reliable form of evidence for the effects of a medical intervention, test, or marker [1,2]. They can be used to address questions on a wide range of topics using studies of varying designs. Increasingly, standards for evidence-based guidelines stipulate the use of systematic reviews [3], which can in turn determine care pathways and coverage for services, therapies, drugs, and so on. Because systematic reviews serve a vital role in clinical decision making and resource allocation, decision makers should expect consistent and unbiased standards across topics.

Systematic flaws or limitations in the design or conduct of a review have the potential to bias results. Bias can arise at all stages of the review process; users need to consider these potential biases when interpreting the results and conclusions of a review. The potential of flaws in the design and conduct of systematic reviews is becoming better understood. Producers of systematic reviews focus increasingly on preventing potential biases in their reviews by developing explicit expectations for their conduct. For example, the Cochrane Collaboration has formally adopted the MECIR (Methodological Expectations of Cochrane Intervention Review) guidelines [4], and the US Institute of Medicine has recommended standards for conducting high-quality systematic reviews [5]. The development and adoption of the PRISMA statement [6,7] has led to improvements in reporting of systematic reviews. This helps readers to assess whether appropriate steps have been taken to minimize bias in the design and conduct of the review.

Several tools exist for undertaking critical appraisal and quality assessment of systematic reviews. Although none has become universally accepted, the AMSTAR tool is probably the most commonly used quality assessment tool for systematic reviews [8]. We are not aware of any tool designed specifically to assess the risk of bias in systematic reviews; all currently available tools have a broader objective of critical appraisal [8,9] or focus specifically on meta-analyses [10]. We developed the ROBIS tool, described in the following, to fill this gap in risk of bias assessment tools.

2. Development of ROBIS

Development of ROBIS was based on a four-stage approach [11]: define the scope, review the evidence base, hold a face-to-face meeting, and refine the tool through piloting.

2.1. Development stage 1—define the scope

We established a steering group of 11 experts in the area of systematic reviews. This group agreed on key features of the desired scope of ROBIS through regular teleconferences. The scope was further refined during the face-to-

face meeting and during a Delphi procedure which was also used to finalize tool content. We agreed that ROBIS would assess both the risk of bias in a review and (where appropriate) the relevance of a review to the research question at hand. Specifically, it addresses (1) the extent to which the research question addressed by the review matches the research question being addressed by its user (eg, an overview author or guideline developer) and (2) the degree to which the review methods minimized the risk of bias in the summary estimates and review conclusions. Evidence from a review may have “limited relevance” if the review question does not match the overview or guideline question. “Bias” occurs if systematic flaws or limitations in the design, conduct, or analysis of a review distort the review results or conclusions. The distinction between bias in the review (sometimes called “metabias”) and bias in the primary studies included in the review is important. A systematic review could be classed as low risk of bias even if the primary studies included in the review are all at high risk of bias, as long as the review has appropriately assessed and considered the risk of bias in the primary studies when drawing the review conclusions.

A key aim of the development of the ROBIS tool was that the tool structure be as generic as possible but initially focus on systematic reviews covering questions relating to effectiveness (interventions), etiology, diagnosis, and prognosis (see Box for examples of each review type). ROBIS should be usable by reviewers with different backgrounds, although it was accepted that some methodologic and/or content expertise would be required. The tool needed to be able to distinguish between reviews at high and low risk of bias. We defined the target audience of ROBIS as guideline developers, authors of overviews of systematic reviews (“reviews of reviews”), and review authors who might want to assess or avoid risk of bias in their reviews.

We agreed to adopt a domain-based structure similar to that used in tools designed to assess risk of bias in primary studies (eg, the Cochrane Risk of Bias tool [16], QUADAS-2 [17], ACROBAT-NRS [18], and PROBST [19]). We also agreed on a three-stage approach to assessing risk of bias/concerns regarding the review process: information used to support the judgment of risk of bias, signaling questions, and judgment. We decided that signaling questions should be answered as “yes,” “probably yes,” “probably no,” “no,” “no information.” Risk of bias is judged as “low,” “high,” or “unclear.”

2.2. Development stage 2—review of the evidence base

We used three different approaches to obtain evidence to inform the development of ROBIS. First, we classified the 80 MECIR conduct items [4] as relating to bias, variability/applicability, the reporting quality, or as being a “process” item (ie, items relating to how the review should be conducted from a practical perspective). For each of the 46 items classified as bias items, we developed a suggested

What is new?

- This article describes ROBIS, a new tool for assessing the risk of bias in systematic reviews (rather than in primary studies)

Key findings:

- ROBIS has been developed using rigorous methodology and is currently aimed at four broad categories of reviews mainly within healthcare settings: interventions, diagnosis, prognosis and aetiology.
- The tool is completed in 3 phases: (1) assess relevance (optional), (2) identify concerns with the review process and (3) judge risk of bias.
- Phase 2 covers four domains through which bias may be introduced into a systematic review: study eligibility criteria; identification and selection of studies; data collection and study appraisal; and synthesis and findings.
- Phase 3 assesses the overall risk of bias in the interpretation of review findings and whether this considered limitations identified in any of the Phase 2 domains.

What this adds to what was known?

- Systematic reviews are generally considered to provide the most reliable form of evidence to guide decision makers. Systematic flaws or limitations in the design or conduct of a review have the potential to bias results. Several tools exist for undertaking critical appraisal and quality assessment of systematic reviews but none specifically aim to assess the risk of bias in systematic reviews. We developed the ROBIS tool to fill this gap in risk of bias assessment tools.

What is the implication and what should change now?

- We hope that ROBIS will help improve the process of risk of bias assessment in overviews and guidelines, leading to more robust recommendations for improvements in patient care.

“signaling question.” Second, we reviewed 40 existing tools designed to assess the quality of systematic reviews or meta-analyses. We classified items included in the tools according to five areas of bias affecting systematic reviews (question/inclusion criteria, search, review process, synthesis, and conclusions) or as being unrelated to bias. We also recorded details on tool development, tool structure, and interrater reliability and considered how experience and

learning from existing tools might inform the development of ROBIS. Third, we conducted a review of overviews that had used the AMSTAR tool to assess the quality of systematic reviews. The aim of this review was to provide information on the requirements of potential users of ROBIS. Full details of the two reviews (on existing tools and overviews using the AMSTAR tool) will be reported separately. On the basis of the evidence accumulated from these three sources, we summarized information on the requirements of ROBIS and identified possible signaling questions for inclusion in the tool.

2.3. Development stage 3—face-to-face meeting of the ROBIS group

We held a 1-day face-to-face meeting on 17 September 2013 before the Cochrane Colloquium in Quebec City, Canada. The main objective of this meeting was to develop a first draft of ROBIS. The 21 attendees (including seven steering group members) were invited to provide input from a wide range of user stakeholders, including methodologic experts, experienced systematic reviewers, and guideline developers from different countries and different organizations. Ten invitees who were not able to attend were given the opportunity to contribute to the development of ROBIS through involvement in the Delphi process. We outlined the scope of the work and presented summaries of the evidence obtained through stage 2. Initial group discussions focused on whether ROBIS should be restricted to reviews of randomised clinical trials or be more generic in design, the definition of “bias” from the perspective of ROBIS, how we could achieve an overall risk of bias rating for a single review without using summary quality scores, whether conflict of interest/source of funding should be included in ROBIS, and the domains that the tool should cover. This was followed by small group discussions of four to five participants to review the signaling questions within each domain. On the basis of the outputs of this meeting and related feedback, the project leads produced a first draft of the ROBIS tool.

2.4. Development stage 4—pilot and refine

We used a modified Delphi process to finalize the scope and content of ROBIS. Online questionnaires were developed to gather structured feedback for each round. Participants in the Delphi process included members of the steering group who had not contributed directly to the development of that round of the survey, participants from the face-to-face meeting, and five additional methodologic experts who were not able to attend the face-to-face meeting. This resulted in a maximum number of respondents of 29 per round. After three rounds of the Delphi, we judged there to be sufficient agreement that no further rounds were necessary. Participants were sent the agreed draft version of ROBIS and given the opportunity to provide any final

Box. Examples of target questions and PICO equivalents for different types of systematic review

Review type	PICO equivalent	Example
Intervention [12]	Patients/population(s) Intervention(s) Comparator(s) Outcome(s)	Adults with chronic hepatitis C virus infection Triple antiviral therapy with pegylated interferon Dual antiviral therapy Sustained virologic response
Etiology [13]	Patients/population(s) Exposure(s) and comparator(s) Outcome(s)	Adults Body mass index Colorectal cancer
Diagnosis [14]	Patient(s) Index test(s) Reference standard Target condition	Adults with symptoms suggestive of rectal cancer Endoscopic ultrasound Surgical histology T0 stage of rectal cancer
Prognosis [15]	Patients	Pregnant women, with or without fetal growth restriction, no evidence of premature rupture of membranes, no evidence of congenital or structural anomalies
	Outcome to be predicted	Adverse pregnancy outcome (low or high birth weight, neonatal death, perinatal mortality)
	Intended use of model	To predicting the effect of ultrasound measurements of amniotic fluid on pregnancy outcome
	Intended moment in time	Late pregnancy (>37-wk gestation)

comments. A final draft version of the tool was then produced to be evaluated in the piloting stage of the project.

We held three workshops on ROBIS: two for systematic reviewers in York, UK (May and October 2014) and one at the Cochrane Colloquium in Hyderabad (September 2014). These gave participants the opportunity to pilot the tool and provide feedback on the practical issues associated with using the tool, which were then incorporated into the guidance document. Three independent pairs of reviewers working on overviews piloted a draft version of the tool and provided structured feedback. Information on interrater agreement was available for one pair of reviewers, who were independent of the tool developers, assessing eight reviews; four Cochrane reviews, and four non-Cochrane reviews. This gave information on 40 domain-rating pairs (five ROBIS domains assessed for eight reviews by two reviewers). The reviewers agreed on the ratings for 26 (65%) domains and disagreed for 14. Most disagreements arose from one reviewer assigning a rating of unclear and the other assigning a rating of high or low. There were only four domains (10%) for which one reviewer assigned a rating of high and the other assigned a rating of low. The reviewers agreed on all domain-level ratings for three of the eight reviews; these reviews were rated as low for all domains. The synthesis and findings domain caused the most disagreements in ratings. Three reviews were rated as low by both reviewers for this domain, there was disagreement in how to rate the other five reviews. All other domains were rated as low by both reviewers for at least five of the eight reviews. Agreement was greater for Cochrane reviews than for non-Cochrane reviews: for the 20 domain-rating pairs for Cochrane reviews, there were only two domains where the reviewers disagreed. There are two

possible explanations for this. The first is that it appears that there was better agreement for reviews judged to be at low risk of bias. The Cochrane reviews generally rated better on the ROBIS assessment, and so, it may be that they were easier to assess using ROBIS because they were at lower risk of bias. A second possible explanation is that Cochrane reviews usually contain more detailed information on review methods which may make it easier to apply ROBIS. This could suggest that difficulties in applying ROBIS are more down to limitations in reporting of reviews rather than to difficulties in applying the tool itself. This was supported by examining the “support for judgment” statements extracted by the two reviewers and the answers to the individual signaling questions which suggested that some of the discrepancies in domain-level ratings were the result of differences in how lack of reported information was handled by the two reviewers.

On the basis of the results of the piloting, we produced a final version of ROBIS and an accompanying guidance document.

3. The ROBIS tool

The full ROBIS tool and guidance documents are available from the ROBIS Web site (www.robis-tool.info) and as Appendices at www.jclinepi.com.

The tool is completed in three phases: (1) assess relevance (optional), (2) identify concerns with the review process, and (3) judge risk of bias in the review. Signaling questions are included to help assess specific concerns about potential biases with the review. The ratings from these signaling

Table 1. Summary of phase 2 ROBIS domains, phase 3, and signaling questions.

	Phase 2				Phase 3
	1. Study eligibility criteria	2. Identification and selection of studies	3. Data collection and study appraisal	4. Synthesis and findings	Risk of bias in the review
Signaling questions	<p>1.1 Did the review editors to predefined objectives and eligibility criteria?</p> <p>1.2 Were the eligibility criteria appropriate for the review question?</p> <p>1.3 Were eligibility criteria unambiguous?</p> <p>1.4 Were all restrictions in eligibility criteria based on study characteristics appropriate?</p> <p>1.5 Were any restrictions in eligibility criteria based on sources of information appropriate?</p>	<p>2.1 Did the search include an appropriate range of databases/ electronic sources for published and unpublished reports?</p> <p>2.2 Were methods additional to database searching used to identify relevant reports?</p> <p>2.3 Were the terms and structure of the search strategy likely to retrieve as many eligible studies as possible?</p> <p>2.4 Were restrictions based on date, publication format, or language appropriate?</p> <p>2.5 Were efforts made to minimize error in selection of studies?</p>	<p>3.1. Were efforts made to minimize error in data collection?</p> <p>3.2. Were sufficient study characteristics available for both review authors and readers to be able to interpret the results?</p> <p>3.3. Were all relevant study results collected for use in the synthesis?</p> <p>3.4. Was risk of bias (or methodologic quality) formally assessed using appropriate criteria?</p> <p>3.5. Were efforts made to minimize error in risk of bias assessment?</p>	<p>4.1. Did the synthesis include all studies that it should?</p> <p>4.2. Were all predefined analyses reported or departures explained?</p> <p>4.3. Was the synthesis appropriate given the nature and similarity in the research questions, study designs, and outcomes across included studies?</p> <p>4.4. Was between-study variation minimal or addressed in the synthesis?</p> <p>4.5. Were the findings robust, for example, as demonstrated through funnel plot or sensitivity analyses?</p> <p>4.6. Were biases in primary studies minimal or addressed in the synthesis?</p>	<p>A. Did the interpretation of findings address all of the concerns identified in domains 1 to 4?</p> <p>B. Was the relevance of identified studies to the review's research question appropriately considered?</p> <p>C. Did the reviewers avoid emphasizing results on the basis of their statistical significance?</p>
Judgment	Concerns regarding specification of study eligibility criteria	Concerns regarding methods used to identify and/or select studies	Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies	Concerns regarding the synthesis	Risk of bias in the review

questions help assessors to judge overall risk of bias. Table 1 summarizes the phase 2 domains, phase 3, and signaling questions within each domain. A detailed overview of each domain and guidance on how to rate each signaling question are provided in the guidance document.

3.1. ROBIS phase 1: assessing relevance (optional)

Assessors first report the question that they are trying to answer (eg, in their overview or guideline)—we have called this the “target question.” For effectiveness reviews, they are asked to define this in terms of the PICO (participants, interventions, comparisons, and outcomes). For reviews of different types of questions (eg, diagnostic test, prognostic factors, etiology, or prediction models), alternative categories are provided as appropriate (see Box). Assessors complete the PICO or equivalent for the systematic review to be assessed using ROBIS and are then asked whether the

two questions (target question and systematic review question) match. If one or more of the categories (PICO or equivalent) do not match, then this should be rated as “no.” If there is a partial match between categories, then this should be rated as “partial.” For example, if the target question relates to adults, the systematic review is restricted to participants aged >60 years. If a review is being assessed in isolation and there is no target question, then this phase of ROBIS can be omitted.

3.2. ROBIS phase 2: identifying concerns about bias in the review process

Phase 2 aims to identify areas where bias may be introduced into the systematic review. It involves the assessment of four domains to cover key review processes: study eligibility criteria; identification and selection of studies; data collection and study appraisal; and synthesis and findings.

This phase of ROBIS identifies areas of potential concern to help judge overall risk of bias in the final phase. Each domain comprises three sections: information used to support the judgment, signaling questions, and judgment of concern about risk of bias. The domains should be considered sequentially and not assessed as stand-alone units. For example, this means that, when assessing domain 2 (identification and selection of studies), the assessor should consider the searches in relation to the research question specified in domain 1.

The signaling questions are answered as “yes,” “probably yes,” “probably no,” “no,” and “no information,” with “yes” indicating low concerns. The subsequent level of concern about bias associated with each domain is then judged as “low,” “high,” or “unclear.” If the answers to all signaling questions for a domain are “yes” or “probably yes,” then level of concern can be judged as low. If any signaling question is answered “no” or “probably no,” potential for concern about bias exists. The “no information” category should be used only when insufficient data are reported to permit a judgment. By recording the information used to reach the judgment (“support for judgment”), we aim to make the rating transparent and, where necessary, facilitate discussion among review authors completing assessments independently. ROBIS users are likely to need both subject content and methodologic expertise to complete an assessment.

3.2.1. Domain 1: study eligibility criteria

The first domain aims to assess whether primary study eligibility criteria were prespecified, clear, and appropriate to the review question. A systematic review should begin with a clearly focused question or objective [1]. This should be reflected in the prespecification of criteria used for deciding whether primary studies are eligible for inclusion in the review. This prespecification aims to ensure that decisions about which studies to include are made consistently rather than on existing knowledge about the characteristics and findings of the studies themselves. It is usually only possible to assess whether eligibility criteria have been appropriately prespecified (and adhered to in the review) if a protocol or registration document is available which predates the conduct and reporting of the review. When no such document is available, assessors will need to base their judgment about this domain on the report of the review findings, making it difficult to know whether these criteria were actually stipulated in advance and governed what the reviewers did throughout the review, or whether they were decided or modified during the review process.

3.2.2. Domain 2: identification and selection of studies

This domain aims to assess whether any primary studies that would have met the inclusion criteria were not included in the review. A sensitive search to retrieve as many eligible studies as possible is a key component of any systematic review. Ideally, this search is carried out by or with guidance

from a trained information specialist. Unbiased selection of studies based on the search results helps to ensure that all relevant studies identified by the searches are included in the review. Searches should involve appropriate databases and electronic sources (which index journals, conferences, and trial records) to identify published and unpublished reports, include methods additional to database searching to identify reports of eligible studies (eg, checking references in existing reviews, citation searching, hand-searching) and use of an appropriate and sensitive search strategy. Search strategies should include free-text terms (eg, in the title and abstract) and any suitable subject indexing (eg, MeSH or Emtree) likely to identify relevant studies. It can be difficult to assess the sensitivity of a search strategy without methodologic knowledge relating to searching practice and content expertise relating to the review topic. In general, assessors should consider whether an appropriate range of terms is included to cover all possible ways in which the concepts used to capture the research question could be described.

The process of selecting studies for inclusion in the review once the search results have been compiled is also covered by this domain. This involves screening titles and abstracts and assessing full-text studies for inclusion. To minimize the potential for bias and errors in these processes, titles and abstracts should be screened independently by at least two reviewers and full-text inclusion assessment should involve at least two reviewers (either independently or with one performing the assessment and the second checking the decision).

3.2.3. Domain 3: data collection and study appraisal

The third domain aims to assess whether bias may have been introduced through the data collection or risk of bias assessment processes. Rigorous data collection should involve planning ahead at the protocol stage and using a structured data collection form that has been piloted. All data that will contribute to the synthesis and interpretation of results should be collected. These data should include both numerical and statistical data and more general primary study characteristics. If data are not available in the appropriate format required to contribute to the synthesis, review authors should report how these data were obtained. For example, primary study authors may be contacted for additional data. Appropriate statistical transformations may be used to derive the required data. Data extraction creates the potential for error. Errors could arise from mistakes when transcribing data or failing to collect relevant information that is available in a study report. Bias may also arise from the process of data extraction which is, by its nature, subjective and open to interpretation. Duplicate data extraction (or single data extraction with rigorous checking) is therefore essential to safeguard against random errors and potential bias [2].

Validity of included studies should be assessed using appropriate criteria given the design of the primary studies

included in the review [1,2]. This assessment may be carried out using a validated tool developed specifically for studies of the design being evaluated or may simply be a list of relevant criteria that may be important potential sources of bias. Whether a published tool or ad hoc criteria are used, the assessor should consider whether the criteria are sufficient to identify all important potential sources of bias in the included studies. As with data extraction, bias or error can occur in the process of risk of bias assessment. Risk of bias assessment should, therefore, involve two reviewers, ideally working independently but at a minimum, the second reviewer checking the decisions of the first reviewer.

3.2.4. Domain 4: synthesis and findings

This domain aims to assess whether, given a decision has been made to combine data from the included primary studies (either in a quantitative or nonquantitative synthesis), the reviewers have used appropriate methods to do so. Approaches to synthesis depend on the nature of the review question being addressed and on the nature of the primary studies being synthesized. For randomised clinical trials, a common approach is to take a weighted average of treatment effect estimates (on the logarithmic scale for ratio measures of treatment effect), weighting by the precisions of the estimates [20]. Either fixed-effect or random-effect models can be assumed for this. However, there are many variants and extensions to this, with the options of modeling outcome data explicitly (for example, taking a logistic regression approach for binary data [21], of modeling two or more outcomes simultaneously (bivariate or multivariate meta-analysis [22], of modeling multiple treatment effects simultaneously (network meta-analysis [23]), or of modeling variation in treatment effects (metaregression [24]), and these can be combined, making the synthesis very complex. Similar options are available for other types of review questions. For diagnostic test accuracy, a bivariate approach has become standard, in which sensitivity and specificity are modeled simultaneously to take account of their correlation [25]. For some reviews, a statistical synthesis may not be appropriate and instead a nonquantitative or narrative overview of results should be reported.

Some of the most important aspects to consider in any synthesis (either quantitative or nonquantitative) are (1) whether the analytic approach is appropriate for the research question posed; (2) whether between-study variation (heterogeneity) is taken into account; (3) whether biases in the primary studies are taken into account; (4) whether the information from the primary studies being synthesized is complete (particularly if there is a risk that missing data are systematically different from available data, for example, because of publication or reporting bias); and (5) whether the reviewers have introduced bias in the way that they report their findings. Technical aspects of the meta-analysis method, such as the choice of estimation method, are unlikely to be an important consideration. However, mistakes may be important, such as interpreting

standard errors as standard deviations, failing to adjust for design issues such as matched or clustered data, or applying the standard weighted-average approach to risk ratios rather than their logarithms.

3.3. ROBIS phase 3: judging risk of bias

The final phase considers whether the systematic review as a whole is at risk of bias. This assessment uses the same structure as the separate phase 2 domains, including signaling questions and information used to support the judgment, but the judgment regarding concerns about bias is replaced with an overall judgment of risk of bias. The first signaling question for this phase asks whether the interpretation of findings addresses all the concerns identified in domains 1 to 4. If no concerns were identified, then this can be rated as “yes.” If one or more concerns were identified for any of the previous domains but these were appropriately considered when interpreting results and drawing conclusions, then this may also be rated as “yes,” and depending on the rating of the other signaling questions, the review may still be rated as “low risk of bias.” This phase also includes a further three signaling questions relating to the interpretation of the review findings.

3.4. Presenting ROBIS assessments

At a minimum, overviews and guidelines should summarize the results of the ROBIS assessment for all included systematic reviews. This could include summarizing the number of systematic reviews that had a low, high, or unclear concern for each phase 2 domain and the number of reviews at high or low risk of bias. Where used, a summary of the relevance assessment should be provided. Reviewers may choose to highlight particular signaling questions on which systematic reviews consistently rated poorly or well. Tabular (Table 2) and graphic (Fig. 1) displays may be useful for summarizing ROBIS assessments across multiple reviews. When using the graphical display, reviewers may consider it more appropriate to weight this figure on the basis of the number of studies included in the review, or the total number of participants in each review, rather than simply on individual reviews. Alternatively, reviewers or guideline developers may choose to include only the review that is most relevant to their target question and at lowest risk of bias. We have also suggested a graphical display to present the results of a ROBIS assessment (each domain rating and overall rating) for a single review (Fig. 2). We emphasize that ROBIS should not be used to generate a summary “quality score” because of the well-known problems associated with such scores [26,27].

4. Discussion

ROBIS is the first rigorously developed tool designed specifically to assess the risk of bias in systematic reviews.

Table 2. Suggested tabular presentation for ROBIS results.

Review	Phase 2				Phase 3
	1. Study eligibility criteria	2. Identification and selection of studies	3. Data collection and study appraisal	4. Synthesis and findings	Risk of bias in the review
1	●	●	●	●	●
2	●	●	●	●	●
3	●	●	●	●	●
4	●	●	●	●	●
5	●	?	●	●	●
6	●	?	●	●	●
7	●	●	●	●	●
8	●	●	●	●	●
9	●	●	●	●	●
10	●	●	●	●	●
11	●	●	●	●	●

● = low risk; ● = high risk; and ? = unclear risk.

The use of a domain-based approach supported by signaling questions follows the most recent methods for developing risk of bias tools. We hope that ROBIS will help improve the process of risk of bias assessment in overviews and guidelines, leading to more robust recommendations for improvements in patient care.

We feel that the approach adopted for the development of ROBIS has a number of strengths. The smaller steering group enabled us to have initial focused discussions regarding the desired scope of ROBIS. We then involved a wider group through the face-to-face meeting and subsequent Web-based Delphi procedure, building on the existing evidence base summarized from our initial evidence reviews. The wider ROBIS group aimed to include all potential user stakeholders such as methodologic experts, systematic reviewers, and guideline developers from a variety of countries and organizations to ensure that ROBIS would meet the needs of all potential users. To avoid excluding potential stakeholders who could not attend the face-to-face meeting, we invited them to participate in the development process through involvement in the Web-based Delphi survey. Initial piloting of ROBIS involved workshops in York and at the Cochrane Colloquium and through volunteers using the tool in their reviews. A potential limitation of our piloting of the tool is that, to date, this has mainly been done by those

undertaking overviews of reviews. We are now working with a range of guideline developers who are using the tool, and we will continue to target these groups in future user-testing activities. Further refinement to the guidance documents will continue, and we invite further comment and feedback via the ROBIS Web site and have developed a Web-based survey for this purpose. We plan to use the soon-to-be-launched LATITUDES Network (www.latitudes-network.org) to gather further feedback and increase awareness of ROBIS. LATITUDES is a new initiative similar to the EQUATOR Network that aims to increase the use of key risk of bias assessment tools, help people to use these tools more effectively, improve incorporation of results of the risk of bias assessment into the review, and to disseminate best practice in risk of bias assessment. We hope that LATITUDES will highlight ROBIS as the key risk of bias tool for the assessment of risk of bias in systematic review.

ROBIS is currently aimed at four broad categories of reviews mainly within health care setting, those covering: interventions, diagnosis, prognosis, and etiology. As we build experience of using ROBIS in these reviews, we will consider whether it is appropriate to expand ROBIS to other types of review, including to areas outside health care, and if so whether any modifications are needed either to the tool itself or to the accompanying guidance documents.

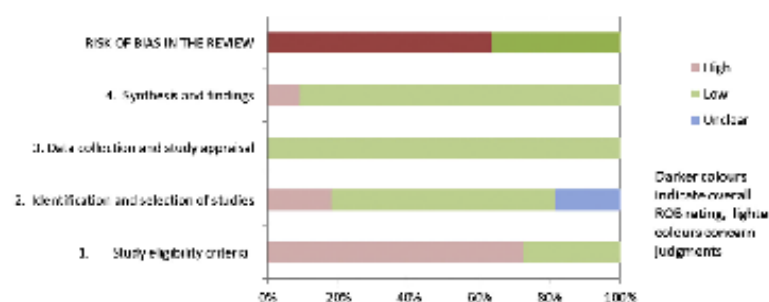


Fig. 1. Suggested graphical presentation for ROBIS results from multiple reviews.

- adverse pregnancy outcome: systematic review and meta-analysis. *BJOG* 2014;121:586–99.
- [16] Higgins JPT, Altman DG, Gøtzsche PC, Moher D, Oxman AD, Savovic J, et al. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomized trials. *BMJ* 2011;343:d5928.
- [17] Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med* 2011;155: 529–36.
- [18] Sterne JAC, Higgins JPT, Reeves BC, on behalf of the development group for ACROBAT-NRSI. A Cochrane Risk of Bias Assessment Tool: for Non-Randomized Studies of Interventions (ACROBAT-NRSI), Version 1.0.0, 2014. Available at <http://www.riskofbias.info>. Accessed January 7, 2015.
- [19] Wolf R. PROBAST. 2014. Available at: www.systematic-reviews.com/probast. Accessed January 7, 2015.
- [20] Borenstein M, Hedges I, Higgins J, Rothstein H. Introduction to meta-analysis. Chichester, UK: Wiley; 2009.
- [21] Simmonds MC, Higgins JP. A general framework for the use of logistic regression models in meta-analysis. *Stat Methods Med Res* 2014. [Epub ahead of print].
- [22] Mavridis D, Salanti G. A practical introduction to multivariate meta-analysis. *Stat Methods Med Res* 2013;22:133–58.
- [23] Lu G, Ades AE. Combination of direct and indirect evidence in mixed treatment comparisons. *Stat Med* 2004;23:3105–24.
- [24] Thompson SG, Higgins JP. How should meta-regression analyses be undertaken and interpreted? *Stat Med* 2002;21:1559–73.
- [25] Leeftang MM, Deeks JJ, Gatsonis C, Bossuyt PM. Cochrane diagnostic test accuracy working group. Systematic reviews of diagnostic test accuracy. *Ann Intern Med* 2008;149:889–97.
- [26] Juni P, Witschi A, Bloch R, Egger M. The hazards of scoring the quality of clinical trials for meta-analysis. *JAMA* 1999;282: 1054–60.
- [27] Whiting P, Harbord R, Kleijnen J. No role for quality scores in systematic reviews of diagnostic accuracy studies. *BMC Med Res Methodol* 2005;5:19.

**ANEXO E – ROBIS – RISK OF BIAS IN SYSTEMATIC REVIEWS: FERRAMENTA
PARA AVALIAR O RISCO DE VIÉS EM REVISÕES SISTEMÁTICAS:
ORIENTAÇÕES DE USO (TRADUÇÃO NÃO VALIDADA).**

MINISTÉRIO DA SAÚDE

**ROBIS – Risk of Bias in Systematic Reviews: ferramenta para avaliar
o risco de viés em revisões sistemáticas: orientações de uso**

Brasília – DF
2017



MINISTÉRIO DA SAÚDE

ROBIS – Risk of Bias in Systematic Reviews:
Ferramenta para avaliar o risco de viés em revisões sistemáticas
Orientações de uso

Brasília – DF
2017



2017 Ministério da Saúde.



Esta obra é disponibilizada nos termos da Licença Creative Commons – Atribuição – Não Comercial – Compartilhamento pela mesma licença 4.0 Internacional. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte.

A coleção Institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: <www.saude.gov.br/bvs>.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do termo de cooperação entre o Departamento de Ciência e Tecnologia e a Organização Pan-Americana da Saúde.

Tiragem: 1ª edição – 2017 – 300 exemplares

Elaboração, distribuição e informações:

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos
Departamento Ciência e Tecnologia
Esplanada dos Ministérios, Bloco G, Ed. Sede, 2ª andar, sala 207
CEP: 70.058-900 – Brasília/DF
Tel: (61) 3315-8972
Site: www.saude.gov.br
E-mail: rsbrats@saude.gov.br

Organização e Tradução:

Betânia Ferreira Leite (Dect/SCIE/MS)
Dalla Fernandes Gomes (Dect/SCIE/MS)
Fabiana Araújo Figueiredo da Mata (Dect/SCIE/MS)
Luciana Simões Camara Leão (Dect/SCIE/MS)

Revisão Técnica:

Ailton Steio (GHC/ UFCSPA)
Erica Eli (Dect/SCIE/MS)
Priscilla Perez de Silva Pereira (UNIR)
Samantha Lemos Turte-Cavadinha (Dect/SCIE/MS)
Tais Freire Galvão (Unicamp)

Editoração:

Ellena Carlan (Dect/SCIE/MS)
Jessica Alves Rippef (Dect/SCIE/MS)

Design Gráfico:

Gustavo Velga (Dect/SCIE/MS)

Normalização:

Luciana Canqueira Brito (Editora MS/CGDI)

Impresso no Brasil/Printed in Brazil

Ficha Catalográfica

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia.

ROBIS – Risk of Bias in Systematic Reviews: ferramenta para avaliar o risco de viés em revisões sistemáticas: orientações de uso / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tecnologia. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017.

52 p. : il.

ISBN 978-85-334-2536-1

1. Medição de risco. 2. Pesquisa em saúde. 3. Tecnologias em saúde. I. Título.

CDU 614(81)

Catálogo na fonte – Coordenação-Geral de Documentação e Informação – Editora MS – OS 2017/0528

Título para indexação:

ROBIS: Tool to assess risk of bias in systematic reviews: guidance on how to use ROBIS

O grupo ROBIS

O desenvolvimento da ferramenta ROBIS foi liderado por Penny Whiting e Rachel Churchill. A ROBIS foi desenvolvida especificamente para avaliar o risco de viés em revisões sistemáticas. O grupo de trabalho, composto por 29 especialistas em revisões sistemáticas, contribuiu para o desenvolvimento da ferramenta. Todos concordaram com o escopo, estrutura e conteúdo da ferramenta durante uma reunião presencial e método Delphi.

Grupo de trabalho da ferramenta ROBIS

Penny Whiting (University of Bristol)
 Rachel Churchill (University of Bristol)
 Jelena Savović (University of Bristol)
 Julian Higgins (University of Bristol)
 Deborah Caldwell (University of Bristol)
 Barnaby Reeves (University of Bristol)
 Beverley Shea (University of Ottawa)
 Philippa Davies (University of Bristol)
 Jos Kleijnen (Kleijnen Systematic Reviews Ltd, Maastricht University)
 David Tovey (Cochrane Editorial Unit)
 Peter Tugwell (University of Ottawa)
 Lars Beckmann (Institute for Quality and Efficiency in Health Care [IQWiG], Cologne, Germany)
 Patrick Bossuyt (University of Amsterdam)
 Kay Dickersin (US Cochrane Center)
 Kerry Dwan (University of Liverpool)
 Julie Glanville (York Health Economics Consortium, University of York)
 Julia Kreis (Institute for Quality and Efficiency in Health Care [IQWiG], Cologne, Germany)
 Toby Lasserson (Cochrane Editorial Unit)
 Fergus Macbeth (Wales Cancer Trials Unit)
 Silvia Minozzi (Lazio Regional Health Service)
 Karel GM Moons (University of Utrecht)
 Matthew Page (Monash University)
 Nancy Santesso (McMaster University)
 Christopher H Schmid (Brown University)
 Beth Shaw (NICE)
 Meera Viswanathan (RTI International)
 Jasvinder Singh (University of Alabama at Birmingham & Birmingham Veterans Affairs Medical Center)
 George Wells (University of Ottawa)
 Robert Wolff (KSR York Ltd.)

Como referenciar a ferramenta ROBIS original

Whiting P, Savović J, Higgins JP, Caldwell DM, Reeves BC, Shea B, Davies P, Kleijnen J, Churchill R. ROBIS: a new tool to assess risk of bias in systematic reviews was developed. *Journal of clinical epidemiology*. 2016 Jan 31;69:225-34.

/// Lista de Quadros

Quadro 1 – Exemplos de questões-alvo e PICO/equivalente para diferentes tipos de revisões sistemáticas	11
Quadro 2 – Exemplo de avaliação da relevância	12
Quadro 3 – Questões norteadoras referentes ao Domínio 1 e orientações para respostas	14
Quadro 4 – Potencial risco de viés relacionado à especificação dos critérios de elegibilidade	16
Quadro 5 – Exemplo de classificação para critérios de elegibilidade julgados como de alto potencial de viés	16
Quadro 6 – Exemplo de classificação para critérios de elegibilidade julgados como de baixo potencial de viés	18
Quadro 7 – Questões norteadoras referentes ao Domínio 2 e orientações para respostas	21
Quadro 8 – Potencial de viés relacionado aos métodos utilizados para identificar e/ou selecionar estudos	22
Quadro 9 – Exemplo de classificação para estratégia de busca julgada como de alto potencial de viés	22
Quadro 10 – Exemplo de classificação para estratégia de busca julgada como de baixo potencial de viés	23
Quadro 11 – Questões norteadoras referentes ao Domínio 3 e orientações para respostas	25
Quadro 12 – Potencial de viés relacionado aos métodos utilizados para coletar dados e avaliar os estudos	27
Quadro 13 – Exemplo de classificação para coleta de dados e avaliação do estudo julgado como de alto potencial de viés	27

Quadro 14 – Exemplo de classificação para coleta de dados e avaliação do estudo julgada como de baixo potencial de viés	28
Quadro 15 – Questões norteadoras referentes ao Domínio 4 e orientações para respostas	30
Quadro 16 – Potencial de viés relacionado aos métodos utilizados para sintetizar resultados	33
Quadro 17 – Exemplo de classificação para síntese julgada como de alto potencial de viés	33
Quadro 18 – Exemplo de classificação para síntese de resultados julgada como de baixo potencial de viés	34
Quadro 19 – Questões norteadoras referentes à fase 3 e orientações para respostas	37
Quadro 20 – Riscos de viés relacionados aos métodos utilizados na identificação e/ou seleção dos estudos	38
Quadro 21 – Quadro resumo dos potenciais vieses identificados durante a Fase 2	38
Quadro 22 – Exemplo de classificação para síntese de resultados julgada como de alto potencial de viés	40
Quadro 23 – Quadro resumo dos potenciais de vieses identificados durante a Fase 2	40
Quadro 24 – Exemplo de classificação para síntese de resultados julgada como de baixo potencial de viés	42

SUMÁRIO

A ferramenta ROBIS	9
Definição de risco de viés	9
Público-alvo	9
Fase 1: Avaliação da relevância (opcional)	11
Exemplo de avaliação da relevância	12
Fase 2: Identificação dos potenciais riscos de viés durante o processo da revisão	13
Domínio 1: Critérios de elegibilidade dos estudos	13
Exemplos de classificação.....	16
Domínio 2: Identificação e seleção dos estudos.....	19
Exemplos de classificação.....	22
Domínio 3: Coleta de dados e avaliação do estudo	24
Exemplos de classificação.....	27
Domínio 4: Síntese e resultados.....	29
Exemplos de classificação	33
Fase 3: Avaliação do risco de viés geral	37
Exemplos de classificação	38
Considerações práticas ao utilizar a ROBIS	42
Referências	43
Glossário	45
Anexo	47

A ferramenta ROBIS

A ROBIS (Risk of Bias in Systematic Reviews) é uma ferramenta para avaliar risco de viés de revisões sistemáticas. A ferramenta está estruturada em três fases: 1) avaliação da relevância (opcional); 2) identificação dos potenciais riscos de viés durante o processo da revisão; e 3) avaliação do risco de viés geral. A ROBIS contém questões norteadoras que auxiliam na avaliação crítica. A partir da classificação obtida por meio destas questões, os avaliadores são capazes de julgar o risco de viés geral da revisão.

Definição de risco de viés

A ROBIS avalia tanto o risco de viés da revisão quanto a relevância da pergunta de pesquisa a ser respondida. A ferramenta aborda especificamente: 1) se os métodos utilizados na revisão sistemática minimizaram o risco de viés das estimativas sumarizadas e das conclusões; e 2) se a pergunta de pesquisa de cada revisão avaliada se assemelha à pergunta de pesquisa a ser respondida, por exemplo, por uma *overview* de revisões sistemáticas ou por uma diretriz. O viés ocorre quando erros sistemáticos ou limitações no delineamento, na condução ou na análise da revisão influenciam os resultados. A evidência de uma revisão pode ter relevância limitada se a questão da revisão não corresponder à pergunta da *overview*/diretriz.

Público-alvo

A ROBIS foi desenvolvida pensando em três grupos específicos de usuários:

- Autores de *overview* de revisões sistemáticas;
- Elaboradores de diretrizes;
- Revisores que desejem avaliar o risco de viés em revisões sistemáticas ou minimizar o risco de viés ao planejar os métodos de revisão na fase de protocolo.

Outros possíveis usuários da ROBIS incluem organizações que apoiam a tomada de decisões (National Institute for Health and Care Excellence – NICE, Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen – IQWiG), profissionais da área da saúde com interesse em medicina baseada em evidências, editores de revistas e revisores de manuscritos.

▮ Fase 1: Avaliação da relevância (opcional)

Os avaliadores primeiro reportam a pergunta que estão tentando responder (na *overview* ou na diretriz), o que chamamos de “questão alvo”. Se uma revisão está sendo avaliada isoladamente e não há uma questão-alvo, esta fase da ROBIS pode ser omitida. Para revisões de eficácia ou efetividade é solicitada a definição da pergunta conforme o acrônimo PICO (participantes, intervenções, comparadores e resultados). Para outras revisões, como teste de diagnóstico, fatores prognósticos, etiologia ou modelos de predição são considerados outros tipos de perguntas com categorias alternativas (ver Quadro 1).

Quadro 1 – Exemplos de questões-alvo e PICO/equivalente para diferentes tipos de revisões sistemáticas

Tipo de revisão	Pico/equivalente	Exemplo
Intervenção ¹	Pacientes/População: Intervenção: Comparador: Desfecho:	Adultos com hepatite C crônica Terapia tripla antiviral com alfa peginterferona Terapia dupla antiviral Resposta virológica
Etiologia ²	Pacientes/População: Exposição e comparador: Desfecho:	Adultos Índice de massa corporal Câncer colorretal
Diagnóstico ³	Pacientes/População: Teste índice: Padrão de referência: Condição Alvo:	Adultos com sintomas sugestivos de câncer retal Ecografia endoscópica Histologia cirúrgica Câncer retal inicial
Prognóstico ⁴	Pacientes/População: Predição de desfecho: Modelo pretendido: Momento pretendido no tempo:	Mulheres grávidas, com ou sem restrição de crescimento fetal, sem evidência de ruptura prematura das membranas e ausência de anomalias congênitas ou estruturais Desfechos adversos na gravidez (baixo ou alto peso ao nascer, morte neonatal e mortalidade perinatal) Predição Gravidez tardia (>37 semanas)

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.*

Os avaliadores completam o PICO ou equivalente usando a ROBIS e, então, comparam o PICO da pergunta a ser respondida (questão alvo) e o PICO da pergunta da revisão sistemática a fim de verificar se são correspondentes. Se uma ou mais categorias das perguntas não forem correspondentes, esta fase deve ser classificada como “Não”. Se há uma correspondência parcial entre as categorias, esta fase deverá ser classificada como “Incerta”. Por exemplo, se a questão-alvo se refere a adultos, mas a revisão sistemática é restrita a participantes com mais de 60 anos.

* Disponível em: <<http://www.bristol.ac.uk/population-health-sciences/projects/robis/>>.

Exemplo de avaliação da relevância³

Para revisão de estudo sobre diagnóstico:

Quadro 2 – Exemplo de avaliação da relevância

Categoria	Questão-alvo	Revisão que está sendo avaliada ⁴
Pacientes	Adultos com sintomas sugestivos de câncer retal	Incerta
Teste índice(s)	Ecografia endoscópica	Ecografia endoscópica
Referência padrão	Histologia cirúrgica	Cirurgia
Condição alvo	Câncer retal precoce	Câncer retal precoce

Avaliação da relevância		Justificativa
A questão abordada pela revisão corresponde à pergunta que você está tentando responder, por exemplo: na <i>overview</i> ou diretriz?	Incerta	A pergunta coincide com as categorias teste índice, padrão de referência e condição alvo, mas a população não foi definida na revisão e, portanto, não está claro se a questão abordada pela revisão corresponde à questão-alvo.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

/// Fase 2: Identificação dos potenciais riscos de viés durante o processo da revisão

13

A Fase 2 tem como objetivo identificar áreas onde o viés pode ser introduzido na revisão sistemática. Envolve a avaliação de quatro domínios para cobrir os principais processos da revisão: 1) critérios de elegibilidade dos estudos; 2) identificação e seleção; 3) coleta de dados e avaliação dos estudos; e 4) síntese e resultados. Nesta fase, a ROBIS identifica as principais limitações do estudo para auxiliar a avaliação do risco de viés na fase final. Cada um dos quatro domínios da ferramenta compreende três seções: 1) informação usada para subsidiar a avaliação; 2) questões norteadoras; e 3) avaliação do potencial risco de viés. Os domínios devem ser considerados sequencialmente e não avaliados isoladamente. Isso significa que, ao avaliar o domínio 2 (identificação e seleção dos estudos), o avaliador deve considerar a estratégia de busca em relação à questão de pesquisa apresentada no domínio 1.

As questões norteadoras são respondidas como “Sim”, “Provavelmente Sim”, “Provavelmente Não”, “Não” e “Sem informações”, com “Sim” indicando baixo potencial de risco de viés. O risco potencial de viés associado com cada domínio será avaliado em seguida como “Baixo”, “Alto” ou “Incerto”. Se as respostas de todas as questões norteadoras para um domínio são “Sim” ou “Provavelmente Sim”, então o potencial risco de viés pode ser avaliado como baixo. Se alguma questão norteadora for respondida como “Não” ou “Provavelmente Não” o risco de viés poderá ser classificado como alto. A categoria “Sem Informação” deve ser usada somente quando os dados reportados forem insuficientes para permitir um julgamento. Ao registrar as informações utilizadas para subsidiar a avaliação, pretendemos tornar a classificação transparente e, quando necessário, facilitar a discussão entre os avaliadores da revisão. É provável que os usuários da ROBIS necessitem de conteúdo e de conhecimentos metodológicos para concluir uma avaliação.

Domínio 1 – Critérios de elegibilidade dos estudos

O primeiro domínio objetiva avaliar se os critérios de elegibilidade dos estudos foram especificados previamente, esclarecidos e apropriados para a pergunta da revisão. Uma revisão sistemática deve, primeiramente, apresentar uma pergunta ou um objetivo claro⁵ que devem estar refletidos nos critérios de inclusão da revisão. Assim, haverá uma maior probabilidade de as decisões sobre a inclusão de estudos serem realizadas de maneira mais consistente, evitando-se que sejam feitas com base em conhecimentos prévios sobre os resultados ou em características dos estudos a serem incluídos. Normalmente, só é possível avaliar se os critérios de inclusão foram previamente especificados se houver registro de protocolo da revisão com data anterior à realização e elaboração da revisão sistemática.

Os critérios de elegibilidade combinam aspectos da pergunta de pesquisa com os delineamentos dos estudos que a revisão irá considerar. Idealmente, as características dos estudos elegíveis devem ser específicas e englobar a população/participantes envolvidos, a exposição ou intervenção avaliada e as comparações realizadas. Autores de revisões sistemáticas frequentemente impõem restrições nos critérios de elegibilidade, tais restrições devem ser julgadas como apropriadas ou não pelos revisores. Por exemplo, as revisões podem ter restringido a inclusão dos estudos com base em algumas características dos próprios estudos, tais quais, ter selecionado apenas aqueles com os desfechos de interesse, que atenderam a critérios específicos de qualidade ou que foram conduzidos em datas específicas. Da mesma forma, restrições às fontes de informações podem também ser impostas quando uma revisão registra que apenas estudos disponíveis na íntegra ou no idioma inglês serão selecionados. Quaisquer restrições relacionadas à inclusão dos estudos necessitam ser reportadas e justificadas no texto. Em certas circunstâncias, estas restrições podem introduzir vieses na seleção de estudos elegíveis para a revisão.

O Quadro 3 resume as questões norteadoras do Domínio 1 e descreve orientações para resposta de cada questão. O Quadro 4 indica uma visão geral dos níveis de classificação para o Domínio 1. Exemplos da classificação para este domínio (potencial alto e baixo de viés) estão descritos nos Quadros 5 e 6.

Quadro 3 – Questões norteadoras referentes ao Domínio 1 e orientações para respostas

Questões norteadoras	Orientações para respostas
1.1 Os objetivos e critérios de elegibilidade foram definidos previamente?	Uma revisão sistemática precisa, primeiramente, conter uma pergunta ou um objetivo claro que estejam refletidos nos critérios utilizados para decidir se os estudos são elegíveis para inclusão. As informações que devem estar detalhadas <i>a priori</i> no protocolo de uma revisão, geralmente incluem delineamentos dos estudos, participantes e tipos de exposições ou intervenções elegíveis (estas informações podem variar de acordo com tipo de revisão). Quaisquer exclusões devem ser especificadas previamente. Se um protocolo com estas informações for disponibilizado, a resposta para esta questão será "Sim". Se não for disponibilizado um protocolo, mas houver informações sobre objetivos pré-definidos, detalhamento dos critérios de elegibilidade e razões suficientes para acreditar que estes critérios foram especificados antes do início da revisão sistemática, a resposta a esta questão pode ser "Provavelmente Sim". Qualquer mudança <i>post hoc</i> aos critérios de elegibilidade e desfechos devem manter-se alinhados aos objetivos da revisão e devem ser justificados e documentados. No caso de não haver um protocolo previamente publicado com informações sobre objetivos e critérios de elegibilidade pré-definidos, estando disponíveis apenas <i>post hoc</i> na revisão, a resposta a esta questão deve ser "Provavelmente não"; a menos que haja motivos para acreditar que estas informações tenham sido especificadas e definidas previamente. Nos casos em que todas ou algumas dessas informações estiverem faltantes, a resposta a esta questão deve ser "Não".

Continua

Conclusão

Questões norteadoras	Orientações para respostas
1.2 Os critérios de elegibilidade eram apropriados à pergunta da revisão?	Os critérios de elegibilidade devem ser provenientes da pergunta e devem fornecer informações que permitam o julgamento sobre a adequação dos estudos incluídos à questão da revisão. É provável que a informação requerida varie de acordo com a pergunta da revisão. Por exemplo, para julgar a adequação, o avaliador pode precisar de uma descrição clara da população em termos de mínimo e máximo de idades, diagnósticos dos participantes, local de realização, dosagem da droga, ou frequência a uma determinada exposição. Provavelmente o avaliador terá que ter algum conhecimento sobre o tema para responder a esta questão.
1.3 Os critérios de elegibilidade foram bem especificados (sem ambiguidade)?	Informações detalhadas sobre as características dos estudos elegíveis devem ser fornecidas para evitar quaisquer ambiguidades sobre tipos de estudo, população, intervenções, comparadores e desfechos. Os critérios devem ser detalhados a ponto de a revisão poder ser replicada com base nos critérios especificados. Algumas informações importantes geralmente são omitidas dos critérios de inclusão em revisões sistemáticas. Por exemplo, informações sobre o diagnóstico dos participantes. Os diagnósticos podem ser obtidos a partir de uma variedade de métodos, alguns mais válidos e acurados que outros. Os autores da revisão devem decidir previamente quais são os métodos diagnósticos apropriados para a pergunta de pesquisa, a fim de evitar a introdução de viés durante o processo da revisão. Da mesma forma, informações específicas sobre intervenções/exposições e comparadores devem ser fornecidas, incluindo-se dosagem da medicação, frequência de administração, tratamentos concorrentes etc. Provavelmente o avaliador terá que ter algum conhecimento sobre o tema para responder a esta questão. No entanto, se dúvidas específicas permanecerem sobre os critérios de elegibilidade, esta questão será geralmente respondida como "Não" ou "Provavelmente Não".
1.4 Com relação aos critérios de elegibilidade, as restrições baseadas nas características dos estudos foram apropriadas?	Quaisquer restrições aplicadas com referência às características dos estudos devem ser claramente descritas. Estas informações permitirão aos avaliadores julgarem se as restrições foram apropriadas. Exemplos de tais restrições podem ser: delineamento, data de publicação, tamanho da amostra e qualidade do estudo, além de desfechos disponíveis. Esta questão é diferente da questão 1.3 que se refere a se os critérios de elegibilidade são apropriados à pergunta da revisão. Quando há informações suficientes e o avaliador está razoavelmente convencido que as restrições são adequadas, esta questão deve ser respondida com "Sim" ou "Provavelmente Sim". Quando as restrições relacionadas às características dos estudos não são justificadas e há informações insuficientes para julgar se essas restrições são apropriadas, esta questão deve ser respondida com "Provavelmente Não" ou "Não". Quando os critérios de elegibilidade são suficientemente detalhados e não há restrições quanto às características do estudo, esta questão deve ser respondida como "Sim".
1.5 Com relação aos critérios de elegibilidade, as restrições baseadas nas fontes de informações foram apropriadas?	Qualquer restrição aplicada com referência às fontes de informações deve ser claramente descrita e fornecida a razão para tanto. Esta informação permitirá aos avaliadores julgarem se as restrições foram apropriadas. Exemplos podem ser: status ou formato de publicação, idioma e disponibilização de dados. Esta questão é diferente da questão do Domínio 2 que se refere a restrições de pesquisas. Quando os critérios de elegibilidade são suficientemente detalhados e não há restrições quanto às fontes de informação, esta questão deve ser respondida como "Sim".

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

Quadro 4 – Potencial risco de viés relacionado à especificação dos critérios de elegibilidade

Baixo	Nota-se que esforços foram realizados para deixar a pergunta e os objetivos da revisão bem definidos e para justificar que critérios de elegibilidade adequados foram preconizados na revisão.
Alto	Estudos que seriam importantes para responder à pergunta de pesquisa foram provavelmente excluídos da revisão pelos possíveis motivos: falta de objetivos e critérios de elegibilidade previamente especificados, imposição de restrições inapropriadas ou porque estudos inadequados para responder a pergunta de pesquisa foram incluídos.
Incerto	As informações disponíveis são insuficientes para fazer julgamento sobre o risco de viés.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

Exemplos de classificação

a) Revisão classificada como de “alto potencial de viés” em relação aos critérios de elegibilidade dos estudos³

Descrição do texto:

Objetivo:

Avaliar a acurácia do ultrassom endoscópico no estágio T de câncer retal Inicial.³

Crítérios de seleção dos estudos:

Apenas estudos com ultrassom endoscópico confirmado por histologia cirúrgica foram selecionados. O critério de ultrassom endoscópico utilizados para T0 (estágio inicial) foi tumor restrito à mucosa. Desta seleção, apenas estudos que permitissem a construção de uma tabela 2x2 para valores verdadeiro-positivo, falso-positivo, falso-negativo e verdadeiro-positivo foram incluídos.³

Quadro 5 – Exemplo de classificação para critérios de elegibilidade julgados como de alto potencial de viés

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
1.1 Os objetivos e critérios de elegibilidade foram definidos previamente?	Sem informação.	Não houve evidência de que os objetivos e critérios de elegibilidade foram previamente especificados.
1.2 Os critérios de elegibilidade eram apropriados à pergunta da revisão?	Provavelmente não.	Os critérios de elegibilidade foram apropriados, mas algumas informações estavam incompletas, particularmente em relação à população. Portanto, não foi possível julgar se os critérios de elegibilidade eram apropriados.
1.3 Os critérios de elegibilidade foram bem especificados (sem ambiguidade)?	Provavelmente não.	Não houve detalhamento suficiente dos critérios de elegibilidade. Em particular, não houve detalhamento sobre que populações ou delineamentos de estudos foram elegíveis.

Continua

ROBIS - Risk of Bias in Systematic Reviews: instrumento para avaliar o risco de viés em revisões sistemáticas: orientações de uso
Conclusão

Condição alvo	Câncer retal precoce	Câncer retal precoce
1.4 Com relação aos critérios de elegibilidade, as restrições baseadas nas características dos estudos foram apropriadas?	Sem informação.	Não foram fornecidos detalhes sobre restrições relacionadas às características dos estudos. De forma geral, não há detalhamento suficiente sobre os critérios de elegibilidade.
1.5 Com relação aos critérios de elegibilidade, as restrições baseadas nas fontes de informações foram apropriadas?	Provavelmente sim.	A revisão foi restrita a estudos em que a tabela 2x2 pôde ser construída. Embora nenhuma justificativa para isso tenha sido dada, isto é comum em revisões de Teste de Acurácia Diagnóstica (TAD), sendo assim uma restrição razoável.
Gradação do potencial risco de viés nas especificações dos critérios de elegibilidade do estudo	Alto.	Não existiram informações suficientes sobre os critérios de elegibilidade para julgar se os estudos apropriados foram incluídos na revisão; em particular, o detalhamento sobre participantes elegíveis estava incompleto. Também não ficou claro se os critérios foram especificados previamente ou post-hoc. Portanto, existe alta preocupação quanto à especificação dos critérios de elegibilidade da revisão.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

b) Revisão avaliada como de “baixo potencial de viés” relacionada às especificações dos critérios de elegibilidade dos estudos⁴

Descrições do texto:

Objetivo

Avaliar a associação e o valor preditivo de medidas ultrassonográficas do volume de fluido amniótico para efeitos adversos da gravidez.⁴

Métodos – seleção dos estudos:

1. População. Mulheres grávidas, com ou sem restrição de crescimento fetal, sem evidência de ruptura da membrana e sem evidência de anormalidades congênita ou estrutural.

2. Teste índice. Qualquer medida de fluido amniótico reportada pelos autores incluindo amniotic fluid index (AFI), volume de fluido amniótico e *maximum deepest pocket*. Foi aceito qualquer ponto de corte utilizado para definir alto ou baixo fluido amniótico reportado pelos autores dos estudos incluídos.

3. Desfecho. Qualquer padrão de referência para o comprometimento do bem-estar fetal ou neonatal incluindo: pH anormal do cordão ao nascimento, escores de *Apgar*, óbito perinatal e desfechos relacionados. Qualquer padrão de referência para restrição

do crescimento fetal ou para desenvolvimento fetal inferior ao esperado para a idade gestacional: peso ao nascer <10^o, <5^o, <3^o percentil, pontos de corte do peso absoluto ao nascimento.

4. Delineamento dos estudos. Estudos observacionais nos quais os resultados do teste de interesse são comparados com outros achados e confirmados por um padrão ouro, permitindo a geração da tabela 2x2 para computar índices de associação e testes de acurácia para cada ponto de corte disponível. Séries de casos com até 10 participantes foram excluídas.⁴

Métodos – extração de dados:

Todos os estudos deveriam registrar que excluíram ruptura de membrana e anormalidades congênitas e estruturais, devido à associação de anormalidades do trato urinário e do cariótipo com anormalidades do volume do fluido.⁴

Quadro 6 – Exemplo de classificação para critérios de elegibilidade julgados como de baixo potencial de viés

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
1.1 Os objetivos e critérios de elegibilidade foram definidos previamente?	Sim.	Os autores especificaram claramente no <i>abstract</i> e <i>background</i> que os objetivos do estudo foram avaliar a associação e o valor preditivo das mensurações ultrassonográficas do volume de fluido amniótico para efeitos adversos da gravidez. Um protocolo separado forneceu a pergunta de pesquisa “Qual é a acurácia do volume de fluido amniótico para prever comprometimento fetal/neonatal e restrição de crescimento fetal?”. Os autores forneceram detalhes sobre os critérios de elegibilidade na seção de “Seleção dos estudos” organizados por população, teste índice, desfecho e delineamento do estudo.
1.2 Os critérios de elegibilidade eram apropriados à pergunta da revisão?	Sim.	A pergunta da revisão indicou a necessidade de identificar estudos sobre a acurácia do volume de fluido amniótico para prever comprometimento fetal/neonatal e restrição de crescimento fetal. O detalhamento no artigo sobre os estudos elegíveis para inclusão pareceu apropriado para a pergunta da revisão.

Continua

Conclusão

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
1.3 Os critérios de elegibilidade foram bem especificados (sem ambiguidade)?	Provavelmente sim.	Os delineamentos dos estudos foram claramente relatados. Foram incluídos estudos observacionais. Os autores excluíram séries de casos com 10 ou menos participantes. Detalhes sobre a população de interesse (gestantes, com ou sem restrição de crescimento fetal, sem evidência de ruptura prematura da membrana, sem evidência de anormalidades congênitas ou estruturais), teste índice (qualquer medida de volume do fluido amniótico independentemente do ponto de corte utilizado, incluindo-se AFI, volume do fluido amniótico e maximum deepest pocket), desfecho (qualquer padrão de referência sobre comprometimento do bem-estar fetal/neonatal e qualquer padrão de referência para restrição de crescimento fetal ou para desenvolvimento fetal inferior ao esperado para a idade gestacional).
1.4 Com relação aos critérios de elegibilidade, as restrições baseadas nas características dos estudos foram apropriadas?	Provavelmente sim.	As restrições baseadas nos delineamentos dos estudos e problemas de tamanho de amostras foram descritas de forma clara. Descrições adicionais foram fornecidas na seção de extração de dados. As restrições pareceram apropriadas, embora não tenham sido justificadas.
1.5 Com relação aos critérios de elegibilidade, as restrições baseadas nas fontes de informações foram apropriadas?	Provavelmente sim.	Não foram aplicadas restrições de idiomas. Algumas restrições podem ter sido baseadas na disponibilidade de dados, embora nenhuma justificativa tenha sido dada. Nenhuma outra restrição no tocante às fontes de informações foi descrita. Portanto, essa questão foi respondida como "Provavelmente Sim".
Gradação do potencial risco de viés nas especificações dos critérios de elegibilidade do estudo.	Baixo.	Todas as questões foram respondidas como "Sim" ou "Provavelmente Sim", então não foi identificado potencial risco de viés sobre a especificação dos critérios de elegibilidade. Esforço considerável foi feito para especificar a pergunta e os objetivos da revisão, bem como para especificar previamente e justificar os critérios de elegibilidade.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

Domínio 2 – Identificação e seleção dos estudos

O objetivo deste domínio é avaliar se há estudos primários que atenderiam aos critérios de inclusão, mas não foram selecionados para a revisão. Uma busca sensível pode recuperar o maior número de artigos possíveis, sendo um dos principais componentes da revisão. É necessário que a pesquisa seja realizada ou orientada por um profissional especialista em buscas na literatura. As estratégias de busca devem ser realizadas em bases de dados e fontes eletrônicas apropriadas, as quais indexam periódicos, resumos de congresso e registros de ensaios clínicos a fim de se identificar o

maior número possível de artigos publicados e não publicados. Além de uma estratégia de busca apropriada e sensível, é necessário também realizar buscas adicionais, por exemplo, verificando referências em revisões existentes e busca manual. A estratégia de busca deve incluir palavras-chave (no título e resumo) e os termos de indexação (MeSH e Emtree). Também pode ser útil procurar por campos adicionais, por exemplo, medicamento, número de registro ou nome comercial. A estratégia de busca geralmente envolve uma combinação de termos referentes à população, intervenção, exposição e teste índice. Para algumas revisões, tais como revisões de ensaios clínicos randomizados, podem ser utilizados filtros para metodologia ou delineamento dos estudos nas bases de dados pesquisadas. No entanto, para outros tipos de revisões, como de estudos de acurácia diagnóstica, o uso de filtros demonstrou perda de estudos relevantes e, portanto, deve ser evitado.^{6,7} É difícil avaliar a sensibilidade da busca sem ter conhecimento técnico sobre estratégias de busca e o tema da revisão. Os avaliadores devem considerar se foram utilizados termos apropriados e abrangentes que compreendam todos os conceitos possíveis da questão de pesquisa. Por exemplo, em uma revisão de câncer de mama realizar a busca só pelo termo “*breast cancer*” não é suficiente. Uma busca que poderia ser utilizada para esta população é a seguinte:

Base de dados MEDLINE busca realizada via OvidSP

1. *exp breast neoplasms/ or Carcinoma, Ductal, Breast/ (214.761)*
2. *exp breast/ (31.443)*
3. *exp neoplasms/ (2.533.252)*
4. *2 and 3 (17.379)*
5. *(breast\$ adj5 (neoplasm\$ or cancer\$ or tumor?\$ or metasta\$ or carcinoma\$ or adenocarcinoma\$ or sarcoma\$ or dcis or ductal or infiltrat\$ or intraductal\$ or lobular or medullary)).ti,ab,ot,hw. (256.928)*
6. *(mammar\$ adj5 (neoplas\$ or cancer\$ or tumor?\$ or metasta\$ or carcinoma\$ or adenocarcinoma\$ or sarcoma\$ or dcis or ductal or infiltrat\$ or intra-ductal\$ or lobular or medullary)).ti,ab,ot,hw. (34.861)*
7. *1 or 4 or 5 or 6 (277.790)*

O Quadro 7 resume as questões norteadoras do Domínio 2 e descreve orientações para a resposta de cada questão. O Quadro 8 indica uma visão geral dos níveis de classificação para o Domínio 2. Exemplos da classificação para este domínio (potencial alto e baixo de viés) estão descritos nos Quadros 9 e 10.

Quadro 7 – Questões norteadoras referentes ao Domínio 2 e orientações para respostas

Questões norteadoras	Orientações para respostas
2.1 A busca incluiu uma variedade suficiente de bases de dados/ fontes eletrônicas para pesquisar artigos publicados e não publicados?	O avaliador precisa julgar o que constitui uma variedade apropriada de bases de dados para a questão de pesquisa. Deve-se, no mínimo, conduzir uma pesquisa no MEDLINE e EMBASE. A busca por material de congresso também deve ser considerada no resultado da pesquisa. Orientações sobre variedade adequada das bases de dados podem ser encontradas no Handbook da Cochrane ³ ou no site do Centre for Reviews and Dissemination (CRD) (< http://www.york.ac.uk/inst/crd/finding_studies_systematic_reviews.htm >).
2.2 Além da busca nas bases de dados foram utilizados métodos adicionais para a identificação de artigos relevantes?	Métodos adicionais, tais como busca por citações, contato com especialistas, busca nas referências, pesquisa manual, etc.
2.3 Os termos e a estrutura da estratégia de busca foram adequados para obter o maior número possível de artigos?	A estratégia de busca deve ser completa mostrando todos os termos utilizados com detalhes suficientes para que possa ser replicada. Se somente alguns dados forem fornecidos, por exemplo, lista com os termos sem nenhuma indicação de como foram combinados, os avaliadores podem responder esta questão como "Provavelmente Sim" ou "Provavelmente Não". Os avaliadores devem considerar se a estratégia de busca incluiu termos adequados para o tópico, se uma combinação de termos controlados (MeSH para Medline) e palavras-chave no título e resumo foram usadas e se os filtros aplicados foram adequados. Por exemplo, para revisões de testes de acurácia diagnóstica, o uso de filtros mostrou perda de estudos relevantes e, portanto, essa pergunta deve ser respondida como "Não" para uma estratégia que inclua esses filtros ⁴ . As orientações sobre a avaliação crítica das estratégias de busca podem ser encontradas no PRESS Evidence-Based Checklist (< http://ejournals.library.ualberta.ca/index.php/EBLIP/article/view/7402 >).
2.4 As restrições baseadas na data, formato de publicação ou idioma foram adequadas?	Se nenhuma restrição foi aplicada na estratégia de busca, então essa questão deve ser respondida como "Sim". Esta questão é diferente do Domínio 1 (1.3) que avalia a restrição do critério de seleção. É necessária informação sobre os três componentes desta questão (data, formato de publicação e idioma) para poder avaliar este item. A restrição de artigos baseados em idiomas (somente artigos em inglês) ou formato de publicação (por exemplo estudos publicados na íntegra) é raramente apropriada. Dessa forma, se tais restrições forem aplicadas, a resposta geralmente é "Não". Para que esta questão seja respondida como "Sim", restrições de data podem ser aplicadas, no entanto devem ser claramente explicadas. Por exemplo, se uma medicação ou teste não estava disponível antes de uma determinada data, então pode se iniciar a busca a partir da data em que a medicação ou teste se tornou disponível.
2.5 Foram realizadas tentativas para minimizar erros na seleção dos estudos?	Tanto o processo de seleção por títulos e resumos quanto a avaliação dos estudos na íntegra são contemplados nesta questão. Para uma resposta "Sim", os títulos e resumos devem ser selecionados de forma independente por pelo menos dois revisores e a avaliação do texto na íntegra também deve envolver ao menos dois revisores (independentes ou com uma pessoa para realizar a avaliação e a segunda verificar os resultados).

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

Quadro 8 – Potencial de viés relacionado aos métodos utilizados para identificar e/ou selecionar estudos

Baixo	Dada a questão da revisão e os critérios de elegibilidade avaliados no Domínio 1, um esforço substancial foi realizado para identificar o maior número de estudos possíveis. Foi utilizada uma variedade de métodos de pesquisa por meio de uma estratégia de busca sensível e apropriada, além de serem tomadas medidas para minimizar o viés e erros na seleção dos estudos.
Alto	Alguns estudos elegíveis para a revisão foram provavelmente perdidos.
Incerto	Não há informações suficientes para fazer uma avaliação sobre o risco de viés.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

Exemplos de classificação

a) Revisão classificada como de alto potencial de viés em relação aos métodos utilizados para identificar e/ou selecionar estudos³

Descrição do texto:

Foi realizada busca nas bases de dados: Ovid MEDLINE de 1947 a agosto de 2012, Cochrane Library (até o primeiro trimestre de 2012), Embase (1976 a agosto de 2012), Scopus (1960 a agosto de 2012) e PsycINFO (1806 a agosto de 2012), além de busca por registros de ensaios clínicos. Ao menos dois revisores independentes avaliaram os estudos para inclusão. Foram selecionados artigos no idioma inglês. Os resumos de congresso foram incluídos somente na análise de sensibilidade.³

Quadro 9 – Exemplo de classificação para estratégia de busca julgada como de alto potencial de viés

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
2.1 A busca incluiu uma variedade suficiente de bases de dados/fontes eletrônicas para pesquisar artigos publicados e não publicados?	Sim.	MEDLINE, EMBASE, Scopus, PsycINFO e The Cochrane Library foram pesquisadas (apesar de não estar claro quais recursos foram utilizados dentro da Cochrane Library). Este item foi julgado como adequado, pois uma variedade de bases de dados foi analisada. Registros de ensaios clínicos também foram pesquisados.
2.2 Além da busca nas bases de dados foram utilizados métodos adicionais para a identificação de artigos relevantes?	Não.	Não.
2.3 Os termos e a estrutura da estratégia de busca foram adequados para obter o maior número possível de artigos?	Nenhuma informação.	A estratégia de busca completa não foi reportada e não há detalhes dos termos utilizados. Não há informações suficientes para o julgamento desta questão.
2.4 As restrições baseadas na data, formato de publicação ou idioma foram adequadas?	Não.	A revisão foi restrita ao idioma inglês. Portanto, existe um potencial viés de publicação.

Continua

Conclusão

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
2.5 Foram realizadas tentativas para minimizar erros na seleção dos estudos?	Provavelmente sim.	A avaliação dos estudos incluídos foi conduzida de forma independente por pelo menos dois revisores. No entanto, não ficou explícito se este método foi aplicado tanto na seleção dos estudos quanto na avaliação dos artigos na íntegra. Sendo assim, esta questão foi classificada como "Provavelmente sim".
Gradação do potencial risco de viés em relação aos métodos utilizados para identificar e/ou selecionar os estudos.	Alto.	A restrição de artigos no idioma inglês significa que há um alto risco de que estudos relevantes não tenham sido incluídos nesta revisão. Não foi possível julgar se a estratégia de busca estava adequada.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

b) Revisão avaliada como de baixo potencial de viés em relação aos métodos utilizados para identificar e/ou selecionar estudos⁴

Descrição do texto:

As seguintes bases de dados foram pesquisadas até outubro de 2011: MEDLINE; EMBASE; Cumulative Index To Nursing and Allied Health Literature (CINAHL); The Cochrane Central Register of Systematic Reviews; The Cochrane Central Register of Controlled Trials; DARE; MEDION; SIGLE; Index of Scientific and Technical Proceedings, Web of Science e ClinicalTrials.gov. A pesquisa utilizou palavras-chave e termos MeSH relacionados aos testes avaliados combinados com os termos MeSH: 'Prenatal Diagnosis', 'Ultrasonography', 'Amniotic Fluid' e 'Pregnancy Outcome'. As referências de todos os artigos primários e de revisões incluídas foram analisadas para identificar artigos citados que não foram encontrados por pesquisas eletrônicas. Nenhuma restrição de idioma foi aplicada. As bases de dados foram examinadas por dois revisores (RKM, CHM). Foram realizadas traduções para artigos em idiomas diferentes do inglês. Três revisores tomaram as decisões finais de inclusão/exclusão de acordo com os seguintes critérios.⁴

Quadro 10 – Exemplo de classificação para estratégia de busca julgada como de baixo potencial de viés

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
2.1 A busca incluiu uma variedade suficiente de bases de dados/fontes eletrônicas para pesquisar artigos publicados e não publicados?	Sim.	MEDLINE, EMBASE, CINAHL, SIGLE, Index of Scientific and Technical Proceedings, ClinicalTrials.gov, Cochrane Library, DARE e MEDION foram pesquisadas. Web of Science também foi pesquisada, apesar de não estar claro qual base de dados dentro da plataforma foi utilizada. Dessa forma, foi considerada apropriada a variedade de bases de dados para encontrar artigos publicados e não publicados.

Continua

Conclusão

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
2.2 Além da busca nas bases de dados foram utilizados métodos adicionais para a identificação de artigos relevantes?	Sim.	As referências de todos os artigos primários e de revisões incluídas foram examinadas para identificar artigos elegíveis que não foram encontrados na pesquisa eletrônica.
2.3 Os termos e a estrutura da estratégia de busca foram adequados para obter o maior número possível de artigos?	Sim.	Foi utilizada para a pesquisa a combinação de termos da população (mulheres grávidas) e da intervenção (ultrassonografia), o que pareceu sensível e sem restrições inapropriadas (por exemplo, delimitação de estudo).
2.4 As restrições baseadas na data, formato de publicação ou idioma foram adequadas?	Sim.	Não houve restrições para data e idioma e as pesquisas incluíram etapas para identificar a literatura cinzenta. Por não ter incluído quaisquer restrições na pesquisa esse item foi julgado como "sim".
2.5 Foram realizadas tentativas para minimizar erros na seleção dos estudos?	Provavelmente sim.	O processo de seleção por títulos e resumos, bem como a avaliação do texto na íntegra foram reportados e incluiu múltiplos revisores. No entanto, não está claro se os revisores atuaram de forma independente e por isso a resposta foi "provavelmente sim".
Gradação do potencial risco de viés em relação aos métodos utilizados para identificar e/ou selecionar os estudos.	Baixo.	Todas as perguntas foram respondidas como "Sim" ou "Provavelmente Sim" e, portanto, não foram identificados potenciais vieses. Esta revisão parece ter incluído uma proporção alta de estudos relevantes.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

Domínio 3 – Coleta de dados e avaliação do estudo

O terceiro domínio tem como objetivo avaliar se o viés foi introduzido por meio da coleta de dados ou durante o processo de avaliação do potencial risco de viés. Por isso, a coleta rigorosa de dados deve seguir o delineamento do estudo conforme definido no protocolo de pesquisa, e utilizar um formulário de coleta de dados que tenha sido estruturado. Todos os dados que contribuirão para a síntese e interpretação dos resultados devem ser coletados, incluindo dados numéricos e estatísticos, e características gerais do estudo primário, tais como características do delineamento do estudo, financiamento, cenário, características dos participantes, critério de seleção, detalhes da intervenção/exposição (diagnóstico) e perda de participantes. O tipo de dado numérico depende do delineamento dos estudos incluídos na revisão. Por exemplo, para uma revisão de acurácia de teste diagnóstico, os dados da tabela 2x2 para avaliar o teste são geralmente extraídos. Para a revisão de estudos observacionais pode ser extraída uma estimativa de efeito ajustada com um intervalo de confiança de 95%, bem como detalhes das variáveis ajustadas e método de análise. Se os dados não estiverem disponíveis no formato adequado para contribuir com a síntese, os autores da revisão devem relatar como esses dados foram obtidos. Por exemplo, os autores de estudos primários podem ser contatados para obter dados adicionais. De forma similar, procedimentos estatísticos adequados podem ser usados para obter os dados

necessários. Além disso, o processo de extração de dados pode gerar erros que podem surgir de equívocos ao transcrever dados ou pela falta de coleta de informações relevantes que estão disponíveis no relato de estudo. Desse modo, o viés também pode surgir do processo de extração de dados que, pela sua natureza, é subjetivo e aberto à interpretação. A extração de dados pareada (ou extração de dados única com uma verificação rigorosa) é essencial para evitar a existência de erros randômicos e potencial viés.⁸

A validade dos estudos incluídos deve ser avaliada usando critérios apropriados de acordo com o delineamento dos estudos primários incluídos na revisão.^{3,8} A avaliação pode ser realizada utilizando uma ferramenta estruturada, desenvolvida especificamente para o delineamento do estudo que está sendo avaliado, ou pode ser simplesmente uma lista de critérios relevantes que pode ser uma fonte potencial de viés. Se uma ferramenta publicada ou um critério *ad hoc* são usados, o avaliador deve considerar se os critérios são suficientes para identificar todas as fontes importantes e potenciais vieses nos estudos incluídos. A decisão quanto a validade dos critérios deve ser baseada em evidências empíricas relacionadas ao risco de viés de cada delineamento dos estudos.³⁻¹⁴ Como acontece na extração de dados, viés ou erro pode ocorrer no processo de avaliação do risco de viés. A avaliação do risco de viés deve, portanto, envolver dois revisores independentes, ou no mínimo o segundo revisor deve verificar as decisões do primeiro. O consenso e as discrepâncias devem ser relatados na avaliação do risco de viés e extração de dados.

O Quadro 11 resume as questões norteadoras incluídas no Domínio 3 com a orientação de classificação para cada questão. O Quadro 12 fornece uma síntese do nível das classificações para o Domínio 3. Exemplos da classificação para este domínio (potencial alto e baixo de viés) estão fornecidos nos Quadros 13 e 14.

Quadro 11 – Questões norteadoras referentes ao Domínio 3 e orientações para respostas

Questões norteadoras	Orientações para respostas
3.1 Foram realizadas tentativas para minimizar o erro na coleta de dados?	Para minimizar vieses e erros no processo de coleta de dados é necessário envolver pelo menos dois revisores e utilizar formulários de extração de dados estruturados. É recomendado que este processo seja realizado por dois revisores de forma independente ou a extração pode ser realizada por um revisor e confirmada por um segundo. O processo de confirmação deve envolver o segundo revisor na leitura detalhada do documento, não só para verificar os dados extraídos, mas também para garantir que nenhuma informação relevante seja perdida.
3.2 As características disponíveis do estudo foram suficientes para que os autores da revisão e leitores sejam capazes de interpretar os resultados?	As informações sobre as características do estudo são essenciais para interpretar os resultados da revisão, pois permite uma investigação adequada da heterogeneidade e da relevância da aplicabilidade dos resultados. Essas informações podem ser relatadas na seção de métodos, onde as informações sobre a coleta de dados são descritas, podem estar disponíveis nos quadros com as características dos estudos incluídos, ou podem estar sumarizadas nos resultados. Esta questão pode ser difícil de julgar, uma vez que nem sempre todas as informações coletadas como parte da revisão são apresentadas na publicação, muitas vezes por falta de espaço. Os avaliadores podem, portanto, precisar acessar recursos adicionais como apêndices da internet.

Continua

Conclusão

Questões norteadoras	Orientações para respostas
3.3 Todos os resultados relevantes foram coletados para uso na síntese?	<p>Resultados suficientes do estudo devem ser extraídos para permitir que seja conduzida uma síntese adequada. Idealmente, os autores da revisão devem relatar quais dados foram necessários para a síntese e em qual formato. Por exemplo, para uma revisão de teste de acurácia diagnóstica, os dados da tabela 2x2 são geralmente extraídos.</p> <p>Para uma revisão de estudos observacionais pode ser extraída uma estimativa de efeito ajustada com um intervalo de confiança de 95%, detalhes das variáveis ajustadas e método de análise.</p> <p>Se esses dados não forem explicitamente relatados na seção de métodos, os dados dos quadros, resumos gráficos ou dados relatados no texto podem ser consultados. Também pode ser necessário acessar recursos adicionais, como apêndices da internet ou o protocolo da revisão.</p> <p>É muito raro que todos os estudos primários incluídos na revisão apresentem os dados no formato adequado para a síntese. Por exemplo, uma revisão pode exigir dados contínuos no formato de diferença de média avaliada a partir da mudança do baseline com intervalo de confiança de 95%. No entanto, há uma variedade de outras medidas que podem ser relatadas ao invés da diferença de média, com estudos frequentemente não relatando medidas de variação. Para uma revisão responder "Sim" a esta pergunta, informações detalhadas devem ter sido incluídas na seção de métodos para descrever como os dados dos resultados que não foram reportados no formato adequado para a síntese foram obtidos, ex.: por estimativas/transformações dos dados relatados ou por meio de contato com os autores para obter informações adicionais.</p>
3.4. O risco de viés (ou qualidade metodológica) foi formalmente avaliado usando critérios apropriados?	<p>A avaliação do risco de viés é um componente essencial de qualquer revisão. Se o risco de viés não foi formalmente avaliado, então esta questão deve ser respondida como "Não".</p> <p>Se uma avaliação formal foi realizada, os avaliadores terão que usar o seu senso crítico para verificar se os critérios utilizados foram adequados. Se uma ferramenta publicada e reconhecida foi utilizada para o delineamento adequado, como a ferramenta <i>Cochrane Risk of Bias</i>¹⁶ para ECR ou QUADAS-2 para estudos de teste de acurácia diagnóstica¹⁶, então a avaliação estará adequada e esta pergunta poderá ser respondida como "Sim".</p> <p>No entanto, se a revisão simplesmente lista as questões avaliadas, utiliza uma ferramenta não publicada ou que não é mais recomendada, então a avaliação se torna mais difícil.</p> <p>O avaliador precisa então julgar se os critérios avaliados foram capazes de identificar potenciais fontes de viés nos estudos primários, dado o delineamento do estudo. Por exemplo, a escala de Jadad tem sido usada, mas não inclui o sigilo de alocação, o que tem sido considerado um potencial risco de viés em ECR¹⁷. Para responder "Sim" a esta pergunta, as revisões que usaram a escala de Jadad¹⁷ também devem ter o sigilo de alocação avaliado.</p>
3.5. Foram realizadas tentativas para minimizar o erro na avaliação do risco de viés?	<p>Assim como na coleta de dados, a avaliação do risco de viés deve envolver pelo menos dois revisores de forma independente ou pode ser realizada por um revisor e confirmada pelo segundo.</p>

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

Quadro 12 – Potencial de viés relacionado aos métodos utilizados para coletar dados e avaliar os estudos

Baixo	Dados os estudos incluídos na revisão conforme avaliados no Domínio 2, o risco de viés foi avaliado usando critérios adequados, a extração de dados e a avaliação do risco de viés envolveu dois revisores. As características dos estudos e os resultados relevantes foram extraídos.
Alto	Algum viés pode ter sido introduzido por meio da coleta de dados ou processo de avaliação do risco de viés.
Incerto	As informações reportadas foram insuficientes para avaliar o risco de viés.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

Exemplos de classificação**a) Revisão classificada como de alto potencial de viés em relação aos métodos utilizados para coletar dados e avaliar estudos³****Descrição do texto:**

Tabelas do tipo 2x2 foram construídas com os dados extraídos de cada estudo. Dois autores buscaram e extraíram os dados independentemente. Algumas diferenças foram resolvidas por consenso[...] Não há consenso sobre como avaliar estudos sem um grupo controle. Por isso, este critério não se aplica a estudos com a ausência deste grupo. Portanto, para esta metanálise e revisão sistemática, os estudos foram selecionados com base nos dados completos e nos critérios de inclusão.³

Comentário: As características do quadro dos estudos incluídos contêm apenas detalhes sobre o delineamento do estudo (retrospectivo ou prospectivo), tipo de câncer (todos os tipos de câncer retal) e procedimento confirmatório.

Quadro 13 – Exemplo de classificação para coleta de dados e avaliação do estudo julgado como de alto potencial de viés

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
3.1 Foram realizadas tentativas para minimizar o erro na coleta de dados?	Sim.	A extração de dados foi realizada de forma independente por dois revisores. As diferenças foram resolvidas por consenso.
3.2. As características do estudo foram suficientes para que os autores e leitores da revisão fossem capazes de interpretar os resultados?	Não.	O Quadro de síntese incluiu apenas detalhes ou delineamento (prospectivo ou retrospectivo), tipo de câncer (todos os tipos de câncer retal) e tipo de procedimento confirmatório (todas cirúrgicas). Nenhum outro detalhe sobre o delineamento do estudo ou a população foi relatado no texto.
3.3 Todos os resultados relevantes foram coletados para uso na síntese?	Sim.	Dados 2x2 foram extraídos de cada estudo, que são suficientes para calcular todas as medidas de acurácia diagnóstica, intervalos de confiança e realizar uma metanálise.

Continua

Ministério de Saúde

28

Conclusão

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
3.4 O risco de viés (ou qualidade metodológica) foi formalmente avaliado usando critérios apropriados?	Provavelmente sim.	O processo de seleção por títulos e resumos, bem como a avaliação do texto na íntegra foram reportados e incluiu múltiplos revisores. No entanto, não está claro se os revisores atuaram de forma independente e por isso a resposta foi "provavelmente sim".
3.3 Foram realizadas tentativas para minimizar o erro na avaliação do risco de viés?	Não.	A qualidade do estudo não foi formalmente avaliada.
Gradação do potencial risco de viés em relação aos métodos utilizados para coletar dados e avaliar estudos.	Alto.	A ausência de avaliação formal da qualidade da evidência significa que o risco de viés nos estudos incluídos não é claro. Os detalhes do estudo foram insuficientes para permitir que o leitor interprete os resultados. Há, portanto, um alto risco de viés na coleta de dados e no processo de avaliação dos estudos incluídos.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

b) Revisão classificada como de baixo potencial de viés em relação aos métodos utilizados para coletar dados e avaliar os estudos¹

Descrição do texto:

Um pesquisador extraiu dados sobre delineamento do estudo, população, cenário, intervenções, análise, seguimento e resultados. Um segundo pesquisador verificou os dados extraídos. Dois pesquisadores aplicaram independentemente critérios pré-definidos para avaliar a qualidade do estudo como ótimo, razoável ou ruim. As discrepâncias foram resolvidas por consenso.¹

Quadro 14 – Exemplo de classificação para coleta de dados e avaliação do estudo julgada como de baixo potencial de viés

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
3.1. Foram realizados esforços para minimizar o erro na coleta de dados?	Provavelmente sim.	Um revisor realizou a coleta de dados e esta foi verificada por um segundo revisor. Não está claro se o segundo revisor apenas verificou se os dados extraídos eram precisos ou se também leu o documento em detalhes para garantir que nenhuma informação relevante fosse perdida. Esta questão foi, portanto, respondida como "Provavelmente sim".
3.2. As características do estudo foram suficientes para que os autores e leitores da revisão fossem capazes de interpretar os resultados?	Sim.	As características detalhadas do estudo e os quadros de resultados foram fornecidos em apêndices que relataram informações suficientes para autores e leitores interpretarem os resultados.

Continua

ROBIS - Risk of Bias in Systematic Reviews: instrumento para avaliar o risco de viés em revisões sistemáticas: orientações de uso
Conclusão

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
3.3 Todos os resultados relevantes foram coletados para uso na síntese?	Sim.	Os dados dicotômicos foram extraídos, como número de eventos e número total de pacientes em cada grupo de tratamento; estes foram usados para calcular o risco relativo. Esta estratégia foi apropriada para ser utilizada na síntese.
3.4 O risco de viés (ou qualidade metodológica) foi formalmente avaliado usando critérios apropriados?	Provavelmente sim.	Detalhes sobre os critérios utilizados para avaliar o risco de viés não foram fornecidos, mas os autores citam o método US Preventive Services Task Force (2001), que inclui alguns critérios adequados.
3.5 Foram realizadas tentativas para minimizar o erro na avaliação do risco de viés?	Sim.	Dois investigadores avaliaram de forma independente a qualidade dos estudos.
Gradação do potencial risco de viés em relação aos métodos utilizados para coletar dados e avaliar os estudos.	Baixo.	Todas as questões foram classificadas como "Sim" ou "Provavelmente Sim" e, portanto, não foram identificados potenciais vieses. Os processos de revisão de coleta dos dados e avaliação dos estudos são improváveis de terem introduzido viés nesta revisão.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

Domínio 4 – Síntese e resultados

Este domínio tem como objetivo avaliar se, tendo sido tomada a decisão de combinar dados de estudos primários incluídos (na síntese qualitativa ou quantitativa), os revisores usaram métodos adequados. As abordagens para a síntese dependem da natureza da questão que está sendo discutida e da natureza dos estudos primários que estão sendo sintetizados. Para os ECR, uma abordagem comum é usar uma média ponderada das estimativas de efeito do tratamento (na escala logarítmica), ponderando pela precisão das estimativas.¹⁸ Pode ser adotado para isso, modelos de efeitos fixos ou de efeitos randômicos. No entanto, existem muitas variações com opções de modelagem de dados, por exemplo, usando uma abordagem de regressão logística para dados binários,¹⁹ modelando dois ou mais desfechos simultaneamente (metanálise bivariada ou multivariada),²⁰ modelagem de múltiplos efeitos de tratamento simultaneamente (metanálise de rede),²¹ ou modelagem de variação nos efeitos do tratamento (metarregressão).²² Estas variações podem ser combinadas, o que torna a síntese muito complexa. Opções semelhantes estão disponíveis para outros tipos de perguntas de revisão. Para a acurácia do teste diagnóstico, a abordagem bivariada tornou-se padrão, na qual a sensibilidade e especificidade são simultaneamente modeladas para levar em consideração sua correlação.²³ Para algumas revisões, uma síntese estatística pode não ser apropriada e, em vez disso, uma *overview* qualitativa ou narrativa de resultados deve ser relatada.

Alguns dos aspectos mais importantes a considerar em qualquer síntese (quantitativa ou qualitativa) são: i) se a abordagem analítica é adequada para a questão de pesquisa apresentada; ii) se a variação entre os estudos (heterogeneidade) é levada em

consideração; iii) se os vieses nos estudos primários são levados em consideração; iv) se as informações dos estudos primários que estão sendo sintetizadas estão completas (especialmente se houver o risco de que os dados ausentes sejam sistematicamente diferentes dos dados disponíveis, por exemplo, devido a viés de publicação ou divulgação); e v) se os autores introduziram viés no modo como relatam os resultados. Os aspectos técnicos da metanálise, como a escolha do método de estimativa, geralmente não são observações importantes. No entanto, a presença de erros pode ser relevante, por exemplo, ao interpretar erro padrão como desvio padrão, ao não ajustar o modelo por detalhes do delineamento tais como *matched data* ou *clustered data*, ou ao aplicar a média ponderada padrão às razões de risco ao invés de aplicar a logaritmos.

O Quadro 15 resume as questões norteadoras incluídas no Domínio 4 junto com a orientação de classificação para cada questão. O Quadro 16 fornece uma visão geral do nível de classificação para o Domínio 4. Exemplos de classificações para este domínio (potencial alto e baixo de viés) estão fornecidos nos Quadros 17 e 18.

Quadro 15 – Questões norteadoras referentes ao Domínio 4 e orientações para respostas

Questões norteadoras	Orientações para respostas
4.1 A síntese de resultados incluiu todos os estudos que deveriam ser incluídos?	<p>A síntese geralmente deve incluir todos os estudos que coletaram dados relevantes para a pergunta de pesquisa. Resultados de estudos individuais podem estar ausentes na síntese porque o estudo é desconhecido para os revisores (possivelmente devido ao viés de publicação): estes estudos ausentes são abordados dentro do Domínio 2 e pela questão 4.5. Esta questão aborda três outras situações relacionadas com os estudos que foram identificados para inclusão na revisão: i) os resultados específicos do estudo incluído não estão disponíveis para os revisores; ii) os revisores não conseguiram coletar ou processar os dados disponíveis; ou iii) os revisores excluíram propositalmente os resultados. No caso i), pode estar claro que os estudos incluídos coletaram os dados, mas não relataram os resultados desejados. Por exemplo, um ensaio clínico pode coletar dados para um desfecho de interesse dos revisores, mas não reportar os resultados. A importante distinção aqui é novamente se o resultado teria sido suprimido por causa dos achados da pesquisa (por exemplo, significância estatística) ou simplesmente por não ter sido reportado (por exemplo, por razões práticas, tais como limite de páginas do estudo). Se os resultados não estiverem disponíveis em um ou mais estudos porque os achados não foram estatisticamente significantes, a omissão destes dados introduzirá viés na síntese de resultados do estudo.</p> <p>No caso ii) [ver também o Domínio 3, questão 3.3], estudos podem ter sido omitidos por erro, ou porque os revisores não estavam familiarizados com cálculos estatísticos que permitiriam a sua inclusão. Isto seria problemático se os estudos omitidos tivessem resultados sistematicamente diferentes dos que foram incluídos. Quanto ao caso iii), os revisores podem tomar decisões inadequadas para excluir alguns estudos da síntese. Um exemplo seria a exclusão de estudos que podem levar a uma grande heterogeneidade dos resultados baseada apenas em considerações estatísticas (embora isso possa ser razoável quando realizado como análise de sensibilidade).</p> <p>Para abordar estas considerações, recomendamos que o avaliador examine o número de estudos incluídos (a partir de um fluxograma) e o número de estudos sintetizados (por meio de forest plot ou quadros). Em revisões com grande número de estudos (por exemplo, mais de 10 ou 20 em uma síntese), <i>funnel plots</i> e análises estatísticas podem fornecer informações sobre a possibilidade de presença de viés de seleção pelos motivos reportados acima: ver questão 4.513.</p>

Continua

Continuação

Questões norteadoras	Orientações para respostas
4.2 Todas as análises pré-definidas foram seguidas ou as perdas de participantes foram explicadas?	<p>O objetivo desta questão é identificar os vieses introduzidos pelos autores por meio da seleção e dos métodos de análise, de forma que os resultados que não sejam de interesse para eles sejam suprimidos ou substituídos. Para responder “Sim”, a revisão deve ter seguido um protocolo publicado ou acessível. Exemplos incluem o registro do protocolo no PROSPERO, um registro prospectivo internacional de revisões sistemáticas (<http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/>), ou a publicação do protocolo de uma revisão Cochrane (<http://www.thecochranelibrary.com/>). Se há indicação que análises predefinidas foram seguidas, por exemplo, a seção de métodos parece ser rigorosa e todas as análises mencionadas são consideradas nos resultados, então o avaliador pode responder “Provavelmente sim”. Na ausência de um protocolo pré-especificado, o avaliador deve responder “Não” a esta questão. No entanto, se a revisão sistemática não faz referência à existência ou ausência de um protocolo, recomendamos que o avaliador responda a esta questão como “Sem informação”.</p>
4.3 A síntese dos resultados foi apropriada dada a natureza e a similaridade das questões de pesquisa, dos delineamentos de estudos e desfechos dos estudos incluídos?	<p>Esta questão aborda principalmente a metodologia da síntese. A metodologia deve ser orientada pela natureza dos estudos e da questão apresentada. Se uma síntese quantitativa é realizada (metanálise), esta pergunta aborda se foi adequado realizá-la e quais os métodos estatísticos utilizados. Se uma abordagem narrativa é usada para a síntese, esta questão trata se uma síntese quantitativa teria sido mais adequada e se a abordagem narrativa foi apropriada.</p> <p>A decisão quanto à adequação de uma síntese quantitativa é movida principalmente pela similaridade dos estudos nas questões de pesquisa, delineamentos e desfechos (quando medidos). Isto é frequentemente atribuído como “heterogeneidade clínica” ou “diversidade clínica”. É importante que o avaliador possa estar convencido de que o resultado da síntese tem significado - isto é, pode potencialmente informar políticas, práticas ou pesquisas futuras. A questão da heterogeneidade estatística é abordada na questão 4.4.</p> <p>O avaliador deve responder “Sim” a esta questão se é usado um método bem aceito de combinação estatística de estudos, incluindo a ponderação adequada de cada estudo. Por exemplo, na presença de variação entre estudos, mas onde se pode assumir que os efeitos do tratamento vieram de uma mesma distribuição, o modelo de efeito randômico e não o de efeito fixo poderá ser utilizado. No entanto note que as metanálises de efeito randômico simples não são adequadas quando existe uma forte relação entre tamanho do estudo e tamanho do efeito (‘efeito de estudo de pequenas amostras’ ou ‘assimetria funnel plot’).</p> <p>Abordagens de regressão ou análises de subgrupos podem ser consideradas quando há estudos suficientes para explorar os motivos de variação entre estudos. Geralmente não recomendamos métodos de combinação de estudos que ignorem a influência da precisão do estudo na estimativa global agrupada – ex.: aqueles que ponderam todos os estudos igualmente. Se tais métodos forem usados, sugerimos que o avaliador responda “Não” a esta questão. Para estudos de teste de acurácia diagnóstica, um método geralmente aceito é uma abordagem bivariada para explicar a correlação entre sensibilidade e especificidade. O aconselhamento estatístico pode ser necessário para metanálises usando abordagens multivariadas, multinível, bayesiana ou metanálise de rede.</p>

Continuação	
Questões norteadoras	Orientações para respostas
<p>32</p> <p>4.4 A variação entre os estudos (heterogeneidade) foi baixa ou abordada na síntese?</p>	<p>Esta questão aborda a variação nos resultados dos estudos ao invés da variação nas suas características. A variação entre os estudos pode ser avaliada visualmente (por <i>forest plot</i>); usando teste estatístico (por exemplo, teste χ^2 ou Q de Cochran); usando uma medida de variância entre estudos (frequentemente referida como τ^2); ou usando uma medida de variação de intervalo de confiança (por exemplo, a estatística de inconsistência I^2).</p> <p>Se uma heterogeneidade considerável for ignorada na metanálise, ela pode levar a conclusões erradas e/ou a uma falsa precisão. Se uma análise de efeito fixo for usada na presença de heterogeneidade é importante que os revisores reconheçam que a análise ignora a heterogeneidade. O resultado deveria ser complementado com resultados relativos a variação entre os estudos, e os resultados da análise de efeito fixo deveriam ser interpretados adequadamente.</p> <p>Na maioria dos casos, o uso de uma metanálise de efeito fixo sem análise adicional para explorar a variação receberia uma resposta "Não" para esta questão.</p> <p>Se um modelo de efeito randômico tiver sido utilizado adequadamente para permitir a heterogeneidade e/ou outras análises de subgrupo/meta-regressão, o avaliador poderá responder "Sim". No entanto, a metanálise de efeito randômico de estudos com características ou resultados extremamente diversos pode produzir resultado sem sentido, particularmente se os resultados dos estudos apontam em direções opostas de efeito.</p> <p>Se uma síntese narrativa foi conduzida com base em uma combinação estatística inadequada devido à heterogeneidade clínica, esta pergunta deve ser respondida "Sim".</p>
<p>4.5 Os resultados foram robustos? Como demonstrado, por exemplo, pelo <i>funnel plot</i> ou análise de sensibilidade.</p>	<p>Esta questão aborda a imprecisão dos resultados da síntese, e se eles mudariam caso uma abordagem diferente fosse aplicada. Os gráficos <i>funnel plot</i> são usados para verificar a relação entre o tamanho do efeito e o tamanho do estudo (frequentemente mensurado estatisticamente usando precisão). A assimetria no <i>funnel plot</i> pode ocorrer por várias razões, incluindo vies de publicação, vies relatado ou não relatado dentro de estudos, diferentes magnitudes de vies em estudos maiores versus estudos menores, ou diferenças substanciais nos efeitos dos estudos de tamanhos diferentes. Quando um gráfico <i>funnel plot</i> é assimétrico os métodos de efeito fixo e efeito aleatório produzem resultados diferentes. Geralmente podem-se empregar ambos os métodos como uma forma de análise de sensibilidade. Alternativamente, o método <i>trim-and-fill</i>, abordagens de regressão ou uso de modelos de seleção podem ser usados para examinar o impacto potencial dos diferentes tipos de vies de publicação sobre os resultados.²⁴</p> <p>Outros exemplos de análises de sensibilidade são o uso de diferentes métodos para imputação de dados ou exclusão de estudos. Alternativamente, uma análise de sensibilidade pode ser realizada para verificar se os resultados são robustos após a remoção de alguns estudos, por exemplo, estudos com alto risco de vies.</p> <p>O uso de análise de sensibilidade por si só não é considerado adequado para que esta pergunta seja respondida como "Sim"; os avaliadores devem decidir se o seu uso demonstrou robustez nos resultados. Se houver poucos estudos ou estudos muito heterogêneos, pode ser claro que os resultados não são robustos, mesmo se os revisores não realizarem análises de sensibilidade. Se uma síntese narrativa foi conduzida, o avaliador deve considerar se as conclusões podem ter sido enviesadas, e assim estarem distintas das conclusões dos artigos originais.</p>

Continua

Conclusão

Questões norteadoras	Orientações para respostas
4.6 Os vieses nos estudos primários foram mínimos ou abordados na síntese?	Os avaliadores devem responder a esta pergunta como "Não" se julgarem haver um viés considerável nos estudos selecionados que tenham sido ignorados pelos autores. Por exemplo, se o risco de viés não foi avaliado na revisão sistemática os usuários da ROBIS devem responder "Não". Da mesma forma, se o risco de viés foi avaliado, mas os revisores não o descreveram nos resultados/conclusões, deve ser atribuída uma resposta "Não" a esta pergunta. Exemplos de quando esta pergunta poderia ser respondida como "Sim" são os casos em que todos os estudos receberam uma classificação de "baixo risco de viés" ou se análises de sensibilidade foram empregadas nos estudos que estavam com alto risco de viés. Se os vieses forem abordados apenas como parte da discussão dos resultados da síntese, o avaliador deve responder "Não". Estas discussões serão abordadas mais adiante no julgamento geral sobre o risco de viés na revisão (Fase 3).

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

Quadro 16 – Potencial de viés relacionado aos métodos utilizados para sintetizar resultados

Baixo	É improvável que a síntese produza resultados enviesados, pois qualquer limitação nos dados já foi superada, ou os resultados foram tão convincentes que as limitações teriam pouco impacto.
Alto	A síntese é susceptível a produzir resultados enviesados, porque i) os potenciais vieses foram ignorados; ii) uma importante variabilidade entre os estudos não foi considerada; iii) houve inadequações na metodologia; ou iv) os resultados são reportados de forma incompleta a ponto de levantar uma possibilidade de viés.
Incerto	As informações reportadas são insuficientes para avaliação do risco de viés.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

Exemplos de classificação

a) Revisão classificada como de alto potencial de viés em relação à síntese²⁵

Quadro 17 – Exemplo de classificação para síntese julgada como de alto potencial de viés

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
4.1 A síntese de resultados incluiu todos os estudos que deveriam ser incluídos?	Sem informação.	O autor especificou que 35 estudos foram relevantes para a revisão, dos quais 29 foram utilizados em uma metanálise. Nenhuma outra informação foi fornecida para verificar a adequação dos estudos incluídos.
4.2 Todas as análises pré-definidas foram seguidas ou as perdas de participantes foram explicadas?	Sem informação.	Nenhuma análise foi explicitamente predefinida em um protocolo. Não foram fornecidas informações adicionais no texto.
4.3 A síntese dos resultados foi apropriada quando consideradas a natureza e a similaridade das questões de pesquisa, os delineamentos e os desfechos dos estudos incluídos?	Não.	O autor relatou apenas que uma "metanálise foi realizada" (p. 11). O autor agrupou os eventos e as populações e usou os resultados para gerar a medida odds ratio, portanto não explorou as comparações entre os estudos.

Continua

Ministério de Saúde

34

Conclusão

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
4.4 A variabilidade entre os estudos (heterogeneidade) foi baixa ou abordada na síntese?	Provavelmente não.	Nenhum detalhe foi fornecido sobre a heterogeneidade estatística. No entanto, o autor discutiu análise de subgrupo para estudos com alto risco de heterogeneidade. Além disso, os estudos foram agrupados de acordo com a prevalência de circuncisão na comunidade. Nenhum outro detalhe foi dado sobre os subgrupos.
4.5 Os resultados foram robustos? Como demonstrado, por exemplo, pelo <i>funnel plot</i> ou análise de sensibilidade.	Provavelmente não.	O autor discutiu alguns estudos que podem ser problemáticos. "Embora estas hipóteses possam estar erradas, a inclusão ou exclusão desses estudos não afetou o resultado global" (p. 11). O <i>odds ratios</i> e o intervalo de confiança para essas análises não foram apresentados.
4.6 Os vieses nos estudos primários foram mínimos ou abordados na síntese?	Não.	Nem a qualidade nem o risco de viés dos estudos foram explicitamente avaliados. Ademais, o viés não foi considerado na síntese.
Gradação do potencial risco de viés em relação à síntese e resultados.	Alto.	Os estudos individuais não foram avaliados quanto ao risco de viés, nem o viés potencial foi considerado na síntese. O autor agrupou as intervenções entre os estudos ao invés de analisar as comparações dentro dos estudos, o que é uma abordagem arriscada para a metanálise. Não houve discussão ou avaliação da heterogeneidade na análise.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

b) Revisão classificada como de baixo potencial de viés relacionada à síntese de resultados⁴

Quadro 18 – Exemplo de classificação para síntese de resultados julgada como de baixo potencial de viés

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
4.1 A síntese de resultados incluiu todos os estudos que deveriam ser incluídos?	Sem informação.	O fluxograma de seleção reportou que 43 estudos foram incluídos na revisão. A figura com a classificação do QUADAS-2 e um apêndice com as características dos estudos também mostram um total de 43 estudos. No entanto, os <i>forest plot</i> não apresentaram achados por estudo, uma vez que estudos podem reportar mais de um desfecho. Assim, não foi possível avaliar se todos os estudos foram incluídos nesta síntese.
4.2 Todas as análises pré-definidas foram seguidas ou as perdas de participantes foram explicadas?	Provavelmente não.	O autor discutiu alguns estudos que podem ser problemáticos. "Embora estas hipóteses possam estar erradas, a inclusão ou exclusão desses estudos não afetou o resultado global" (p. 11). O <i>odds ratios</i> e o intervalo de confiança para essas análises não foram apresentados.

Continua

ROBIS – Risk of Bias in Systematic Reviews: instrumento para avaliar o risco de viés em revisões sistemáticas: orientações de uso

Conclusão

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
4.3 A síntese dos resultados foi apropriada quando consideradas a natureza e a similaridade das questões de pesquisa, os delineamentos e os desfechos dos estudos incluídos?	Sim.	Os autores afirmam que “os resultados foram combinados por meio do modelo de metanálise de efeitos randômicos, onde as medidas do volume de fluido amniótico, do ponto de corte e do desfecho utilizado foram as mesmas”. Para testar a habilidade preditiva dos testes, os autores calcularam sensibilidade, especificidade e razão de probabilidade a partir de tabelas 2x2 e sintetizaram os resultados usando o modelo bivariado de metanálise de efeitos randômicos.
4.4 A variabilidade entre os estudos (heterogeneidade) foi baixa ou abordada na síntese?	Sim.	A heterogeneidade estatística foi antecipada nesta revisão e abordada usando modelo de efeitos randômicos. Metarregressão ou análise de subgrupo foram realizadas para examinar os potenciais modificadores de efeito. Os intervalos preditivos também foram utilizados quando $I^2 > 0\%$.
4.5 Os resultados foram robustos? Como demonstrado, por exemplo, pelo <i>funnel plot</i> ou análise de sensibilidade.	Provavelmente não.	Os autores não declararam se as análises de sensibilidade foram utilizadas para avaliar a robustez dos resultados.
4.6 Os vieses nos estudos primários foram mínimos ou abordados na síntese?	Provavelmente sim.	Os vieses foram avaliados utilizando a ferramenta QUADAS-2. Esta avaliação indicou que a descrição da referência padrão e o cegamento estavam sob alto risco de viés. Outros aspectos do QUADAS-2 não indicaram grandes problemas quanto ao risco de viés. A “Qualidade” foi relatada como uma análise de subgrupo, no entanto foi reportada apenas para um dos dois desfechos primários. Para o desfecho oligohidrâmnios e bem-estar fetal, os autores declararam que “Não houve diferença na análise de subgrupo”.
Gradação do potencial risco de viés em relação à síntese e resultados.	Baixa.	Os autores abordaram satisfatoriamente a heterogeneidade em suas análises e a exploraram usando análises de subgrupo. O risco de viés dos estudos individuais foi abordado e incluído na análise de subgrupo.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

/// Fase 3 – Avaliação do risco de viés geral

37

A fase final da ferramenta avalia se a revisão sistemática como um todo está sob o risco de viés. Essa avaliação utiliza a mesma estrutura do Domínio 2 uma vez que inclui questões norteadoras e justificativas. No entanto, o julgamento sobre potenciais riscos de viés foi substituído por uma avaliação geral do risco de viés da revisão. A primeira questão desta fase pergunta se a interpretação dos achados aborda todos os potenciais riscos identificados entre os domínios 1 e 4. Se não foi identificado nenhum risco potencial, a questão pode ser respondida como “Sim”. Se um ou mais riscos potenciais forem identificados em quaisquer dos domínios anteriores, mas forem considerados na interpretação dos resultados e nas conclusões do artigo, esta questão pode também ser respondida como “Sim”. A depender da classificação das outras questões desta fase, a revisão poderá ser classificada como “baixo risco de viés”.

Esta fase ainda inclui três questões relativas à interpretação dos achados da revisão. Essas questões abordam se as conclusões foram baseadas nas evidências apresentadas, se a relevância dos estudos incluídos foi considerada e se os autores evitaram enfatizar os resultados com base na significância estatística. Tais aspectos são importantes para a interpretação dos achados de uma revisão, pois são onde vieses podem ter sido introduzidos no estudo.

O Quadro 19 sumariza as questões norteadoras do Domínio 4 e descreve orientações para resposta de cada questão. O Quadro 20 indica uma visão geral dos níveis de classificação para o Domínio 4.

Quadro 19 – Questões norteadoras referentes à fase 3 e orientações para respostas

Questões norteadoras	Orientações para resposta
A. A interpretação dos achados considerou todos os riscos potenciais identificados na Fase 2?	Esta questão se refere à avaliação de risco potencial de viés realizada na Fase 2 e resumida no início da Fase 3. Se todos os domínios avaliados na Fase 2 foram classificados como de “baixo risco potencial de viés”, esta questão pode ser respondida como “Sim”. Se um ou mais domínios foram classificados como “alto risco potencial de viés” ou “risco potencial de viés incerto”, os revisores devem ponderar se durante a interpretação dos resultados os autores consideraram os riscos potenciais de viés identificados na Fase 2. Por exemplo, vamos supor que uma revisão tenha sido julgada como de “alto risco de viés” por ter aplicado um filtro de delimitação de estudos durante as buscas na literatura. Nesse caso, o filtro pode ter levado à perda de estudos relevantes. Se a revisão tiver apontado a utilização do filtro como uma potencial limitação do estudo e tiver discutido como isso pode ter impactado os achados da revisão, essa questão pode ser respondida como “Sim”.

Continua

Conclusão

Questões norteadoras	Orientações para resposta
B. A relevância dos estudos para a pergunta de pesquisa da revisão foi adequadamente considerada?	Um aspecto importante na interpretação dos achados de uma revisão é considerar a relevância (aplicabilidade/validade externa) dos estudos incluídos para a pergunta de pesquisa da revisão. Se os estudos incluídos não são diretamente aplicáveis à pergunta da revisão e se esse ponto não for abordado na interpretação dos resultados, algum viés pode ter sido introduzido na revisão sistemática. Algumas revisões podem considerar a relevância dos estudos incluídos como parte formal da avaliação de qualidade. Isto é particularmente comum em revisões de acurácia diagnóstica que usaram a ferramenta QUADAS-2 ²⁸ a qual inclui tanto uma avaliação formal da aplicabilidade dos estudos primários à pergunta da pesquisa quanto uma avaliação do risco de viés. Outras revisões podem usar uma abordagem menos formal, discutindo a relevância dos estudos na seção de discussão da revisão. As abordagens podem ser apropriadas desde que as conclusões da revisão reflitam a evidência, inclusive a relevância dos estudos incluídos.
C. Os autores se preocuparam em não enfatizar os resultados com base apenas na sua significância estatística?	Se múltiplas análises forem utilizadas em apenas uma revisão é importante que sejam reportadas de forma equilibrada pelos autores. Às vezes, os autores da revisão destacam os resultados com base na significância estatística. Por exemplo, se uma revisão avaliou dez resultados e não encontrou efeito em nove deles, mas encontrou efeito benéfico significativo em um, pode ser tentador querer supervalorizar esse resultado. Porém, isso geraria uma visão enganosa dos resultados verdadeiros da revisão; portanto, esta prática deve ser evitada.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

Quadro 20 – Riscos de viés relacionados aos métodos utilizados na identificação e/ou seleção dos estudos

Baixo	É provável que os resultados da revisão sejam confiáveis. Nenhum risco potencial de viés foi identificado na Fase 2 durante o processo de revisão ou, se foi identificado, este foi considerado nas conclusões da revisão. As conclusões foram baseadas na evidência e consideraram a relevância dos estudos incluídos.
Alto	Os potenciais riscos de viés identificados na Fase 2 não foram considerados nas conclusões da revisão, as conclusões não foram confirmadas pela evidência ou não consideraram a relevância dos estudos incluídos para a pergunta da pesquisa.
Incerto	As informações reportadas foram insuficientes para avaliar o risco de viés.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

Exemplos de classificação

a) Revisão classificada como de alto potencial de viés³

Quadro 21 – Quadro resumo dos potenciais vieses identificados durante a Fase 2

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
1. Limitações relacionadas à especificação dos critérios de elegibilidade.	Alto.	Os critérios de elegibilidade eram ambíguos e pouco claros, não foram reportados detalhes sobre a população elegível.

Continua

Conclusão

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
2. Limitações relacionadas aos métodos usados para identificar e selecionar estudos.	Alto.	É provável que estudos relevantes tenham sido perdidos durante as buscas. Embora poucas informações tenham sido fornecidas, a variedade de bases de dados pesquisadas parece não ter sido suficiente, nem a estratégia de busca incluiu termos para delineamentos de estudos de diagnóstico. Ademais, métodos de busca adicionais à pesquisa em bases de dados não foram reportados e a restrição das buscas a partir de 1980 não foi justificada.
3. Limitações relacionadas aos métodos usados para coletar dados e avaliar estudos.	Alto.	A falta de avaliação da qualidade dos artigos significa que o risco de viés dos estudos incluídos não é claro. Não houve detalhamento suficiente sobre os estudos para permitir a interpretação dos resultados. Portanto, existe um alto risco de viés tanto na coleta de dados quanto no processo de avaliação dos estudos.
4. Limitações relacionadas à síntese de resultados.	Alto.	Embora os métodos de análise utilizados nesta revisão não tenham sido os mais robustos, eles parecem ser confiáveis. A maior preocupação nesta revisão se refere à falta de avaliação da heterogeneidade. Como foram fornecidos poucos detalhes sobre os estudos e a avaliação formal do risco de viés não foi realizada, não foi possível avaliar se os estudos diferiram uns dos outros. Por exemplo, se um estudo for mais confiável do que outros incluídos na revisão, os resultados, como um todo, estarão com viés.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

Descrição do texto:

Esta metanálise e revisão sistemática indicaram que a sensibilidade e a especificidade agrupadas do ultrassom endoscópico para invasão do tumor T0 é muito alta (aproximadamente 97%)[...] A heterogeneidade entre os estudos foi avaliada não só por um teste de heterogeneidade, mas também por sorteios das curvas Summary Receiver Operating Characterist (SROC) para encontrar a área sob a curva Area Under the Curve (AUC) uma vez que diferentes estudos podem usar diferentes critérios. Uma AUC de 1 para qualquer teste diagnóstico indica que o teste é excelente. Curvas SROC para o ultrassom endoscópico mostraram que o valor de AUC foi muito próximo a um, indicando que o ultrassom endoscópico é um teste diagnóstico excelente para o estágio T0 do câncer retal... O ultrassom endoscópico tem sensibilidade e especificidade excelentes, o que ajuda a diagnosticar o estágio T0 do câncer retal de forma precisa[...].³

Quadro 22 – Exemplo de classificação para síntese de resultados julgada como de alto potencial de viés

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
A. A interpretação dos achados considerou todos os riscos potenciais identificados na Fase 2?	Não.	Nenhuma das limitações identificadas na Fase 2 foram consideradas na interpretação dos resultados pelos autores da revisão.
B. A relevância dos estudos foi apropriadamente considerada para a pergunta de pesquisa da revisão?	Não.	A revisão não avaliou se os estudos incluídos eram relevantes para a pergunta de pesquisa. Ademais, havia informações insuficientes para permitir que os autores realizassem este julgamento.
C. Os autores se preocuparam em não enfatizar os resultados com base apenas na sua significância estatística?	Sim.	As ênfases dadas na discussão e na conclusão foram baseadas em todas as estimativas das análises primárias dos estudos.
Risco de viés.	Alto.	A Fase 2 identificou algumas áreas potenciais de risco de viés no processo de revisão que não foram consideradas pelos autores. Tais áreas incluem critérios de elegibilidade pouco claros, possibilidade de perda de estudos, falta de avaliação formal da qualidade, detalhamento insuficiente dos estudos incluídos e falhas ao considerar heterogeneidade entre os estudos na síntese de resultados. A revisão também não considerou a relevância dos estudos para a pergunta de pesquisa a ser respondida. Portanto, esta revisão apresenta um alto risco de viés.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

a) Revisão classificada como de baixo potencial de viés

Quadro 23 – Quadro resumo dos potenciais de vieses identificados durante a Fase 2

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
1. Limitações relacionadas à especificação dos critérios de elegibilidade.	Baixo.	Todas as questões foram respondidas como "Sim" ou "Provavelmente sim", então não foram identificados riscos de potenciais vieses na especificação dos critérios de elegibilidade. A pergunta e os objetivos da revisão foram bem especificados, bem como o detalhamento e a justificativa dos critérios de elegibilidade.
2. Limitações relacionadas aos métodos usados para identificar e selecionar estudos.	Baixo.	Tanto o processo de leitura de títulos e resumos quanto o de textos na íntegra foram reportados e incluíram vários revisores. No entanto, não ficou claro se os revisores atuaram independentemente, assim este item foi classificado como "Provavelmente sim".

Continua

Conclusão

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
3. Limitações relacionadas aos métodos usados para coletar dados e avaliar estudos.	Alto.	Tanto a avaliação de todos os artigos quanto a coleta de dados relevantes foram realizadas de forma independente por no mínimo dois revisores. A qualidade dos estudos foi avaliada utilizando-se ferramenta apropriada.
4. Limitações relacionadas à síntese de resultados.	Baixo.	Os autores avaliaram a presença de heterogeneidade e realizaram análises de subgrupo.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

Descrição do texto:

Evidência atualizada indica que o oligohidrâmnio está fortemente associado com a mortalidade e com o desenvolvimento fetal inferior ao esperado para a idade gestacional; enquanto que o polihidrâmnio está associado ao peso ao nascer superior ao 90º percentil. Apesar de suas fortes associações com desfechos não favoráveis, eles não predizem desfechos de risco.³

Discussão

Nossa avaliação de qualidade revelou potenciais riscos de viés relacionados à seleção de pacientes, à realização do teste índice e ao método padrão de referência. Não foi possível realizar análise de subgrupo para gravidez pré-termo versus gravidez a termo e alguns estudos reportaram dados insuficientes para determinar se limites para mensuração do líquido amniótico foram ajustados para a gestação. Sempre que possível, utilizamos os resultados mais próximos ao momento do parto e realizamos análise de subgrupo para os casos em que o teste foi feito em até sete dias após o parto. Houve pouquíssimas informações sobre os métodos exatos de padrão de referência e se algum tratamento foi realizado entre o teste índice e o padrão. Portanto, uma grande preocupação se refere ao número de gestações com indução do parto por causa da presença de oligohidrâmnios, pois isto influencia os resultados dos desfechos da gestação, por exemplo, viés de intervenção. Esse viés só pode ser totalmente removido por meio da realização de um ensaio clínico randomizado, o que seria impossível neste caso, pois mensurações do volume do líquido amniótico se tornaram padrão no monitoramento fetal e no manejo de gestações de alto risco, portanto o recrutamento para tal ensaio clínico seria muito difícil. Finalmente, as medidas de desfecho utilizadas nesta revisão foram as reportadas pelos autores dos estudos incluídos, sendo muitas delas subjetivas (admissão à unidade neonatal de cuidados intensivos e necessidade de reanimação cardiorrespiratória). A única medida objetiva de desfecho não favorável são as amostras pareadas do pH do cordão umbilical; desfechos de longo prazo, como paralisia cerebral não foram reportados.³

Quadro 24 – Exemplo de classificação para síntese de resultados julgada como de baixo potencial de viés

Questões norteadoras	Classificação	Justificativa
A. A interpretação dos achados considerou todos os riscos potenciais identificados na Fase 2?	Sim.	Não foram identificados potenciais riscos de viés durante a Fase 2.
B. A relevância dos estudos para a pergunta de pesquisa da revisão foi adequadamente considerada?	Provavelmente sim.	As implicações dos achados da revisão foram discutidas em detalhe. As fontes potenciais de viés em termos de populações e desfechos nos estudos incluídos também foram detalhadamente discutidas, fato este que também influencia na avaliação de relevância.
C. Os autores se preocuparam em não enfatizar os resultados com base apenas na sua significância estatística?	Sim.	As conclusões da revisão refletem tanto os achados significantes quanto os não significantes.
Risco de viés.	Baixo.	A avaliação da Fase 2 não identificou potenciais riscos de viés no processo de revisão. As potenciais limitações dos estudos incluídos foram discutidas em detalhe na seção de discussão. As conclusões refletem apropriadamente os resultados da revisão.

Fonte: Elaboração do grupo ROBIS.

Considerações práticas ao utilizar a ROBIS

Nem sempre é fácil avaliar o risco de viés em revisões sistemáticas. A ferramenta ROBIS fornece uma abordagem estruturada para este fim. Embora a ROBIS tenha sido criada para ser usada por revisores de diferentes formações, é necessário ter alguma expertise metodológica e relacionada ao conteúdo abordado na revisão para utilização adequada da ferramenta. Recomenda-se que a avaliação com a ROBIS seja desempenhada por dois revisores independentes ou, no mínimo, por um revisor que avalie e o outro que confira a avaliação realizada. Nós recomendamos que todas as questões norteadoras da ROBIS sejam consideradas na avaliação da revisão. A ferramenta foi desenvolvida para ser genérica e poder ser aplicada a diversos temas, dessa forma, as questões que fazem parte da ROBIS deveriam ser relevantes para qualquer tipo de revisão. Como a ROBIS envolve a realização de julgamentos, a estratégia adotada para deixar esse processo mais transparente foi pedir aos revisores que justificassem cada uma das respostas dadas às questões norteadoras.

A avaliação completa requer que todas as questões norteadoras de todos os domínios sejam respondidas. No entanto, em alguns casos pode ser apropriado “interromper” a avaliação quando certo nível de classificação for atingido. Isto vai depender do objetivo da avaliação. Se o objetivo de utilização da ferramenta for fornecer uma avaliação do risco de viés na revisão e revelar as razões para os vieses, então uma avaliação completa será necessária. No entanto, se o objetivo é simplesmente avaliar se a revisão está sob potencial risco de viés em apenas determinados domínios, os avaliadores podem interromper a avaliação assim que o alto risco de viés tenha sido identificado. Por exemplo, se uma revisão não utilizou uma variedade adequada de bases de dados (questão 2.1), a revisão pode ser considerada com alto risco de viés neste domínio. Avaliadores interessados apenas em identificar se a revisão está sob o risco de viés, podem optar por não avaliar o restante das questões ou domínios, e simplesmente classificar a revisão como de alto risco de viés.

Referências

¹ CHOU, R. et al. Comparative effectiveness of antiviral treatment for hepatitis C virus infection in adults: a systematic review. *Annals of Internal Medicine*, Philadelphia, v. 158, n. 2, p. 114-123, 2013.

² RENEHAN, A. G. et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*, v. 371, n. 9612, p. 569-578, 2008.

³ PULI, S. R. et al. Can endoscopic ultrasound predict early rectal cancers that can be resected endoscopically? A meta-analysis and systematic review. *Digestive Disease Sciences*, New York, v. 55, n. 5, p. 1221-1229, 2010.

⁴ MORRIS, R. K. et al. Association and prediction of amniotic fluid measurements for adverse pregnancy outcome: systematic review and meta-analysis. *BJOG: an International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, Oxford, n. 121, n. 6, p. 686-699, 2014.

⁵ HIGGINS, J. P. T.; GREEN, S. (Ed.). *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions*. Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011. Disponível em: <<http://www.cochrane-handbook.org/>>. Acesso em: 23 mar. 2011.

⁶ BEYNON, R. et al. Search strategies to identify diagnostic accuracy studies in MEDLINE and EMBASE. *The Cochrane database of systematic reviews*, Oxford, v. 9, n. MR000022, 2013.

⁷ WHITING, P. et al. Inclusion of methodological filters in searches for diagnostic test accuracy studies misses relevant studies. *Journal of Clinical Epidemiology*, New York, v. 64, n. 6, p. 602-607, 2011.

⁸ CENTRE FOR REVIEWS AND DISSEMINATION. *Systematic Reviews: CRD's guidance for undertaking reviews in health care*. York: University of York, 2009. Disponível em: <https://www.york.ac.uk/media/crd/Systematic_Reviews.pdf>. Acesso em: 28 set. 2017.

⁹ LIJMER, J. G. et al. Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests. *Journal of the American Medical Association*, Chicago, v. 282, n. 11, p. 1061-1066, 1999.

¹⁰ NAYLOR, C. D. Meta-analysis and the meta-epidemiology of clinical research. *British Medical Journal*, London, v. 315, n. 7109, p. 617-619, 1997.

¹¹ RUTJES, A. W. Evidence of bias and variation in diagnostic accuracy studies. *Canadian Medical Association Journal*, Ottawa, v. 174, n. 4, p. 469-476, 2006.

¹² SCHULZ, K. F. Empirical evidence of bias. Dimensions of methodological quality associated with estimates of treatment effects in controlled trials. *Journal of the American Medical Association*, Chicago, v. 273, n. 5, p. 408-412, 1995.

¹³ STERNE, J. A. Statistical methods for assessing the influence of study characteristics on treatment effects in 'meta-epidemiological' research. *Statistics in Medicine*, New York, v. 21, n. 11, p. 1513-1524, 2002.

¹⁴ WOOD, L. et al. Empirical evidence of bias in treatment effect estimates in controlled trials with different interventions and outcomes: meta-epidemiological study. *British Medical Journal*, London, v. 336, n. 7644, p. 601-605, 2008.

¹⁵ HIGGINS, J. P. T. et al. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomized trials. *British Medical Journal*, London, v. 343, n. d5928, 2011.

¹⁶ WHITING, P. et al. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. *BMC Medical Research Methodology*, London, v. 3, n. 25, 2003.

¹⁷ JADAD, A. R. et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Controlled Clinical Trials*, New York, v. 17, n. 1, p. 1-12, 1996.

¹⁸ BORENSTEIN, M. et al. *Introduction to meta-analysis*. Chichester: Wiley, 2009.

¹⁹ SIMMONDS, M. C.; HIGGINS, J. P. A general framework for the use of logistic regression models in meta-analysis. *Statistical Methods in Medical Research*, London, v. 25, n. 6, p. 2858-2877, 2016.

²⁰ MAVRIDIS, D.; SALANTI, G. A practical introduction to multivariate meta-analysis. *Statistical Methods in Medical Research*, London, v. 22, n. 2, p. 133-158, 2013.

²¹ LU, G.; ADES, A. E. Combination of direct and indirect evidence in mixed treatment comparisons. *Statistics in Medicine*, Chichester, v. 23, n. 20, p. 3105-3124, 2004.

²² THOMPSON, S. G.; HIGGINS, J. P. How should meta-regression analyses be undertaken and interpreted? *Statistics in Medicine*, Chichester, v. 21, n. 11, p. 1559-1573, 2002.

²³ LEEFLANG, M. M. et al. Systematic reviews of diagnostic test accuracy. *Annals of Internal Medicine*, Philadelphia, v. 149, n. 12, p. 889-897, 2008.

²⁴ DUVAL, S.; TWEEDIE, R. Trim and fill: A simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics*, Washington, DC, v. 56, n. 2, p. 455-463, 2000.

²⁵ VAN HOWE, R. S. Circumcision and HIV infection: review of the literature and meta-analysis. *International Journal of STD and AIDS*, London, v. 10, n. 1, p. 8-16, 1999.

²⁶ WHITING, P. F. et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Annals of Internal Medicine*, Philadelphia, v. 155, n. 8, p. 529-536, 2011.

Glossário

Esta sessão apresenta uma visão geral da definição de alguns dos termos utilizados na ROBIS no contexto em que os mesmos são empregados na ferramenta.

45

Tipo de revisão	Píco/equivalente
Autores da overview	Autores da revisão de revisões sistemáticas.
Autores da revisão	Autores da revisão sistemática, algumas vezes chamados também de revisores.
Base de dados	Base de dados bibliográfica que indexa estudos.
Coleta de dados	Processo de coleta de dados de estudos primários e outras fontes, também conhecida como extração de dados. Pode envolver a coleta de informações de fontes adicionais (ex.: contatando os autores) bem como a extração dos dados dos estudos primários.
Crítérios de elegibilidade	Crítério utilizado para determinar quando um estudo deve ser incluído ou excluído de uma revisão sistemática. Também conhecido como critério de inclusão/exclusão.
Diretriz	Conhecimento organizado sistematicamente para auxiliar profissionais e pacientes a tomarem decisões relacionadas ao cuidado em saúde apropriado para situações clínicas específicas. Devem ser baseadas nas melhores evidências disponíveis. Isto significa que os elaboradores de diretrizes devem incluir e avaliar as revisões sistemáticas existentes.
Estimativa sumária	Uma única estimativa de efeito derivada de múltiplos estudos usando metanálise.
Estratégia de busca	Termo exato e suas combinações utilizadas na busca nas bases de dados bibliográficas.
Estudos	Estudos primários incluídos na revisão sistemática. Um único estudo pode estar presente em diferentes relatórios.
Fontes eletrônicas	Fontes disponíveis na internet (que não sejam bases de dados) utilizadas para armazenar estudos para inclusão em revisões sistemáticas.
Heterogeneidade	Variabilidade entre os estudos. Heterogeneidade pode ser usada de forma geral para descrever as diferenças entre os estudos em termos da população, intervenção, comparador, qualidade metodológica e delineamento. Heterogeneidade estatística ocorre quando o efeito estimado entre os estudos difere muito do valor esperado devido à variação da amostra (chance).
Leitores	Pessoas que estão lendo a revisão sistemática.
Metanálise	Método estatístico que consiste em combinar os resultados de diferentes estudos. Isto é feito calculando-se a média ponderada das estimativas de efeito. Uma metanálise é normalmente conduzida como parte de uma revisão sistemática, mas nem sempre é apropriado ou possível fazê-la.
Overview	É uma revisão de revisões sistemáticas.
Questão alvo	Questão que os avaliadores estão tentando responder na overview ou diretriz.
Relatórios	Síntese dos métodos, achados e conclusões de um estudo, que podem estar publicados ou não. Um único estudo pode constar de diferentes relatórios e um único relatório pode conter diferentes estudos.
Relevância	O quanto que a questão da revisão combina com a questão de interesse.
Revisão	Referido como uma abreviação para revisão sistemática. Também pode ser utilizado para significar uma revisão não sistemática, porém este não é o significado no contexto da ROBIS.

[Continua](#)

Ministério da Saúde

Conclusão

46

Tipo de revisão	Pico/equivalente
Revisão sistemática	Abordagem sistemática de revisar e sumarizar as evidências de estudos. Segue uma estrutura definida para identificar, avaliar e sumarizar toda evidência disponível sobre uma questão de pesquisa específica. Pode incluir metanálise, sem ser, no entanto, um requisito essencial.
Significância estatística	A probabilidade de que o resultado observado ou um resultado extremo seja causado pelo acaso, considerando-se que a hipótese nula é verdadeira. Testes de hipóteses estatísticas são usados para determinar se os resultados de um estudo podem levar à rejeição da hipótese nula. Normalmente, define-se um limiar de 5% para a rejeição da hipótese nula, porém qualquer outro valor pode ser escolhido. Assim, se o valor de p é menor do que 0,05 (ou outro nível especificado), então o resultado deve ser considerado estatisticamente significativo e a hipótese nula rejeitada.
Síntese	Análise quantitativa e qualitativa utilizada para sumarizar os resultados de estudos primários incluídos na revisão sistemática.
Teste índice	Teste de rastreamento no qual a sua acurácia será avaliada em relação ao teste padrão ouro.
Viés	Erros sistemáticos ou limitações no delineamento, condução ou análise de revisão que influenciam os resultados.

Anexo

Fase 1: Avaliação da relevância (Opcional)

A ROBIS foi elaborada para avaliar o risco de viés em revisões que abordam questões relacionadas a intervenções, etiologia, diagnóstico e prognóstico. Compare a pergunta de sua *overview* ou diretriz (“questão alvo”) com a pergunta que está sendo abordada na revisão em análise.

Para revisões de intervenções:

Categoria	Questão alvo (ex.: <i>overview</i> ou diretriz)	Questão da revisão em análise
Pacientes/População:		
Intervenção:		
Comparador:		
Desfecho:		

Para revisões de etiologia:

Categoria	Questão alvo (ex.: <i>overview</i> ou diretriz)	Questão da revisão em análise
Pacientes/População:		
Exposição/ Comparador:		
Desfecho:		

Para revisões de diagnóstico:

Categoria	Questão alvo (ex.: <i>overview</i> ou diretriz)	Questão da revisão em análise
Pacientes/População:		
Teste índice:		
Padrão ouro:		
Condição alvo:		

Para revisões de prognóstico:

Categoria	Questão alvo (ex.: overview ou diretriz)	Questão da revisão em análise
Pacientes/População:		
Desfecho a ser predito:		
Modelo pretendido:		
Momento pretendido no tempo:		

A pergunta abordada pela revisão corresponde à questão alvo?

SIM/NÃO/INCERTO

Fase 2: Identificando os potenciais riscos de viés durante o processo da revisão

A ROBIS foi elaborada para avaliar o risco de viés em revisões que abordam questões relacionadas a intervenções, etiologia, diagnóstico e prognóstico. Compare a pergunta de sua *overview* ou diretriz (“questão alvo”) com a pergunta que está sendo abordada na revisão em análise.

Para revisões de intervenções:

DOMÍNIO 1: CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE DOS ESTUDOS

Descreva os critérios de elegibilidade do estudo, as restrições em relação à elegibilidade e se há evidência de que os objetivos e critérios de elegibilidade foram especificados previamente:

1.1 Os objetivos e critérios de elegibilidade foram definidos previamente?	S/PS/PN/N/SI
1.2 Os critérios de elegibilidade eram apropriados à pergunta da revisão?	S/PS/PN/N/SI
1.3 Os critérios de elegibilidade foram bem especificados (sem ambiguidade)?	S/PS/PN/N/SI
1.4 Com relação aos critérios de elegibilidade, as restrições baseadas nas características dos estudos foram apropriadas? (por ex.: data, tamanho da amostra, qualidade do estudo, desfechos mensurados)	S/PS/PN/N/SI
1.5 Com relação aos critérios de elegibilidade, as restrições baseadas nas fontes de informações foram apropriadas? (status ou formato da publicação, idioma, disponibilidade de dados)	S/PS/PN/N/SI
Gradação do potencial risco de viés nas especificações dos critérios de elegibilidade do estudo:	ALTO/BAIXO/INCERTO

Justificativa:

S=SIM, PS=PROVAVELMENTE SIM, PN=PROVAVELMENTE NÃO, N=NÃO, SI= SEM INFORMAÇÃO

DOMÍNIO 2: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DOS ESTUDOS	
Descreva os métodos de identificação e seleção de estudos (ex.: número de revisores envolvidos):	
2.1 A busca incluiu uma variedade suficiente de bases de dados/fontes eletrônicas para pesquisar artigos publicados e não publicados?	S/PS/PN/N/SI
2.2 Além da busca nas bases de dados foram utilizados métodos adicionais para a identificação de artigos relevantes?	S/PS/PN/N/SI
2.3 Os termos e a estrutura da estratégia de busca foram adequados para obter o maior número possível de artigos?	S/PS/PN/N/SI
2.4 As restrições baseadas na data, formato de publicação ou idioma foram adequadas?	S/PS/PN/N/SI
2.5 Foram realizadas tentativas para minimizar erros na seleção dos estudos?	S/PS/PN/N/SI
Gradação do potencial risco de viés em relação aos métodos utilizados para identificar e/ou selecionar os estudos.	ALTO/BAIXO/ INCERTO
Justificativa:	

S=SIM, PS=PROVAVELMENTE SIM, PN=PROVAVELMENTE NÃO, N=NÃO, SI= SEM INFORMAÇÃO

DOMÍNIO 3: COLETA DE DADOS E AVALIAÇÃO DO ESTUDO	
Descreva os métodos utilizados na coleta de dados, o tipo de dado extraído dos estudos ou coletado por outros meios, como o risco de viés foi avaliado (ex.: número de revisores envolvidos) e a ferramenta utilizada:	
3.1 Foram realizadas tentativas para minimizar o erro na coleta de dados?	S/PS/PN/N/SI
3.2 As características disponíveis do estudo foram suficientes para que os autores e leitores da revisão fossem capazes de interpretar os resultados?	S/PS/PN/N/SI
3.3 Todos os resultados relevantes foram coletados para uso na síntese?	S/PS/PN/N/SI
3.4 O risco de viés (ou qualidade metodológica) foi formalmente avaliado usando critérios apropriados?	S/PS/PN/N/SI
3.5 Foram realizadas tentativas para minimizar o erro na avaliação do risco de viés?	S/PS/PN/N/SI
Gradação do potencial risco de viés em relação aos métodos utilizados para coletar dados e avaliar estudos:	ALTO/BAIXO/ INCERTO
Justificativa:	

S=SIM, PS=PROVAVELMENTE SIM, PN=PROVAVELMENTE NÃO, N=NÃO, SI= SEM INFORMAÇÃO

DOMÍNIO 4: SÍNTESE E RESULTADOS

Descreva os métodos utilizados na síntese e resultados:

4.1 A síntese de resultados incluiu todos os estudos que deveriam ser incluídos?	S/PS/PN/N/SI
4.2 Todas as análises pré-definidas foram reportadas ou as perdas de participantes foram explicadas?	S/PS/PN/N/SI
4.3 A síntese dos resultados foi apropriada dada a natureza e a similaridade das questões de pesquisa, dos delineamentos de estudos e desfechos dos estudos incluídos?	S/PS/PN/N/SI
4.4 A variação entre os estudos (heterogeneidade) foi baixa ou abordada na síntese?	S/PS/PN/N/SI
4.5 Os resultados foram robustos? Como demonstrado, por exemplo, pelo <i>funnel plot</i> ou análise de sensibilidade.	S/PS/PN/N/SI
4.6 Os vieses nos estudos primários foram mínimos ou foram abordados na síntese?	S/PS/PN/N/SI
Gradação do potencial risco de viés em relação à síntese e resultados:	ALTO/BAIXO/ INCERTO

Justificativa:

S=SIM, PS=PROVAVELMENTE SIM, PN=PROVAVELMENTE NÃO, N=NÃO, SI= SEM INFORMAÇÃO

Fase 3: Avaliando o risco de viés

Resuma os problemas identificados durante a avaliação da Fase 2:

Domínio	Gradação do potencial risco de viés	Justificativa
1. Critérios de elegibilidade dos estudos		
2. Identificação e seleção dos estudos		
3. Coleta de dados e avaliação do estudo		
4. Síntese e resultados		

RISCO DE VIÉS NA REVISÃO

Descreva se as conclusões foram embasadas pela evidência:

A. A interpretação dos achados considerou todos os riscos potenciais identificados na Fase 2?	S/PS/PN/N/SI
B. A relevância dos estudos para a pergunta de pesquisa da revisão foi adequadamente considerada?	S/PS/PN/N/SI
C. Os revisores evitaram enfatizar os resultados com base na sua significância estatística.	S/PS/PN/N/SI
Risco de viés da revisão	ALTO/BAIXO/ INCERTO



DISQUE SAÚDE

136

0800-708-136
www.saude.gov.br

Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde
www.saude.gov.br/bvs



ANEXO F – FERRAMENTA ROBIS EM LÍNGUA ORIGINAL (INGLÊS).

ROBIS: Tool to assess risk of bias in systematic reviews

Phase 1: Assessing relevance (Optional)

ROBIS is designed to assess the risk of bias in reviews with questions relating to interventions, aetiology, diagnosis and prognosis. State your overview/guideline question (target question) and the question being addressed in the review being assessed:

Intervention reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients/Population(s):		
Intervention(s):		
Comparator(s):		
Outcome(s):		

For aetiology reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients/Population(s):		
Exposure(s) and comparator(s):		
Outcome(s):		

For DTA reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients:		
Index test(s):		
Reference standard:		
Target condition:		

For prognostic reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients:		
Outcome to be predicted:		
Intended use of model:		
Intended moment in time:		

Does the question addressed by the review match the target question?	YES/NO/UNCLEAR
--	----------------

Phase 2: Identifying concerns with the review process

DOMAIN 1: STUDY ELIGIBILITY CRITERIA	
Describe the study eligibility criteria, any restrictions on eligibility and whether there was evidence that objectives and eligibility criteria were pre-specified:	
1.1 Did the review adhere to pre-defined objectives and eligibility criteria?	Y/PY/PN/N/NI
1.2 Were the eligibility criteria appropriate for the review question?	Y/PY/PN/N/NI
1.3 Were eligibility criteria unambiguous?	Y/PY/PN/N/NI
1.4 Were all restrictions in eligibility criteria based on study characteristics appropriate (e.g. date, sample size, study quality, outcomes measured)?	Y/PY/PN/N/NI
1.5 Were any restrictions in eligibility criteria based on sources of information appropriate (e.g. publication status or format, language, availability of data)?	Y/PY/PN/N/NI
Concerns regarding specification of study eligibility criteria	LOW/HIGH/UNCLEAR
Rationale for concern:	

DOMAIN 2: IDENTIFICATION AND SELECTION OF STUDIES	
Describe methods of study identification and selection (e.g. number of reviewers involved):	
2.1 Did the search include an appropriate range of databases/electronic sources for published and unpublished reports?	Y/PY/PN/N/NI
2.2 Were methods additional to database searching used to identify relevant reports?	Y/PY/PN/N/NI
2.3 Were the terms and structure of the search strategy likely to retrieve as many eligible studies as possible?	Y/PY/PN/N/NI
2.4 Were restrictions based on date, publication format, or language appropriate?	Y/PY/PN/N/NI
2.5 Were efforts made to minimise error in selection of studies?	Y/PY/PN/N/NI
Concerns regarding methods used to identify and/or select studies	LOW/HIGH/UNCLEAR
Rationale for concern:	

DOMAIN 3: DATA COLLECTION AND STUDY APPRAISAL	
Describe methods of data collection, what data were extracted from studies or collected through other means, how risk of bias was assessed (e.g. number of reviewers involved) and the tool used to assess risk of bias:	
3.1 Were efforts made to minimise error in data collection?	Y/PY/PN/N/NI
3.2 Were sufficient study characteristics available for both review authors and readers to be able to interpret the results?	Y/PY/PN/N/NI
3.3 Were all relevant study results collected for use in the synthesis?	Y/PY/PN/N/NI
3.4 Was risk of bias (or methodological quality) formally assessed using appropriate criteria?	Y/PY/PN/N/NI
3.5 Were efforts made to minimise error in risk of bias assessment?	Y/PY/PN/N/NI
Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies	LOW/HIGH/UNCLEAR
Rationale for concern:	

DOMAIN 4: SYNTHESIS AND FINDINGS	
Describe synthesis methods:	
4.1 Did the synthesis include all studies that it should?	Y/PY/PN/N/NI
4.2 Were all pre-defined analyses reported or departures explained?	Y/PY/PN/N/NI
4.3 Was the synthesis appropriate given the nature and similarity in the research questions, study designs and outcomes across included studies?	Y/PY/PN/N/NI
4.4 Was between-study variation (heterogeneity) minimal or addressed in the synthesis?	Y/PY/PN/N/NI
4.5 Were the findings robust, e.g. as demonstrated through funnel plot or sensitivity analyses?	Y/PY/PN/N/NI
4.6 Were biases in primary studies minimal or addressed in the synthesis?	Y/PY/PN/N/NI
Concerns regarding the synthesis and findings	LOW/HIGH/UNCLEAR
Rationale for concern:	

Y=YES, PY=PROBABLY YES, PN=PROBABLY NO, N=NO, NI=NO INFORMATION

Phase 3: Judging risk of bias

Summarize the concerns identified during the Phase 2 assessment:

Domain	Concern	Rationale for concern
1. Concerns regarding specification of study eligibility criteria		
2. Concerns regarding methods used to identify and/or select studies		
3. Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies		
4. Concerns regarding the synthesis and findings		

RISK OF BIAS IN THE REVIEW	
Describe whether conclusions were supported by the evidence:	
A. Did the interpretation of findings address all of the concerns identified in Domains 1 to 4?	Y/PY/PN/N/NI
B. Was the relevance of identified studies to the review's research question appropriately considered?	Y/PY/PN/N/NI
C. Did the reviewers avoid emphasizing results on the basis of their statistical significance?	Y/PY/PN/N/NI
Risk of bias in the review	RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR
Rationale for risk:	

Y=YES, PY=PROBABLY YES, PN=PROBABLY NO, N=NO, NI=NO INFORMATION

**ANEXO G – FERRAMENTA ROBIS EM LÍNGUA PORTUGUESA (TRADUÇÃO
NÃO VALIDADA).**

ROBIS: Ferramenta para avaliar risco de viés em revisões sistemáticas

Fase 1: Avaliação da relevância (Opcional)

A ROBIS foi desenhada para avaliar o risco de viés em revisões com questões relacionadas a intervenções, etiologia, diagnóstico e prognóstico. Compare a pergunta de sua *overview* ou diretriz ("questão alvo") com a pergunta que está sendo abordada na revisão em análise.

Para revisões de intervenções:

Categoria	Questão alvo (ex.: <i>overview</i> ou diretriz)	Questão da revisão em análise
Pacientes/População:		
Intervenção:		
Comparador:		
Desfecho:		

Para revisões de etiologia:

Categoria	Questão alvo (ex.: <i>overview</i> ou diretriz)	Questão da revisão em análise
Pacientes/População:		
Exposição/Comparador:		
Desfecho:		

Para revisões de diagnóstico:

Categoria	Questão alvo (ex.: <i>overview</i> ou diretriz)	Questão da revisão em análise
Pacientes/População:		
Teste <i>index</i> :		
Padrão de referência:		
Condição alvo:		

Para revisões de prognóstico:

Categoria	Questão alvo (ex.: <i>overview</i> ou diretriz)	Questão da revisão em análise
Pacientes/População:		
Predição de desfecho:		
Modelo pretendido:		
Momento pretendido no tempo:		

A pergunta abordada pela revisão corresponde à questão alvo? SIM/NÃO/INCERTO

Fase 2: Identificando os potenciais riscos de viés durante o processo da revisão

DOMINIO 1: CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE DOS ESTUDOS	
Descreva os critérios de elegibilidade do estudo, as restrições em relação à elegibilidade e se há evidência de que os objetivos e critérios de elegibilidade foram previamente especificados:	
1.1 Os objetivos e critérios de elegibilidade foram definidos previamente?	S/PS/PN/N/SI
1.2 Os critérios de elegibilidade eram apropriados à pergunta da revisão?	S/PS/PN/N/SI
1.3 Os critérios de elegibilidade foram bem especificados (sem ambiguidade)?	S/PS/PN/N/SI
1.4 Com relação aos critérios de elegibilidade, as restrições baseadas nas características dos estudos foram apropriadas?	S/PS/PN/N/SI
1.5 Com relação aos critérios de elegibilidade, as restrições baseadas nas fontes de informações foram apropriadas?	S/PS/PN/N/SI
Gradação do potencial risco de viés nas especificações dos critérios de elegibilidade do estudo: Justificativa:	ALTO/BAIXO/INCERTO

S=SIM, PS=PROVAVELMENTE SIM, PN=PROVAVELMENTE NÃO, N=NÃO, SI= SEM INFORMAÇÃO

DOMINIO 2: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DOS ESTUDOS	
Descreva os métodos de identificação e seleção de estudos (ex.: número de revisores envolvidos):	
1.1 A busca incluiu uma variedade suficiente de bases de dados/fontes eletrônicas para pesquisar artigos publicados e não publicados?	S/PS/PN/N/SI
1.2 Além da busca nas bases de dados foram utilizados métodos adicionais para a identificação de artigos relevantes?	S/PS/PN/N/SI
1.3 Os termos e a estrutura da estratégia de busca foram adequados para obter o maior número possível de artigos?	S/PS/PN/N/SI
1.4 As restrições baseadas na data, formato de publicação ou idioma foram adequadas?	S/PS/PN/N/SI
1.5 Foram realizadas tentativas para minimizar erros na seleção dos estudos?	S/PS/PN/N/SI

<p>Gradação do potencial risco de viés em relação aos métodos utilizados para identificar e/ou selecionar os estudos. ALTO/BAIXO/INCERTO</p> <p>Justificativa:</p>
--

S-SIM, PS-PROVAVELMENTE SIM, PN-PROVAVELMENTE NÃO, N-NÃO, SI- SEM INFORMAÇÃO

<p>DOMÍNIO 3: COLETA DE DADOS E AVALIAÇÃO DO ESTUDO</p> <p>Descreva os métodos utilizados na coleta de dados, o tipo de dado extraído dos estudos ou coletado por outros meios, como o risco de viés foi avaliado (ex.: número de revisores envolvidos) e a ferramenta utilizada:</p>	
1.1 Foram realizadas tentativas para minimizar o erro na coleta de dados?	S/PS/PN/N/SI
1.2 As características disponíveis do estudo foram suficientes para que os autores da revisão e leitores sejam capazes de interpretar os resultados?	S/PS/PN/N/SI
1.3 Todos os resultados relevantes foram coletados para uso na síntese?	S/PS/PN/N/SI
1.4 O risco de viés (ou qualidade metodológica) foi formalmente avaliado usando critérios apropriados?	S/PS/PN/N/SI
1.5 Foram realizadas tentativas para minimizar o erro na avaliação do risco de viés?	S/PS/PN/N/SI
<p>Gradação do potencial risco de viés em relação aos métodos utilizados para coletar dados e avaliar estudos: ALTO/BAIXO/INCERTO</p> <p>Justificativa:</p>	

S-SIM, PS-PROVAVELMENTE SIM, PN-PROVAVELMENTE NÃO, N-NÃO, SI- SEM INFORMAÇÃO

<p>DOMÍNIO 4: SÍNTESE E RESULTADOS</p> <p>Descreva os métodos de síntese:</p>	
A. A síntese de resultados incluiu todos os estudos que deveriam ser incluídos?	S/PS/PN/N/SI
B. Todas as análises pré-definidas foram seguidas ou as perdas de participantes foram explicadas?	S/PS/PN/N/SI
C. A síntese dos resultados foi apropriada dada a natureza e à similaridade das questões de pesquisa, dos delineamentos de estudos e desfechos dos estudos incluídos?	S/PS/PN/N/SI

D. A variação entre os estudos (heterogeneidade) foi baixa ou abordada na síntese?	S/PS/PN/N/SI
E. Os resultados foram robustos? Como demonstrado, por exemplo, pelo <i>funnel plot</i> ou análise de sensibilidade.	S/PS/PN/N/SI
Gradação do potencial risco de viés em relação à síntese e resultados: Justificativa:	ALTO/BAIXO/INCERTO

S=SIM, PS=PROVAVELMENTE SIM, PN=PROVAVELMENTE NÃO, N=NÃO, SI= SEM INFORMAÇÃO

Fase 3: Avaliando o risco de viés geral

Resuma os problemas identificados durante a avaliação da Fase 2:

Domínio	Gradação do potencial risco de viés	Justificativa
1. Critérios de elegibilidade dos estudos		
2. Identificação e seleção dos estudos		
3. Coleta de dados e avaliação do estudo		
4. Síntese e resultados		

RISCO DE VIÉS NA REVISÃO

Descreva se as conclusões foram embasadas pela evidência:

A. A interpretação dos achados considerou todos os riscos potenciais identificados na Fase 2?	S/PS/PN/N/SI
B. A relevância dos estudos para a pergunta de pesquisa da revisão foi adequadamente considerada?	S/PS/PN/N/SI
C. Os autores se preocuparam em não enfatizar os resultados com base apenas na sua significância estatística?	S/PS/PN/N/SI
Risco de viés da revisão:	ALTO/BAIXO/INCERTO

S=SIM, PS=PROVAVELMENTE SIM, PN=PROVAVELMENTE NÃO, N=NÃO, SI= SEM INFORMAÇÃO

ANEXO H – FERRAMENTA ROBIS – *CHECKLIST* DAS REVISÕES INCLUÍDAS.

ARTIGO 1

ROBIS: Tool to assess risk of bias in systematic reviews**Phase 1: Assessing relevance (Optional)**

ROBIS is designed to assess the risk of bias in reviews with questions relating to interventions, aetiology, diagnosis and prognosis. State your overview/guideline question (target question) and the question being addressed in the review being assessed:

Intervention reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients/Population(s):		
Intervention(s):		
Comparator(s):		
Outcome(s):		

For aetiology reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients/Population(s):		
Exposure(s) and comparator(s):		
Outcome(s):		

For DTA reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients):		
Index test(s):		
Reference standard:		
Target condition:		

For prognostic reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients:		
Outcome to be predicted:		
Intended use of model:		
Intended moment in time:		

Does the question addressed by the review match the target question?	YES/NO/UNCLEAR
--	----------------

Phase 2: Identifying concerns with the review process

DOMAIN 1: STUDY ELIGIBILITY CRITERIA	
Describe the study eligibility criteria, any restrictions on eligibility and whether there was evidence that objectives and eligibility criteria were pre-specified:	
1.1 Did the review adhere to pre-defined objectives and eligibility criteria?	X /PY/PN/N/NI
1.2 Were the eligibility criteria appropriate for the review question?	X /PY/PN/N/NI
1.3 Were eligibility criteria unambiguous?	X /PY/PN/N/NI
1.4 Were all restrictions in eligibility criteria based on study characteristics appropriate (e.g. date, sample size, study quality, outcomes measured)?	Y/ X /PN/N/NI
1.5 Were any restrictions in eligibility criteria based on sources of information appropriate (e.g. publication status or format, language, availability of data)?	X /PY/PN/N/NI
Concerns regarding specification of study eligibility criteria	X LOW/HIGH/UNCLEAR
Rationale for concern:	

DOMAIN 2: IDENTIFICATION AND SELECTION OF STUDIES	
Describe methods of study identification and selection (e.g. number of reviewers involved):	
2.1 Did the search include an appropriate range of databases/electronic sources for published and unpublished reports?	X /PY/PN/N/NI
2.2 Were methods additional to database searching used to identify relevant reports?	Y/PY/PN/ X /NI
2.3 Were the terms and structure of the search strategy likely to retrieve as many eligible studies as possible?	X /PY/PN/N/NI
2.4 Were restrictions based on date, publication format, or language appropriate?	X /PY/PN/N/NI
2.5 Were efforts made to minimise error in selection of studies?	Y/ X /PN/N/NI
Concerns regarding methods used to identify and/or select studies	LOW/ X HIGH/UNCLEAR
Rationale for concern:	

DOMAIN 3: DATA COLLECTION AND STUDY APPRAISAL	
Describe methods of data collection, what data were extracted from studies or collected through other means, how risk of bias was assessed (e.g. number of reviewers involved) and the tool used to assess risk of bias:	
3.1 Were efforts made to minimise error in data collection?	X /PY/PN/N/NI
3.2 Were sufficient study characteristics available for both review authors and readers to be able to interpret the results?	X /PY/PN/N/NI
3.3 Were all relevant study results collected for use in the synthesis?	X /PY/PN/N/NI
3.4 Was risk of bias (or methodological quality) formally assessed using appropriate criteria?	Y/PY/PN/ X /NI
3.5 Were efforts made to minimise error in risk of bias assessment?	Y/PY/PN/ X /NI
Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies	LOW/ X HIGH/UNCLEAR
Rationale for concern:	

DOMAIN 4: SYNTHESIS AND FINDINGS

Describe synthesis methods:

4.1 Did the synthesis include all studies that it should?	Y/PY/PN/N/NI
4.2 Were all pre-defined analyses reported or departures explained?	Y/PY/PN/N/NI
4.3 Was the synthesis appropriate given the nature and similarity in the research questions, study designs and outcomes across included studies?	Y/PY/PN/N/NI
4.4 Was between-study variation (heterogeneity) minimal or addressed in the synthesis?	Y/PY/PN/N/NI
4.5 Were the findings robust, e.g. as demonstrated through funnel plot or sensitivity analyses?	Y/PY/PN/N/NI
4.6 Were biases in primary studies minimal or addressed in the synthesis?	Y/PY/PN/N/NI
Concerns regarding the synthesis and findings	LOW/HIGH/UNCLEAR
Rationale for concern:	

Y=YES, PY=PROBABLY YES, PN=PROBABLY NO, N=NO, NI=NO INFORMATION

Phase 3: Judging risk of bias

Summarize the concerns identified during the Phase 2 assessment:

Domain	Concern	Rationale for concern
1. Concerns regarding specification of study eligibility criteria	BAIXO	VIDE QUADRO 13
2. Concerns regarding methods used to identify and/or select studies	ALTO	"
3. Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies	ALTO	"
4. Concerns regarding the synthesis and findings	ALTO	"

RISK OF BIAS IN THE REVIEW

Describe whether conclusions were supported by the evidence:

A. Did the interpretation of findings address all of the concerns identified in Domains 1 to 4?	Y/PY/PN/N/NI
B. Was the relevance of identified studies to the review's research question appropriately considered?	Y/PY/PN/N/NI
C. Did the reviewers avoid emphasizing results on the basis of their statistical significance?	Y/PY/PN/N/NI
Risk of bias in the review	RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR
Rationale for risk:	

Y=YES, PY=PROBABLY YES, PN=PROBABLY NO, N=NO, NI=NO INFORMATION

Artigo 2

ROBIS: Tool to assess risk of bias in systematic reviews

Phase 1: Assessing relevance (Optional)

ROBIS is designed to assess the risk of bias in reviews with questions relating to interventions, aetiology, diagnosis and prognosis. State your overview/guideline question (target question) and the question being addressed in the review being assessed:

Intervention reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients/Population(s):		
Intervention(s):		
Comparator(s):		
Outcome(s):		

For aetiology reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients/Population(s):		
Exposure(s) and comparator(s):		
Outcome(s):		

For DTA reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients):		
Index test(s):		
Reference standard:		
Target condition:		

For prognostic reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients:		
Outcome to be predicted:		
Intended use of model:		
Intended moment in time:		

Does the question addressed by the review match the target question?	YES/NO/UNCLEAR
--	----------------

Phase 2: Identifying concerns with the review process

DOMAIN 1: STUDY ELIGIBILITY CRITERIA	
Describe the study eligibility criteria, any restrictions on eligibility and whether there was evidence that objectives and eligibility criteria were pre-specified:	
1.1 Did the review adhere to pre-defined objectives and eligibility criteria?	Y/PY/PN/ N /NI
1.2 Were the eligibility criteria appropriate for the review question?	Y/PY/ PN /N/NI
1.3 Were eligibility criteria unambiguous?	Y/PY/PN/ N /NI
1.4 Were all restrictions in eligibility criteria based on study characteristics appropriate (e.g. date, sample size, study quality, outcomes measured)?	Y/PY/PN/ N /NI
1.5 Were any restrictions in eligibility criteria based on sources of information appropriate (e.g. publication status or format, language, availability of data)?	Y/PY/PN/ N /NI
Concerns regarding specification of study eligibility criteria	LOW/ HIGH /UNCLEAR
Rationale for concern:	

DOMAIN 2: IDENTIFICATION AND SELECTION OF STUDIES	
Describe methods of study identification and selection (e.g. number of reviewers involved):	
2.1 Did the search include an appropriate range of databases/electronic sources for published and unpublished reports?	Y/PY/PN/ N /NI
2.2 Were methods additional to database searching used to identify relevant reports?	Y/PY/PN/ N /NI
2.3 Were the terms and structure of the search strategy likely to retrieve as many eligible studies as possible?	Y/PY/PN/ N /NI
2.4 Were restrictions based on date, publication format, or language appropriate?	Y/PY/PN/ N /NI
2.5 Were efforts made to minimise error in selection of studies?	Y/PY/PN/ N /NI
Concerns regarding methods used to identify and/or select studies	LOW/ HIGH /UNCLEAR
Rationale for concern:	

DOMAIN 3: DATA COLLECTION AND STUDY APPRAISAL	
Describe methods of data collection, what data were extracted from studies or collected through other means, how risk of bias was assessed (e.g. number of reviewers involved) and the tool used to assess risk of bias:	
3.1 Were efforts made to minimise error in data collection?	Y/PY/PN/N/ N
3.2 Were sufficient study characteristics available for both review authors and readers to be able to interpret the results?	Y/ PY /PN/N/NI
3.3 Were all relevant study results collected for use in the synthesis?	Y/PY/ PN /N/NI
3.4 Was risk of bias (or methodological quality) formally assessed using appropriate criteria?	Y/PY/PN/ N /NI
3.5 Were efforts made to minimise error in risk of bias assessment?	Y/PY/PN/ N /NI
Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies	LOW/ HIGH /UNCLEAR
Rationale for concern:	

DOMAIN 4: SYNTHESIS AND FINDINGS

Describe synthesis methods:

4.1 Did the synthesis include all studies that it should?	Y/PY/ PN /N/NI
4.2 Were all pre-defined analyses reported or departures explained?	Y/PY/ PN / N /NI
4.3 Was the synthesis appropriate given the nature and similarity in the research questions, study designs and outcomes across included studies?	Y/PY/ PN /N/NI
4.4 Was between-study variation (heterogeneity) minimal or addressed in the synthesis?	Y/PY/ PN / N /NI
4.5 Were the findings robust, e.g. as demonstrated through funnel plot or sensitivity analyses?	Y/PY/ PN / N /NI
4.6 Were biases in primary studies minimal or addressed in the synthesis?	Y/PY/ PN / N /NI

Concerns regarding the synthesis and findings

LOW/~~HIGH~~/UNCLEAR

Rationale for concern:

Y=YES, PY=PROBABLY YES, PN=PROBABLY NO, N=NO, NI=NO INFORMATION

Phase 3: Judging risk of bias

Summarize the concerns identified during the Phase 2 assessment:

Domain	Concern	Rationale for concern
1. Concerns regarding specification of study eligibility criteria	ALTO	VIDE QUADRO 13.
2. Concerns regarding methods used to identify and/or select studies	ALTO	
3. Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies	ALTO	
4. Concerns regarding the synthesis and findings	ALTO	

RISK OF BIAS IN THE REVIEW

Describe whether conclusions were supported by the evidence:

A. Did the interpretation of findings address all of the concerns identified in Domains 1 to 4?	Y/PY/ PN /N/NI
B. Was the relevance of identified studies to the review's research question appropriately considered?	Y/PY/ PN /N/NI
C. Did the reviewers avoid emphasizing results on the basis of their statistical significance?	Y/PY/ PN /N/ NI

Risk of bias in the review

RISK: LOW/~~HIGH~~/UNCLEAR

Rationale for risk:

Y=YES, PY=PROBABLY YES, PN=PROBABLY NO, N=NO, NI=NO INFORMATION

Artigo 3

ROBIS: Tool to assess risk of bias in systematic reviews

Phase 1: Assessing relevance (Optional)

ROBIS is designed to assess the risk of bias in reviews with questions relating to interventions, aetiology, diagnosis and prognosis. State your overview/guideline question (target question) and the question being addressed in the review being assessed:

Intervention reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients/Population(s):		
Intervention(s):		
Comparator(s):		
Outcome(s):		

For aetiology reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients/Population(s):		
Exposure(s) and comparator(s):		
Outcome(s):		

For DTA reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients):		
Index test(s):		
Reference standard:		
Target condition:		

For prognostic reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients:		
Outcome to be predicted:		
Intended use of model:		
Intended moment in time:		

Does the question addressed by the review match the target question?

YES/NO/UNCLEAR

Phase 2: Identifying concerns with the review process

DOMAIN 1: STUDY ELIGIBILITY CRITERIA

Describe the study eligibility criteria, any restrictions on eligibility and whether there was evidence that objectives and eligibility criteria were pre-specified:

- | | |
|--|--------------------------|
| 1.1 Did the review adhere to pre-defined objectives and eligibility criteria? | X /PY/PN/N/NI |
| 1.2 Were the eligibility criteria appropriate for the review question? | X /PY/PN/N/NI |
| 1.3 Were eligibility criteria unambiguous? | X /PY/PN/N/NI |
| 1.4 Were all restrictions in eligibility criteria based on study characteristics appropriate (e.g. date, sample size, study quality, outcomes measured)? | X /PY/PN/N/NI |
| 1.5 Were any restrictions in eligibility criteria based on sources of information appropriate (e.g. publication status or format, language, availability of data)? | X /PY/PN/N/NI |

Concerns regarding specification of study eligibility criteria

~~X~~LOW/HIGH/UNCLEAR

Rationale for concern:

DOMAIN 2: IDENTIFICATION AND SELECTION OF STUDIES

Describe methods of study identification and selection (e.g. number of reviewers involved):

- | | |
|--|-----------------------------|
| 2.1 Did the search include an appropriate range of databases/electronic sources for published and unpublished reports? | X /PY/PN/N/NI |
| 2.2 Were methods additional to database searching used to identify relevant reports? | X /PY/PN/N/NI |
| 2.3 Were the terms and structure of the search strategy likely to retrieve as many eligible studies as possible? | Y/ X /PY/PN/N/NI |
| 2.4 Were restrictions based on date, publication format, or language appropriate? | X /PY/PN/N/NI |
| 2.5 Were efforts made to minimise error in selection of studies? | X /PY/PN/N/NI |

Concerns regarding methods used to identify and/or select studies

~~X~~LOW/HIGH/UNCLEAR

Rationale for concern:

DOMAIN 3: DATA COLLECTION AND STUDY APPRAISAL

Describe methods of data collection, what data were extracted from studies or collected through other means, how risk of bias was assessed (e.g. number of reviewers involved) and the tool used to assess risk of bias:

- | | |
|--|-----------------------------|
| 3.1 Were efforts made to minimise error in data collection? | X /PY/PN/N/NI |
| 3.2 Were sufficient study characteristics available for both review authors and readers to be able to interpret the results? | Y/ X /PY/PN/N/NI |
| 3.3 Were all relevant study results collected for use in the synthesis? | Y/ X /PY/PN/N/NI |
| 3.4 Was risk of bias (or methodological quality) formally assessed using appropriate criteria? | Y/ X /PY/PN/N/NI |
| 3.5 Were efforts made to minimise error in risk of bias assessment? | Y/ X /PY/PN/N/NI |

Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies

LOW/~~X~~HIGH/UNCLEAR

Rationale for concern:

DOMAIN 4: SYNTHESIS AND FINDINGS

Describe synthesis methods:

- | | |
|--|--|
| 4.1 Did the synthesis include all studies that it should? | Y/ PY /PN/N/NI |
| 4.2 Were all pre-defined analyses reported or departures explained? | Y/ PY /PN/N/NI |
| 4.3 Was the synthesis appropriate given the nature and similarity in the research questions, study designs and outcomes across included studies? | Y/ PY /PN/N/NI |
| 4.4 Was between-study variation (heterogeneity) minimal or addressed in the synthesis? | Y/ PY / PN /N/NI |
| 4.5 Were the findings robust, e.g. as demonstrated through funnel plot or sensitivity analyses? | Y/ PY / PN /N/NI |
| 4.6 Were biases in primary studies minimal or addressed in the synthesis? | Y/ PY /PN/ N /NI |

Concerns regarding the synthesis and findings
Rationale for concern:

LOW/~~HIGH~~/UNCLEAR

Y=YES, PY=PROBABLY YES, PN=PROBABLY NO, N=NO, NI=NO INFORMATION

Phase 3: Judging risk of bias

Summarize the concerns identified during the Phase 2 assessment:

Domain	Concern	Rationale for concern
1. Concerns regarding specification of study eligibility criteria	BAIXO	VIDE QUADRO 13
2. Concerns regarding methods used to identify and/or select studies	BAIXO	"
3. Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies	ALTO	"
4. Concerns regarding the synthesis and findings	ALTO	"

RISK OF BIAS IN THE REVIEW

Describe whether conclusions were supported by the evidence:

- | | |
|--|--------------------------|
| A. Did the interpretation of findings address all of the concerns identified in Domains 1 to 4? | X /PY/PN/N/NI |
| B. Was the relevance of identified studies to the review's research question appropriately considered? | X /PY/PN/N/NI |
| C. Did the reviewers avoid emphasizing results on the basis of their statistical significance? | X /PY/PN/N/NI |

Risk of bias in the review

RISK: ~~LOW~~/HIGH/UNCLEAR

Rationale for risk:

Y=YES, PY=PROBABLY YES, PN=PROBABLY NO, N=NO, NI=NO INFORMATION

Artigo 4

ROBIS: Tool to assess risk of bias in systematic reviews

Phase 1: Assessing relevance (Optional)

ROBIS is designed to assess the risk of bias in reviews with questions relating to interventions, aetiology, diagnosis and prognosis. State your overview/guideline question (target question) and the question being addressed in the review being assessed:

Intervention reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients/Population(s):		
Intervention(s):		
Comparator(s):		
Outcome(s):		

For aetiology reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients/Population(s):		
Exposure(s) and comparator(s):		
Outcome(s):		

For DTA reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients):		
Index test(s):		
Reference standard:		
Target condition:		

For prognostic reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients:		
Outcome to be predicted:		
Intended use of model:		
Intended moment in time:		

Does the question addressed by the review match the target question?

YES/NO/UNCLEAR

Phase 2: Identifying concerns with the review process

DOMAIN 1: STUDY ELIGIBILITY CRITERIA

Describe the study eligibility criteria, any restrictions on eligibility and whether there was evidence that objectives and eligibility criteria were pre-specified:

1.1 Did the review adhere to pre-defined objectives and eligibility criteria?	Y/PY/PN/N/NI
1.2 Were the eligibility criteria appropriate for the review question?	Y/PY/PN/N/NI
1.3 Were eligibility criteria unambiguous?	Y/PY/PN/N/NI
1.4 Were all restrictions in eligibility criteria based on study characteristics appropriate (e.g. date, sample size, study quality, outcomes measured)?	Y/PY/PN/N/NI
1.5 Were any restrictions in eligibility criteria based on sources of information appropriate (e.g. publication status or format, language, availability of data)?	Y/PY/PN/N/NI

Concerns regarding specification of study eligibility criteria LOW/HIGH/UNCLEAR

Rationale for concern:

DOMAIN 2: IDENTIFICATION AND SELECTION OF STUDIES

Describe methods of study identification and selection (e.g. number of reviewers involved):

2.1 Did the search include an appropriate range of databases/electronic sources for published and unpublished reports?	Y/PY/PN/N/NI
2.2 Were methods additional to database searching used to identify relevant reports?	Y/PY/PN/N/NI
2.3 Were the terms and structure of the search strategy likely to retrieve as many eligible studies as possible?	Y/PY/PN/N/NI
2.4 Were restrictions based on date, publication format, or language appropriate?	Y/PY/PN/N/NI
2.5 Were efforts made to minimise error in selection of studies?	Y/PY/PN/N/NI

Concerns regarding methods used to identify and/or select studies LOW/HIGH/UNCLEAR

Rationale for concern:

DOMAIN 3: DATA COLLECTION AND STUDY APPRAISAL

Describe methods of data collection, what data were extracted from studies or collected through other means, how risk of bias was assessed (e.g. number of reviewers involved) and the tool used to assess risk of bias:

3.1 Were efforts made to minimise error in data collection?	Y/PY/PN/N/NI
3.2 Were sufficient study characteristics available for both review authors and readers to be able to interpret the results?	Y/PY/PN/N/NI
3.3 Were all relevant study results collected for use in the synthesis?	Y/PY/PN/N/NI
3.4 Was risk of bias (or methodological quality) formally assessed using appropriate criteria?	Y/PY/PN/N/NI
3.5 Were efforts made to minimise error in risk of bias assessment?	Y/PY/PN/N/NI

Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies LOW/HIGH/UNCLEAR

Rationale for concern:

DOMAIN 4: SYNTHESIS AND FINDINGS

Describe synthesis methods:

4.1 Did the synthesis include all studies that it should?	Y/PY/PN/N/NI
4.2 Were all pre-defined analyses reported or departures explained?	Y/PY/PN/N/NI
4.3 Was the synthesis appropriate given the nature and similarity in the research questions, study designs and outcomes across included studies?	Y/PY/PN/N/NI
4.4 Was between-study variation (heterogeneity) minimal or addressed in the synthesis?	Y/PY/PN/N/NI
4.5 Were the findings robust, e.g. as demonstrated through funnel plot or sensitivity analyses?	Y/PY/PN/N/NI
4.6 Were biases in primary studies minimal or addressed in the synthesis?	Y/PY/PN/N/NI
Concerns regarding the synthesis and findings	LOW/HIGH/UNCLEAR
Rationale for concern:	

Y=YES, PY=PROBABLY YES, PN=PROBABLY NO, N=NO, NI=NO INFORMATION

Phase 3: Judging risk of bias

Summarize the concerns identified during the Phase 2 assessment:

Domain	Concern	Rationale for concern
1. Concerns regarding specification of study eligibility criteria	INCERTO	VIDE TABELA 13
2. Concerns regarding methods used to identify and/or select studies	INCERTO	
3. Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies	INCERTO	
4. Concerns regarding the synthesis and findings	INCERTO	

RISK OF BIAS IN THE REVIEW

Describe whether conclusions were supported by the evidence:

A. Did the interpretation of findings address all of the concerns identified in Domains 1 to 4?	Y/PY/PN/N/NI
B. Was the relevance of identified studies to the review's research question appropriately considered?	Y/PY/PN/N/NI
C. Did the reviewers avoid emphasizing results on the basis of their statistical significance?	Y/PY/PN/N/NI
Risk of bias in the review	RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR
Rationale for risk:	

Y=YES, PY=PROBABLY YES, PN=PROBABLY NO, N=NO, NI=NO INFORMATION

Artigo 5

ROBIS: Tool to assess risk of bias in systematic reviews

Phase 1: Assessing relevance (Optional)

ROBIS is designed to assess the risk of bias in reviews with questions relating to interventions, aetiology, diagnosis and prognosis. State your overview/guideline question (target question) and the question being addressed in the review being assessed:

Intervention reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients/Population(s):		
Intervention(s):		
Comparator(s):		
Outcome(s):		

For aetiology reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients/Population(s):		
Exposure(s) and comparator(s):		
Outcome(s):		

For DTA reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients):		
Index test(s):		
Reference standard:		
Target condition:		

For prognostic reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients:		
Outcome to be predicted:		
Intended use of model:		
Intended moment in time:		

Does the question addressed by the review match the target question?

YES/NO/UNCLEAR

Phase 2: Identifying concerns with the review process

DOMAIN 1: STUDY ELIGIBILITY CRITERIA

Describe the study eligibility criteria, any restrictions on eligibility and whether there was evidence that objectives and eligibility criteria were pre-specified:

1.1 Did the review adhere to pre-defined objectives and eligibility criteria?	Y/ PY /PN/N/NI
1.2 Were the eligibility criteria appropriate for the review question?	Y/ PY /PN/N/NI
1.3 Were eligibility criteria unambiguous?	Y/PY/ PN /N/NI
1.4 Were all restrictions in eligibility criteria based on study characteristics appropriate (e.g. date, sample size, study quality, outcomes measured)?	Y/PY/PN/ N /NI
1.5 Were any restrictions in eligibility criteria based on sources of information appropriate (e.g. publication status or format, language, availability of data)?	Y/PY/PN/ N /NI

Concerns regarding specification of study eligibility criteria

LOW/~~HIGH~~/UNCLEAR

Rationale for concern:

DOMAIN 2: IDENTIFICATION AND SELECTION OF STUDIES

Describe methods of study identification and selection (e.g. number of reviewers involved):

2.1 Did the search include an appropriate range of databases/electronic sources for published and unpublished reports?	Y/PY/PN/ N /NI
2.2 Were methods additional to database searching used to identify relevant reports?	Y/PY/PN/N/ N
2.3 Were the terms and structure of the search strategy likely to retrieve as many eligible studies as possible?	Y/PY/ PN /N/NI
2.4 Were restrictions based on date, publication format, or language appropriate?	Y/PY/PN/ N /NI
2.5 Were efforts made to minimise error in selection of studies?	Y/PY/PN/ N /NI

Concerns regarding methods used to identify and/or select studies

LOW/~~HIGH~~/UNCLEAR

Rationale for concern:

DOMAIN 3: DATA COLLECTION AND STUDY APPRAISAL

Describe methods of data collection, what data were extracted from studies or collected through other means, how risk of bias was assessed (e.g. number of reviewers involved) and the tool used to assess risk of bias:

3.1 Were efforts made to minimise error in data collection?	Y/PY/PN/N/ N
3.2 Were sufficient study characteristics available for both review authors and readers to be able to interpret the results?	Y/PY/PN/N/ N
3.3 Were all relevant study results collected for use in the synthesis?	Y/PY/PN/N/ N
3.4 Was risk of bias (or methodological quality) formally assessed using appropriate criteria?	Y/PY/PN/N/ N
3.5 Were efforts made to minimise error in risk of bias assessment?	Y/PY/PN/N/ N

Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies

LOW/~~HIGH~~/UNCLEAR

Rationale for concern:

DOMAIN 4: SYNTHESIS AND FINDINGS

Describe synthesis methods:

4.1 Did the synthesis include all studies that it should?	Y/PY/PN/N/NI
4.2 Were all pre-defined analyses reported or departures explained?	Y/PY/PN/N/NI
4.3 Was the synthesis appropriate given the nature and similarity in the research questions, study designs and outcomes across included studies?	Y/PY/PN/N/NI
4.4 Was between-study variation (heterogeneity) minimal or addressed in the synthesis?	Y/PY/PN/N/NI
4.5 Were the findings robust, e.g. as demonstrated through funnel plot or sensitivity analyses?	Y/PY/PN/N/NI
4.6 Were biases in primary studies minimal or addressed in the synthesis?	Y/PY/PN/N/NI

Concerns regarding the synthesis and findings

LOW/HIGH/UNCLEAR

Rationale for concern:

Y=YES, PY=PROBABLY YES, PN=PROBABLY NO, N=NO, NI=NO INFORMATION

Phase 3: Judging risk of bias

Summarize the concerns identified during the Phase 2 assessment:

Domain	Concern	Rationale for concern
1. Concerns regarding specification of study eligibility criteria	ALTO	VIDE QUADRO 13
2. Concerns regarding methods used to identify and/or select studies	ALTO	
3. Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies	INCERTO	
4. Concerns regarding the synthesis and findings	ALTO	

RISK OF BIAS IN THE REVIEW

Describe whether conclusions were supported by the evidence:

A. Did the interpretation of findings address all of the concerns identified in Domains 1 to 4?	Y/PY/PN/N/NI
B. Was the relevance of identified studies to the review's research question appropriately considered?	Y/PY/PN/N/NI
C. Did the reviewers avoid emphasizing results on the basis of their statistical significance?	Y/PY/PN/N/NI

Risk of bias in the review

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR

Rationale for risk:

Y=YES, PY=PROBABLY YES, PN=PROBABLY NO, N=NO, NI=NO INFORMATION

Artigo 6

ROBIS: Tool to assess risk of bias in systematic reviews

Phase 1: Assessing relevance (Optional)

ROBIS is designed to assess the risk of bias in reviews with questions relating to interventions, aetiology, diagnosis and prognosis. State your overview/guideline question (target question) and the question being addressed in the review being assessed:

Intervention reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients/Population(s):		
Intervention(s):		
Comparator(s):		
Outcome(s):		

For aetiology reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients/Population(s):		
Exposure(s) and comparator(s):		
Outcome(s):		

For DTA reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients):		
Index test(s):		
Reference standard:		
Target condition:		

For prognostic reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients:		
Outcome to be predicted:		
Intended use of model:		
Intended moment in time:		

Does the question addressed by the review match the target question?	YES/NO/UNCLEAR
--	----------------

Phase 2: Identifying concerns with the review process

DOMAIN 1: STUDY ELIGIBILITY CRITERIA

Describe the study eligibility criteria, any restrictions on eligibility and whether there was evidence that objectives and eligibility criteria were pre-specified:

- | | |
|--|--------------------------|
| 1.1 Did the review adhere to pre-defined objectives and eligibility criteria? | Y/ P /PN/N/NI |
| 1.2 Were the eligibility criteria appropriate for the review question? | X /PY/PN/N/NI |
| 1.3 Were eligibility criteria unambiguous? | X /PY/PN/N/NI |
| 1.4 Were all restrictions in eligibility criteria based on study characteristics appropriate (e.g. date, sample size, study quality, outcomes measured)? | Y/ P /PN/N/NI |
| 1.5 Were any restrictions in eligibility criteria based on sources of information appropriate (e.g. publication status or format, language, availability of data)? | Y/ P /PN/N/NI |

Concerns regarding specification of study eligibility criteria

~~X~~LOW/HIGH/UNCLEAR

Rationale for concern:

DOMAIN 2: IDENTIFICATION AND SELECTION OF STUDIES

Describe methods of study identification and selection (e.g. number of reviewers involved):

- | | |
|--|----------------------------|
| 2.1 Did the search include an appropriate range of databases/electronic sources for published and unpublished reports? | Y/ P /PN/N/NI |
| 2.2 Were methods additional to database searching used to identify relevant reports? | Y/PY/PN/N/ X NI |
| 2.3 Were the terms and structure of the search strategy likely to retrieve as many eligible studies as possible? | Y/ P /PN/N/NI |
| 2.4 Were restrictions based on date, publication format, or language appropriate? | Y/PY/PN/ X /NI |
| 2.5 Were efforts made to minimise error in selection of studies? | Y/ P /PN/N/NI |

Concerns regarding methods used to identify and/or select studies

LOW/~~X~~HIGH/UNCLEAR

Rationale for concern:

DOMAIN 3: DATA COLLECTION AND STUDY APPRAISAL

Describe methods of data collection, what data were extracted from studies or collected through other means, how risk of bias was assessed (e.g. number of reviewers involved) and the tool used to assess risk of bias:

- | | |
|--|--------------------------|
| 3.1 Were efforts made to minimise error in data collection? | Y/ P /PN/N/NI |
| 3.2 Were sufficient study characteristics available for both review authors and readers to be able to interpret the results? | Y/ P /PN/N/NI |
| 3.3 Were all relevant study results collected for use in the synthesis? | X /PY/PN/N/NI |
| 3.4 Was risk of bias (or methodological quality) formally assessed using appropriate criteria? | Y/PY/ X /N/NI |
| 3.5 Were efforts made to minimise error in risk of bias assessment? | Y/PY/ X /N/NI |

Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies

LOW/~~X~~HIGH/UNCLEAR

Rationale for concern:

DOMAIN 4: SYNTHESIS AND FINDINGS

Describe synthesis methods:

- | | |
|--|-------------------------------------|
| 4.1 Did the synthesis include all studies that it should? | Y/ PY /PN/N/NI |
| 4.2 Were all pre-defined analyses reported or departures explained? | Y/ PY /PN/N/NI |
| 4.3 Was the synthesis appropriate given the nature and similarity in the research questions, study designs and outcomes across included studies? | Y/ PY /PN/N/NI |
| 4.4 Was between-study variation (heterogeneity) minimal or addressed in the synthesis? | Y/ PY /PN/N/NI |
| 4.5 Were the findings robust, e.g. as demonstrated through funnel plot or sensitivity analyses? | Y/ PY /PN/N/NI |
| 4.6 Were biases in primary studies minimal or addressed in the synthesis? | Y/ PY /PN/ NI |

Concerns regarding the synthesis and findings

LOW/~~HIGH~~/UNCLEAR

Rationale for concern:

Y=YES, PY=PROBABLY YES, PN=PROBABLY NO, N=NO, NI=NO INFORMATION

Phase 3: Judging risk of bias

Summarize the concerns identified during the Phase 2 assessment:

Domain	Concern	Rationale for concern
1. Concerns regarding specification of study eligibility criteria	BAIXO	VIDE QUADRO 13
2. Concerns regarding methods used to identify and/or select studies	ALTO	
3. Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies	ALTO	
4. Concerns regarding the synthesis and findings	ALTO	

RISK OF BIAS IN THE REVIEW

Describe whether conclusions were supported by the evidence:

- | | |
|--|--|
| A. Did the interpretation of findings address all of the concerns identified in Domains 1 to 4? | Y/ PY / PN /N/NI |
| B. Was the relevance of identified studies to the review's research question appropriately considered? | Y/ PY /PN/N/NI |
| C. Did the reviewers avoid emphasizing results on the basis of their statistical significance? | Y/ PY /PN/N/NI |

Risk of bias in the review

RISK: ~~LOW~~/HIGH/UNCLEAR

Rationale for risk:

Y=YES, PY=PROBABLY YES, PN=PROBABLY NO, N=NO, NI=NO INFORMATION

Artigo 7

ROBIS: Tool to assess risk of bias in systematic reviews

Phase 1: Assessing relevance (Optional)

ROBIS is designed to assess the risk of bias in reviews with questions relating to interventions, aetiology, diagnosis and prognosis. State your overview/guideline question (target question) and the question being addressed in the review being assessed:

Intervention reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients/Population(s):		
Intervention(s):		
Comparator(s):		
Outcome(s):		

For aetiology reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients/Population(s):		
Exposure(s) and comparator(s):		
Outcome(s):		

For DTA reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients:		
Index test(s):		
Reference standard:		
Target condition:		

For prognostic reviews:

Category	Target question (e.g. overview or guideline)	Review being assessed
Patients:		
Outcome to be predicted:		
Intended use of model:		
Intended moment in time:		

Does the question addressed by the review match the target question?

YES/NO/UNCLEAR

Phase 2: Identifying concerns with the review process

DOMAIN 1: STUDY ELIGIBILITY CRITERIA

Describe the study eligibility criteria, any restrictions on eligibility and whether there was evidence that objectives and eligibility criteria were pre-specified:

- | | |
|--|--------------------------|
| 1.1 Did the review adhere to pre-defined objectives and eligibility criteria? | X /PY/PN/N/NI |
| 1.2 Were the eligibility criteria appropriate for the review question? | X /PY/PN/N/NI |
| 1.3 Were eligibility criteria unambiguous? | X /PY/PN/N/NI |
| 1.4 Were all restrictions in eligibility criteria based on study characteristics appropriate (e.g. date, sample size, study quality, outcomes measured)? | X /PY/PN/N/NI |
| 1.5 Were any restrictions in eligibility criteria based on sources of information appropriate (e.g. publication status or format, language, availability of data)? | X /PY/PN/N/NI |

Concerns regarding specification of study eligibility criteria

~~LOW~~/HIGH/UNCLEAR

Rationale for concern:

DOMAIN 2: IDENTIFICATION AND SELECTION OF STUDIES

Describe methods of study identification and selection (e.g. number of reviewers involved):

- | | |
|--|--------------------------|
| 2.1 Did the search include an appropriate range of databases/electronic sources for published and unpublished reports? | X /PY/PN/N/NI |
| 2.2 Were methods additional to database searching used to identify relevant reports? | X /PY/PN/N/NI |
| 2.3 Were the terms and structure of the search strategy likely to retrieve as many eligible studies as possible? | X /PY/PN/N/NI |
| 2.4 Were restrictions based on date, publication format, or language appropriate? | X /PY/PN/N/NI |
| 2.5 Were efforts made to minimise error in selection of studies? | X /PY/PN/N/NI |

Concerns regarding methods used to identify and/or select studies

~~LOW~~/HIGH/UNCLEAR

Rationale for concern:

DOMAIN 3: DATA COLLECTION AND STUDY APPRAISAL

Describe methods of data collection, what data were extracted from studies or collected through other means, how risk of bias was assessed (e.g. number of reviewers involved) and the tool used to assess risk of bias:

- | | |
|--|--------------------------|
| 3.1 Were efforts made to minimise error in data collection? | X /PY/PN/N/NI |
| 3.2 Were sufficient study characteristics available for both review authors and readers to be able to interpret the results? | X /PY/PN/N/NI |
| 3.3 Were all relevant study results collected for use in the synthesis? | X /PY/PN/N/NI |
| 3.4 Was risk of bias (or methodological quality) formally assessed using appropriate criteria? | X /PY/PN/N/NI |
| 3.5 Were efforts made to minimise error in risk of bias assessment? | X /PY/PN/N/NI |

Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies

~~LOW~~/HIGH/UNCLEAR

Rationale for concern:

DOMAIN 4: SYNTHESIS AND FINDINGS

Describe synthesis methods:

- | | |
|--|--------------------------|
| 4.1 Did the synthesis include all studies that it should? | X /PY/PN/N/NI |
| 4.2 Were all pre-defined analyses reported or departures explained? | X /PY/PN/N/NI |
| 4.3 Was the synthesis appropriate given the nature and similarity in the research questions, study designs and outcomes across included studies? | X /PY/PN/N/NI |
| 4.4 Was between-study variation (heterogeneity) minimal or addressed in the synthesis? | X /PY/PN/N/NI |
| 4.5 Were the findings robust, e.g. as demonstrated through funnel plot or sensitivity analyses? | X /PY/PN/N/NI |
| 4.6 Were biases in primary studies minimal or addressed in the synthesis? | X /PY/PN/N/NI |

Concerns regarding the synthesis and findings

~~LOW~~/HIGH/UNCLEAR

Rationale for concern:

Y=YES, PY=PROBABLY YES, PN=PROBABLY NO, N=NO, NI=NO INFORMATION

Phase 3: Judging risk of bias

Summarize the concerns identified during the Phase 2 assessment:

Domain	Concern	Rationale for concern
1. Concerns regarding specification of study eligibility criteria	BAIXO	VIDE QUADRO 13
2. Concerns regarding methods used to identify and/or select studies	BAIXO	
3. Concerns regarding methods used to collect data and appraise studies	BAIXO	
4. Concerns regarding the synthesis and findings	BAIXO	

RISK OF BIAS IN THE REVIEW

Describe whether conclusions were supported by the evidence:

- | | |
|--|--------------------------|
| A. Did the interpretation of findings address all of the concerns identified in Domains 1 to 4? | X /PY/PN/N/NI |
| B. Was the relevance of identified studies to the review's research question appropriately considered? | X /PY/PN/N/NI |
| C. Did the reviewers avoid emphasizing results on the basis of their statistical significance? | X /PY/PN/N/NI |

Risk of bias in the review

RISK: ~~LOW~~/HIGH/UNCLEAR

Rationale for risk:

Y=YES, PY=PROBABLY YES, PN=PROBABLY NO, N=NO, NI=NO INFORMATION