



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DO DELTA
DO PARNAÍBA**
COMISSÃO DE ÉTICA NO
USO DE ANIMAIS

JUSTIFICATIVA DO NÚMERO DE ANIMAIS

As orientações contidas nesse documento objetivam auxiliar o preenchimento do item “9.4. Justificativa do número amostral” presente no Formulário de Solicitação de Uso de Animais que deve ser entregue à CEUA-UFDPAr.

De modo a atingir mais apropriadamente o princípio dos 3 R's (*Reduction, Replacement e Refinement*), a Resolução Normativa n. 37, de 23 de outubro de 2015 do CONCEA, em seus anexos, institui a necessidade de realização de cálculo amostral para submissão de propostas de ensino/pesquisa às CEUAs. O número de animais utilizado em cada experimento deve ser determinado por meio de cálculo estatístico justificados e o planejamento estatístico deve basear-se em: (a) pesquisas anteriores dos autores proponentes; (b) dados publicados na literatura; (c) ou estudo piloto. Deve ser utilizado o número mínimo de animais para a obtenção de resultados estatisticamente válidos, de acordo com o princípio dos 3 R's.

O planejamento estatístico se refere ao que é feito anteriormente ao experimento, respaldado em modelos de estimação de tamanho amostral, testes de poder estatístico ou literatura que faça referência direta e demonstre claramente o procedimento para obtenção do número de repetições por parcela experimental. No que concerne à demonstração clara, entende-se que o pesquisador tenha conhecimento prévio do Método Científico e das estratégias de testagem de hipóteses. Quando a justificativa estatística é impraticável, o proponente deve explicar detalhadamente o motivo da impossibilidade. Não obstante, o número de animais proposto pode ainda ser embasado com citações a estudos recentes publicados em revistas indexadas, desde que os artigos apresentem desenho experimental idêntico ao proposto e estes sejam anexados ao formulário. A justificativa estatística não se aplica aos casos de padronização de procedimentos e estudos piloto para levantar a variabilidade dos resultados. Nesses casos, não se testam hipóteses, deste modo, o pesquisador pode discursar sobre a lógica que fundamenta o tamanho amostral proposto.

Na realização de qualquer estudo, é praticamente impossível examinar todos os elementos da população de interesse. Por isso, normalmente recorre-se a processos de amostragem. Amostragens probabilísticas, ou seja, que pressupõem sorteio ou alocação aleatória de seus elementos, e representativas do todo, nos dá subsídios para generalizar as conclusões obtidas a partir da amostra para a população, permitindo inferências estatísticas de maneira segura e com reconhecimento das limitações do processo. É importante ressaltar que a definição do tamanho de amostra é sempre realizada considerando responder uma pergunta de pesquisa em específico. Apesar de na grande maioria dos casos os projetos não estudarem somente uma única variável, é sempre preciso definir o foco principal que norteará o cálculo, ou gerar uma variável resposta que unificará o conjunto de dados coletados a fim de alcançar a resposta final. Em pesquisas nas quais diversas variáveis sejam importantes para análise do desfecho estudado, é indicado o cálculo do tamanho amostral para cada uma dessas variáveis. Existem diversos métodos para o cálculo do tamanho amostral. Cada um se aplica a um contexto diferente de tal forma que o pesquisador deve identificar a qual contexto sua pesquisa melhor se amolda.



Existem *softwares* gratuitos e páginas na internet que oferecem diferentes cálculos, dada a definição dos argumentos no contexto da pesquisa pelo pesquisador. Ressalta-se, assim, que a parte matemática do processo amostral é a de menor complexidade atualmente, sendo a definição dos seus argumentos o fator mais decisivo e importante. Abaixo, alguns exemplos de *softwares* livres de fácil acesso:

- GPOWER: Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., & Buchner, A. (2007). G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 39, 175-191. Disponível em: <https://www.psychologie.hhu.de/arbeitsgruppen/allgemeine-psychologie-und-arbeitspsychologie/gpower>
- EPITOOLS: Sergeant, ESG, 2018. Epitools Epidemiological Calculators. Ausvet. Disponível em: <http://epitools.ausvet.com.au>.
- BIOSTAT – Disponível em: <https://www.mamiraua.org.br/downloads/programas/>
- EPIINFO – Disponível em: https://www.cdc.gov/epiinfo/por/pt_index.html

Consideramos abaixo uma situação de amostra aleatória simples mais comum no âmbito dos projetos submetidos à apreciação da CEUA-UFDPAr. Estratégias amostrais mais específicas, devem buscar apoio profissional para o delineamento e determinação do tamanho amostral condizentes com suas complexidades. No exemplo apresentado a seguir, utilizaremos o *software* G*Power.

Exemplo:

Na presente proposta objetivamos avaliar o efeito protetor de uma fração proteica do látex de *Plumeria pudica* (PLPp) sobre o modelo de colite induzido por ácido acético em camundongos (*Mus musculus*) machos da raça Swiss com peso médio entre 25-30 g. No estudo, diferentes parâmetros serão avaliados a partir de amostras teciduais do cólon de camundongos, tais como escores macroscópicos e microscópicos de lesão, análise de peso úmido, atividade da mieloperoxidase (MPO), níveis de glutatona (GSH), concentração de malonaldeído (MDA) e níveis de citocinas, conforme descrição detalhada posterior. Para o presente estudo, consideramos a atividade da mieloperoxidase (MPO) como variável primária da lesão induzida por ácido acético e utilizamos este parâmetro para o cálculo do tamanho amostral a ser utilizado nos experimentos. Para a definição do número amostral o pesquisador deverá possuir dados dos grupos que serão avaliados, dados obtidos de pesquisas anteriores desenvolvidas pelo proponente ou dados publicados na literatura em que a mesma estratégia experimental proposta foi realizada:

1) Número de grupos experimentais que serão avaliados:

Controle, tratamento A, tratamento B e demais tratamentos. No exemplo em questão, os grupos experimentais a serem avaliados serão: 1: Controle Salina; 2: Controle ácido acético; 3: Tratamento A PLPp 10 mg/kg; 4: Tratamento B PLPp 20 mg/kg; 5 Tratamento C PLPp 40mg/kg, totalizando **5 grupos**.



2) Média dos valores de cada grupo experimental:

Aqui deve ser utilizados dados prévios do proponente ou da literatura. O exemplo em questão trata-se de um estudo inédito, ou seja, a fração PLPp não foi investigada ainda neste modelo experimental, desta forma as médias dos valores da atividade da MPO do cólon de camundongos será obtido a partir de dados da literatura. De acordo com Dutra et al 2021 (<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106221>) conduzido com 7 animais por grupo (camundongos *Mus musculus*, machos da raça Swiss com peso médio entre 25-30 g), foram observados valores médios da atividade da MPO no cólon de animais do Grupo Salina de **13,79 ± 2,04** UMPO/mg de tecido, enquanto o grupo que recebeu somente o Ácido Acético foram encontrados valores de **38,40 ± 3,90** UMPO/mg de tecido. Como não há dados prévios para os valores de MPO no cólon de animais submetidos a colite por ácido acético e submetidos a tratamento com PLPp é importante que seja definido os valores médios esperados para os grupos que forem tratados nas diferentes concentrações da fração. Desta forma, esperamos que os valores médios de MPO no cólon de animais tratados com ácido acético e PLPp nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/kg sejam **23,59** UMPO/mg de tecido, **10,20** UMPO/mg de tecido e **3,00** UMPO/mg de tecido, respectivamente, propondo que a atividade de inibição aumente com o aumento da concentração de PLPp.

3) Desvio padrão comum entre os grupos experimentais:

Aqui deve ser obtido o desvio padrão médio ou representativo para a variável a ser avaliada, como, por exemplo valores obtidos de Grupo Controle Salina. Deve ser utilizados dados prévios do proponente ou dados da literatura. Para o exemplo em questão, utilizaremos os dados publicados por Dutra et al. (2021) citado anteriormente. Os valores médios da atividade da MPO no cólon de animais do Grupo Salina foi de 13,79 ± 2,04 UMPO/mg de tecido. Segundo os autores, os valores MPO são expressos como Média ± Erro Padrão da Média. Dado este valor, para obtenção do Desvio padrão, utilizamos a seguinte fórmula, que fornece valores de o Desvio padrão (DP) do parâmetro analisado a partir do Erro Padrão da Média (EP):

$$EP = DP/\sqrt{n}$$

Onde: EP= Erro padrão da média; DP = Desvio padrão; \sqrt{n} = raiz quadrada do “n” representa o número de animais por grupo utilizado. Para o artigo em questão (Dutra, et al., 2014), EP = 2,06 e n = 7. Substituindo os valores na formula, temos: $2,06 = DP / \sqrt{7}$; DP = 2,06 x 2,645 = 5,45. Desta forma, assumiremos que o Desvio Padrão comum dos níveis de MPO no cólon entre os grupos é de **5,45**.

A obtenção destes valores é uma etapa importante porque a partir destas informações será possível calcular a magnitude (tamanho) do efeito (*Effect size*), valor que permite avaliar a dimensão ou o tamanho do efeito entre os grupos. Somente depois da obtenção deste valor conseguiremos calcular o número amostral ideal para a investigação de interesse. No programa G*Power, devemos seguir o seguinte caminho:

Na tela inicial do software devemos escolher o teste adequado a pesquisa desenvolvida. Como pretendemos avaliar as diferenças nos níveis de MPO no cólon entre mais de dois grupos, devemos utilizar



Análise de Variância (ANOVA) como técnica estatística, desta forma iremos selecionar a opção “*F tests*” localizada abaixo do item “*Test family*”, conforme setas vermelhas na imagem abaixo (Figura 1).

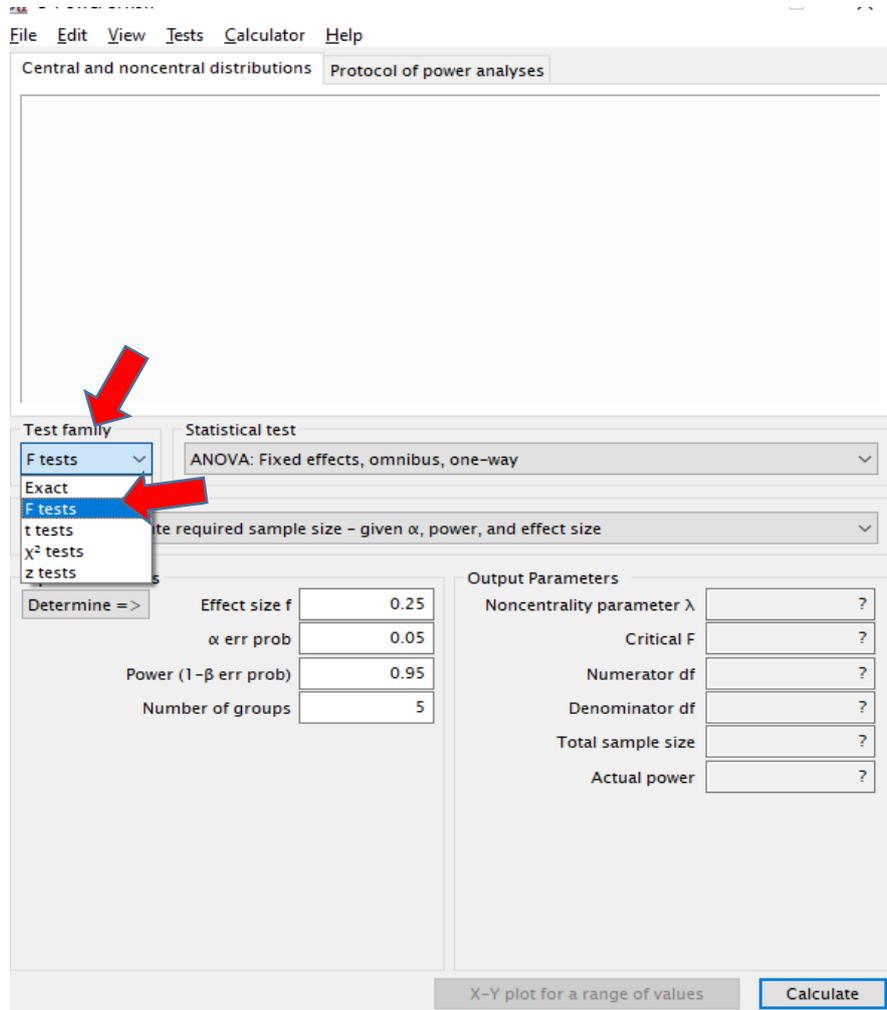


Figura 1.

Em seguida, devemos escolher o tipo de ANOVA adequado ao estudo. Como iremos avaliar o efeito de diferentes tratamentos (1: Controle Salina; 2: Controle ácido acético; 3: Tratamento A PLPp 10 mg/kg; 4: Tratamento B PLPp 20 mg/kg; 5 Tratamento C PLPp 40mg/kg) nos níveis de MPO no cólon de animais, devemos utilizar One-Way ANOVA para verificar se os tratamentos possuem efeitos diferentes nos níveis da variável investigada. Desta forma, devemos selecionar a opção “*ANOVA: fixed effects, omnibus, one-way*” localizada abaixo do item “*Statistical test*”, conforme ilustração na Figura 2, indicados pelas setas vermelhas.

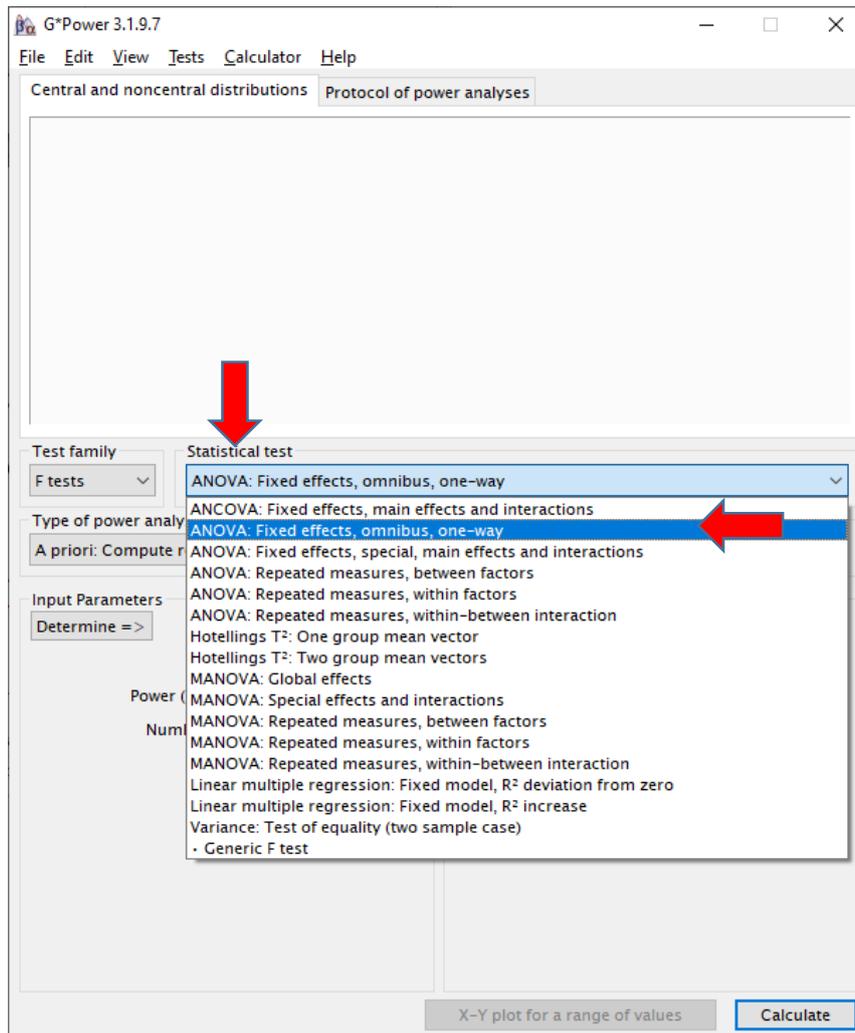


Figura 2.

Depois de selecionado o teste estatístico adequado para nossa investigação, devemos calcular o tamanho do efeito. Este é realizado ao se clicar no botão “*Determine=>*” indicado pela seta vermelha na Figura 3. Em seguida, surgirá uma nova aba ao lado da tela do *software*, com alguns campos a serem preenchidos, indicados no quadro tracejado em vermelho (Figura 3).

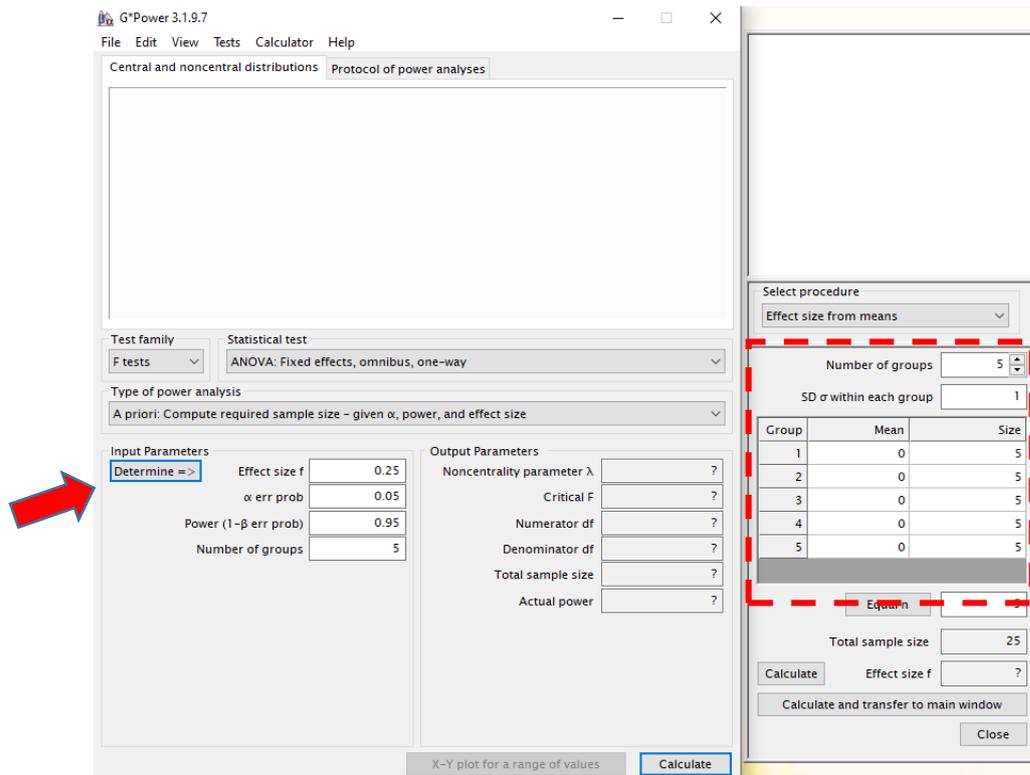


Figura 3.

Os campos que aparecem devem ser preenchidos com aqueles valores obtidos de estudos anteriores ou de dados coletados a partir da literatura, conforme detalhamento a seguir e indicação na Figura 4:

(A) **Number of groups:** deve ser informado o número de tratamentos que será avaliado em seu estudo. No exemplo em questão teremos **5 grupos** (1: Controle Salina; 2: Controle ácido acético; 3: Tratamento A PLPp 10 mg/kg; 4: Tratamento B PLPp 20 mg/kg; 5 Tratamento C PLPp 40mg/kg).

(B) **SD σ within each group:** deve ser informado o desvio padrão comum entre os grupos experimentais. Para o nosso exemplo, de acordo com dados da literatura (Dutra et al., 2021). Os valores médios da atividade da MPO no cólon de animais do grupo controle de $13,79 \pm 2,04$ UMPO/mg de tecido. O Desvio padrão comum calculado entre os grupos experimentais foi de **5,45**.

(C) **Group/Mean/Size:** aqui devemos inserir aquelas médias dos valores da atividade da MPO do cólon de camundongos que obtivemos na literatura e os valores médios esperados para os grupos que forem tratados nas diferentes concentrações de PLPp, amostra alvo de investigação.

OBS.: o programa não aceita valores fracionados, estes devem ser arredondados seguindo as regras de notação científica conforme descrição abaixo:

1: Controle Salina = 13,79 (**14**)



- 2: Controle ácido acético = 38,40 (38)
- 3: Tratamento A PLPp 10 mg/kg = 23,59 (24)
- 4: Tratamento B PLPp 20 mg/kg = 10,20 (10)
- 5: Tratamento C PLPp 40mg/kg = 3,00 (3)

(D) Os campos “*Size*” e “*Equal n*” devem ser preenchidos com o número de animais por grupo utilizado no estudo da literatura que escolhemos como referência ou de projeto anterior do proponente. No exemplo em questão, o número de animais por grupo utilizado no estudo desenvolvido por Dutra et al. (2021) foi igual a 7. Após preenchimento de todos estes campos, devemos clicar no botão “*Calculate and transfer to main window*”, indicado pelas setas vermelhas na Figura 4:

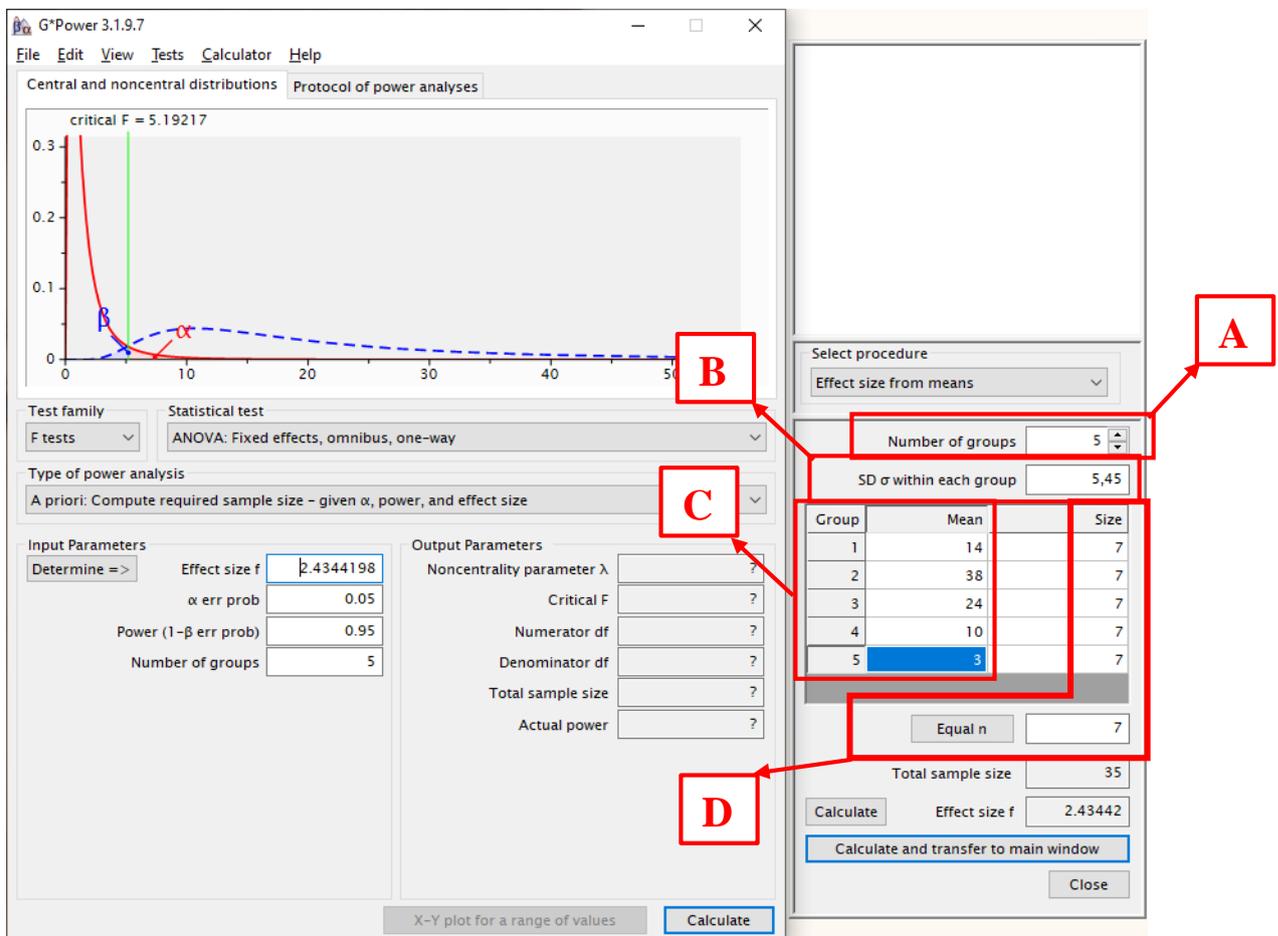


Figura 4.

O valor do tamanho do efeito calculado aparecerá automaticamente ao lado do campo “*Effect size f*”, conforme indicado pela seta vermelha na Figura 5. Em seguida, devemos preencher os demais campos:



(1) **α err prob:** Valor do erro máximo (erro α) ao aplicar o teste estatístico para aceitar ou rejeitar a hipótese nula. Para o presente e para maioria dos estudos é assumido valor de **0,05** (intervalo de confiança de 95%).

(2) **Power (1- β err prob):** Este campo deve ser preenchido com poder do teste estatístico, que é a chance de detectar o efeito de um teste quando de fato houver um efeito. Em geral, o poder estatístico utilizado é de 80%, então iremos preencher este campo com o valor de **0,8**.

(3) **Number of groups:** Este campo é preenchido automaticamente, com o mesmo valor que foi informado na etapa anterior. Caso seu preenchimento não seja automaticamente modificado devemos alterar para o valor correto. Para o nosso exemplo, **5 grupos**.

(4) Após preenchimento dos campos, o valor do número de animais por grupo é obtido clicando sobre o ícone “**Calculate**”.

(5) O tamanho da amostra, ou número de animais por grupo a ser utilizado para estimar a média dos valores de MPO na lesão nos animais com colite induzida por ácido acético e tratados com PLPp, com 95% de confiança, será apresentada ao lado do campo “**Total sample size**”. Para o exemplo apresentado, cada grupo deveria ser composto por pelo menos **10 animais**.



Figura 5.



Apresentando estas informações à CEUA

Após obtenção do número de animais por grupo (n amostral), um texto deve ser elaborado para que este seja apresentado no item “**9.4. Justificativa do número amostral**” presente no Formulário de Solicitação de Uso de Animais a ser entregue à CEUA-UFDPAr. Este texto deve conter elementos que permitam os avaliadores validarem o método utilizado para determinação do valor no “ n amostral” apresentado pelo pesquisador. Apresentamos abaixo um texto para ser utilizado modelo, descrito com base no exemplo apresentado neste documento:

Na presente proposta objetivamos avaliar o efeito protetor de uma fração proteica do látex de *Plumeria pudica* (PLPp) sobre o modelo de colite induzido por ácido acético em **camundongos machos da linhagem Swiss e com peso variando entre 25-30 g**. No estudo, diferentes parâmetros serão avaliados a partir de amostras teciduais do cólon de camundongos, tais como escores macroscópicos e microscópicos de lesão, análise de peso úmido, atividade da mieloperoxidase (MPO), níveis de glutathiona (GSH), concentração de malonaldeído (MDA) e níveis de citocinas, conforme descrição detalhada posterior. Para o presente estudo, **consideramos a atividade da mieloperoxidase (MPO) como variável primária** da lesão induzida por ácido acético e utilizamos este parâmetro para o cálculo do tamanho amostral a ser utilizado nos experimentos.

Animais receberão ácido acético por via intracolônica e serão tratados com diferentes doses de PLPp (10, 20 e 40 mg/kg). Um grupo receberá somente solução Salina e outro somente Ácido Acético. Ao todo teremos **5 grupos**, 1: Controle Salina; 2: Controle ácido acético; 3: Tratamento PLPp 10 mg/kg; 4: Tratamento PLPp 20 mg/kg e 5: Tratamento PLPp 40mg/kg. Uma vez que estudo em questão trata-se de uma investigação inédita, ou seja, a fração PLPp ainda não foi investigada neste modelo experimental, utilizaremos dados publicados por **Dutra et al., (2021)** (<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106221>) para cálculo das médias dos valores da atividade da MPO comumente observada no cólon de **camundongos machos da linhagem Swiss e com peso variando entre 25-30 g**. Este estudo foi conduzido com **7 animais por grupo**, foram observados valores médios da atividade da MPO no cólon de animais do **Grupo Salina de $13,79 \pm 2,04$ UMPO/mg de tecido**, enquanto o grupo que recebeu somente o **Ácido acético** foram encontrados valores de **$38,40 \pm 3,90$ UMPO/mg de tecido**. Como não há dados prévios para os valores de MPO de animais submetidos a colite por ácido acético e submetidos a tratamento com PLPp esperamos que os valores médios de MPO no cólon de animais tratados com ácido acético e PLPp nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/kg sejam **$23,59$ UMPO/mg de tecido, $10,20$ UMPO/mg de tecido e $3,00$ UMPO/mg**



de tecido, respectivamente, propondo que a atividade de inibição aumente com o aumento da concentração de PLPp.

De posse destas informações, utilizamos o software G*Power para cálculo do tamanho amostral a ser adotado em nossa investigação (Faul et al., 2007 e Faul et al., 2009). Como pretendemos avaliar as diferenças nos níveis de MPO no cólon entre mais de dois grupos e pretendemos investigar se os tratamentos possuem efeitos diferentes nos níveis da variável investigada, escolhemos **One-Way ANOVA** como técnica estatística para nossa investigação. Os valores médios da atividade da MPO no cólon de animais obtidos no estudo desenvolvido por Dutra et al. (2021) são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. Desta forma, o **Desvio padrão do Grupo Salina é 5,45**. Assumimos o valor de **0,05 como erro α (5%)** e o **poder do teste de 0,8 (80%)**. Com base nestes dados, o número de animais por grupo a ser utilizado para estimar a média dos valores de MPO na lesão nos animais com colite induzida por ácido acético e tratados com PLPp, com 95% de confiança, é de **10 animais por grupo**.

Notas:

Observem que no texto descritivo é apresentado elementos que devem ser apresentados em destaque e que permitirão o avaliador analisar de modo criterioso as informações apresentadas:

1) *“Na presente proposta objetivamos avaliar o efeito protetor de uma fração proteica do látex de *Plumeria pudica* (PLPp) sobre o modelo de colite induzido por ácido acético em camundongos machos da linhagem Swiss e com peso variando entre 25-30 g. No estudo, diferentes parâmetros serão avaliados a partir de amostras teciduais do cólon de camundongos, tais como escores macroscópicos e microscópicos de lesão, análise de peso úmido, atividade da mieloperoxidase (MPO), níveis de glutathione (GSH), concentração de malonaldeído (MDA) e níveis de citocinas, conforme descrição detalhada posterior. Para o presente estudo, **consideramos a atividade da mieloperoxidase (MPO) como variável primária da lesão induzida por ácido acético e utilizamos este parâmetro para o cálculo do tamanho amostral a ser utilizado nos experimentos...**”*

Comentário: O proponente informa de maneira resumida os diferentes parâmetros que serão avaliados. No caso em questão, por serem várias avaliações distintas, o autor pode apresentar cálculo para cada variável analisada ou definir aquela que julga ser a primária de seu estudo. Lembrando que logo após a apresentação desta justificativa do número de animais a ser utilizado, os responsáveis pelo projeto devem apresentar a metodologia experimental de forma detalhada.



2) “...Animais receberão ácido acético por via intracolônica e serão tratados com diferentes doses de PLPp (10, 20 e 40 mg/kg). Um grupo receberá somente solução salina e outro somente ácido acético. Ao todo teremos **5 grupos**, 1: Controle Salina; 2: Controle ácido acético; 3: Tratamento PLPp 10 mg/kg; 4:

Tratamento PLPp 20 mg/kg e 5 Tratamento PLPp 40mg/kg. Uma vez que estudo em questão trata-se de uma investigação inédita, ou seja, a fração PLPp ainda não foi investigada neste modelo experimental, utilizaremos dados publicados por *Dutra et al., (2021)* (<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106221>) para cálculo das médias dos valores da atividade da MPO comumente observada no cólon de **camundongos machos da linhagem Swiss e com peso variando entre 25-30 g**. Este estudo foi conduzido com **7 animais por grupo**, foram observados valores médios da atividade da MPO no cólon de animais do **Grupo Salina de $13,79 \pm 2,04$ UMPO/mg de tecido**, enquanto o grupo que recebeu somente o **Ácido acético** foram encontrados valores de **$38,40 \pm 3,90$ UMPO/mg de tecido**. Como não há dados prévios para os valores de MPO de animais submetidos a colite por ácido acético e submetidos a tratamento com PLPp esperamos que os valores médios de MPO no cólon de animais tratados com ácido acético e PLPp nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/kg sejam **23,59 UMPO/mg de tecido, 10,20 UMPO/mg de tecido e 3,00 UMPO/mg de tecido**, respectivamente, propondo que a atividade de inibição aumente com o aumento da concentração de PLPp...”

Comentário: neste ponto o pesquisador apresenta algumas informações relevantes, como o número de grupos experimentais ou tratamentos diferentes que irá adotar em sua pesquisa, indica referência bibliográfica que utilizou a mesma estratégia experimental a ser adotada em seu projeto, incluindo a mesma espécie/ linhagem animal, informando o DOI para acesso rápido ao artigo. No caso de o artigo não estar disponível, o mesmo deve ser anexado na íntegra ao formulário. Além disso é descrito os valores de referência para o parâmetro investigado, permitindo confirmação das informações apresentadas. Para aquelas abordagens que ainda não foram investigadas, deve-se estimar os valores esperados. Ao se estimar valores, entende-se que o pesquisador tenha conhecimento prévio do Método Científico e das estratégias de testagem de hipóteses.

3) “...De posse destas informações, utilizamos o software *G*Power* para cálculo do tamanho amostral a ser adotado em nossa investigação (*Faul et al., 2007 e Faul et al., 2009*). Como pretendemos avaliar as diferenças nos níveis de MPO no cólon entre mais de dois grupos e



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO DELTA
DO PARNAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO
USO DE ANIMAIS

*pretendemos investigar se os tratamentos possuem efeitos diferentes nos níveis da variável investigada, escolhemos **One-Way ANOVA** como técnica estatística para nossa investigação. Os valores médios da atividade da MPO no cólon de animais obtidos no estudo desenvolvido por Dutra et al. (2021) são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. Desta forma, o **Desvio padrão do Grupo Salina é 5,45**. Assumimos o valor de **0,05 como erro α (5%)** e o **poder do teste de 0,8 (80%)**. Com base nestes dados, o número de animais por grupo a ser utilizado para estimar a média dos valores de MPO na lesão nos animais com colite induzida por ácido acético e tratados com PLPp, com 95% de confiança, é de **10 animais por grupo.**”*

Comentário: o método estatístico adotado e outras variáveis relevantes para o cálculo do tamanho amostral devem ser informadas para permitindo melhor entendimento de como o número de animais por grupo descrito foi alcançado.

Abaixo, as referências bibliográficas relacionadas ao uso do software G*Power:

Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., & Buchner, A. (2007). G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 39, 175-191.

Faul, F., Erdfelder, E., Buchner, A., & Lang, A.-G. (2009). Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behavior Research Methods*, 41, 1149-1160.