**Formulário CEUA - PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO USO DE ANIMAIS – v1.8**

**Manual de Preenchimento**

**Orientações Gerais**

A submissão de protocolo à CEUA é exigida pela lei 11.794/2008, e o projeto enviado é um documento oficial que gera segurança e respaldo para UFRJ, para o pesquisador e para a comissão. Por exigência legal, os procedimentos em animais devem ser realizados exatamente como foram descritos: caso haja necessidade de modificações, as mesmas deverão ser informadas à CEUA em um adendo ou novo projeto (ver abaixo).

Por conta disso, o momento certo para submeter um projeto é *quando você já tiver definido o que vai fazer em seu experimento*. Caso algumas etapas do projeto não estejam claras ou dependam de etapas anteriores para definição do protocolo, nossa sugestão é que você *não as inclua* e deixe-as para um projeto subsequente.

Caso você deseje incluir procedimentos ou análises cuja realização esteja condicionada a uma etapa anterior do estudo (por exemplo, um experimento em que a dose de um fármaco será determinada por um experimento anterior, ou um teste estatístico que só será realizado caso uma análise anterior demonstre um efeito), é obrigatório descrever de forma clara com base em que parâmetros estas decisões serão tomadas.

Por fim, a CEUA-CCS considera que a avaliação do rigor metodológico do projeto é necessária para garantir que um experimento em animais seja eticamente justificável. Desta forma, exigimos sejam descritos não só os procedimentos a serem realizados, mas também as variáveis em estudo e a forma com que os dados serão analisados. Isto é fundamental para que possamos avaliar a adequação do plano de análise e do número de animais solicitados.

**Adendos**

Caso haja necessidade de pequenas alterações em projetos já aprovados, elas podem ser submetidas como um *adendo* através do Protocolo de Adendo de Projetos Envolvendo Uso de Animais (<https://cdn.sanity.io/files/o40cy30y/decaniaccs_dev/32c3935f1b75b96801cb97fd1ad7c716957c4aad.doc>), sem que o projeto tenha de ser submetido novamente. Apenas modificações pontuais que não alterem os objetivos e desenho experimental do estudo devem ser submetidas como adendos: caso haja uma modificação na estrutura do projeto, ele deve ser submetido novamente.

Exemplos de situações que podem justificar adendos incluem:

- Extensão na duração do projeto.

- Aumento do número de animais (devido a perdas não previstas).

- Mudança na espécie ou linhagem utilizada.

- Mudança no biotério de procedência ou local de experimentação.

- Mudanças em procedimentos experimentais específicos que não impliquem em alteração dos objetivos do projeto.

- Mudança no método de análise.

- Mudança no método de eutanásia.

- Inclusão/exclusão de experimentadores.

**Campos do formulário**

Esta seção visa esclarecer o que se espera que seja preenchido em cada um dos campos do formulário da CEUA, de forma a evitar pendências que atrasem a tramitação do projeto.

1. **Docente/Pesquisador Responsável (com vínculo permanente na UFRJ)**

O pesquisador deve informar seu nome completo, e-mail institucional, o instituto da UFRJ a que está vinculado e o tipo de vínculo. Somente pesquisadores com vínculo permanente com a UFRJ podem submeter projetos à CEUA. Pesquisadores externos que queiram desenvolver projetos nas instalações da universidade podem submeter um projeto somente com uma carta de anuência do responsável pelo laboratório da UFRJ em que o projeto vai ser desenvolvido.

**2) Projeto**

O pesquisador deve incluir o título e duração do projeto, e indicar se ele é parte de projeto acadêmico de iniciação científica, mestrado, doutorado ou pós-doutorado.

**3) Objetivos**

O pesquisador deve indicar os objetivos geral e específicos do projeto. O objetivo geral não deve ter mais do que duas ou três linhas de extensão.

Os objetivos específicos devem dizer respeito *aos experimentos incluídos* no projeto enviado a CEUA (ou seja, aos procedimentos que envolvam animais). Não se deve listar objetivos que façam parte de um projeto maior e não serão abordados nestes experimentos.

Caso sejam utilizadas abreviações, favor definir o significado destas.

**4) Resumo em linguagem não científica**

O pesquisador deve explicar o objetivo geral do projeto para um público leigo em até 200 palavras. É importante não usar terminologia específica a um determinado campo de pesquisa que não seja compreendida por um indivíduo sem formação na área, a não ser que o significado dos termos técnicos seja devidamente esclarecido em linguagem cotidiana.

**5) Importância e justificativa.**

Esta seção deve informar à CEUA a base teórica do projeto, explicitando sua importância para o avanço do conhecimento em sua área de pesquisa, bem como suas potenciais implicações para a sociedade, se houver. O pesquisador deve deixar claro o racional teórico por trás das decisões tanto do *modelo a ser utilizado* – especialmente se a intenção for modelar uma condição de saúde humana – como das *intervenções a serem testadas*, fornecendo referências que embasem ambas as discussões. A seção pode ser utilizada também para introduzir conceitos que sejam importantes para a compreensão dos experimentos a serem descritos mais tarde.

**6) Modelo Animal**

A justificativa da escolha do modelo animal deve se basear em referências que embasem sua adequação ao tipo de estudo a ser realizado. Caso a intenção seja mimetizar uma doença ou condição humana, devem ser incluídas evidências da validade do modelo para este fim. Estas podem incluir diversas dimensões, incluindo:

(a) *Validade de face*: até que ponto as alterações geradas pelo modelo se assemelham às alterações observadas em pacientes.

(b) *Validade de construto*: até que ponto a forma de indução do modelo assemelha-se à fisiopatologia da doença em seres humanos.

(c) *Validade preditiva*: até que ponto informações sobre tratamento obtidas com o modelo (por exemplo, resposta a um determinado fármaco) são preditivas do que é observado com o mesmo tratamento em seres humanos.

Para mais informações sobre diferentes tipos de validade, ver <https://doi.org/10.1007/s00335-019-09798-0>.

Seguindo recomendações internacionais, a CEUA-UFRJ recomenda o uso de animais de ambos os sexos sempre que possível. Caso sejam utilizados animais de um sexo apenas, isso deve ser devidamente justificado pelos pesquisadores. Cabe notar que a crença de que animais fêmeas apresentam variabilidade maior de resultados por conta de fatores hormonais não possui base empírica na maior parte dos modelos animais em que isto foi estudado. Para uma revisão do assunto, ver <https://doi.org/10.1186/s13293-016-0087-5>.

Para ler recomendações de órgãos internacionais a respeito, ver:

- <https://orwh.od.nih.gov/sites/orwh/files/docs/NOT-OD-15-102%20Guidance.pdf>

- <https://www.ukri.org/news/use-of-both-sexes-to-be-default-in-laboratory-experimental-design/>

**7) Animal silvestre**

Esta seção deve indicar se os animais a serem utilizados são silvestres (e.g. capturados na natureza) ou não (e.g. criados em laboratório ou cativeiro). O número do protocolo SISBio é uma autorização obrigatória vinculada ao ICMBio para utilização de animais silvestres. A autorização pode ser obtida em <https://www.icmbio.gov.br/ran/o-que-fazemos/sisbio.html>, onde podem ser feitas as seguintes solicitações:

- Autorizações para atividades com finalidade científica;

- Autorizações para atividades com finalidade didática (no âmbito do ensino superior);

- Licença Permanente;

- Registro Voluntário para coleta e transporte de material botânico, fúngico e microbiológico.de utilização de animais silvestres na pesquisa, ligada ao Ibama.

Caso sejam utilizados animais silvestres, uma cópia da autorização de uso pelo SISBio deve ser anexada ao projeto na submissão.

**8) Animal geneticamente modificado**

Este item serve para informar o uso de quaisquer animais com modificações genéticas, sejam estas realizadas previamente na linhagem aos quais os animais pertencem (e.g. linhagens de camundongos *knockout*), seja nos próprios animais que serão usados no projeto (e.g. manipulação genética com vetor viral).

Caso haja algum animal geneticamente modificado incluído em qualquer etapa do projeto, deve ser informado o número do certificado de qualidade em biossegurança (CQB) obtido junto à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Mais informações em

<http://ctnbio.mctic.gov.br/orientacoes/-/asset_publisher/6gw8aM5RVeFK/content/perguntas-frequentes>

Também devem ser informadas as seguintes informações:

***a) Tipo de modificação***

Este item deve incluir qual gene foi modificado, qual a técnica utilizada para a modificação, e se houve inserção de material genético proveniente de organismo com classificação de nível de biossegurança II, III ou IV.

***b) Genótipo controle***

Nesta seção, deve ser informado o controle que será utilizado para avaliar o efeito da modificação genética. Espera-se que este seja um animal com mesmo fundo genético, porém sem a modificação genética (*wild-type*). Para evitar vieses no estudo, é fundamental que os animais geneticamente modificados e os controles sejam provenientes do mesmo biotério de origem, e idealmente das mesmas ninhadas.

**9a) Procedência dos animais**

Caso os animais provenham de um dos biotérios de criação da UFRJ, indique o biotério (Biotérios de Criação de Camundongos, Biotério de Criação de Ratos ou Laboratório de Animais Transgênicos.

Caso eles sejam produzidos em outro biotério da UFRJ (e.g. no próprio biotério de experimentação), indicar o nome do biotério, o nome do coordenador do biotério e a sua localização (centro, bloco e sala).

Caso eles sejam produzidos em um biotério externo, indicar o nome, instituição, endereço e CNPJ.

Também solicitamos informações sobre a condição sanitária dos animais utilizados na pesquisa, dado que a presença de micro-organismos é uma condição que pode interferir nos resultados experimentais. A certificação sanitária não é obrigatória, e cabe ao pesquisador definir que padrão de contaminação é aceitável para os fins do estudo.

**9b) Alojamento durante o período do experimento**

Ao indicar a localização do biotério de experimentação, incluir o nome do biotério, centro, bloco e sala.

No item (b), em relação às gaiolas, favor descrever se as mesmas se encontram em um rack individualmente ventilado (i.e. em microisoladores), em uma estante ventilada, ou abertas ao ar ambiente do biotério. Caso seja utilizado mais de um tipo de gaiola durante o período do experimento, favor indicar todos os tipos que serão usados.

Nos itens (c) e (d), favor informar as dimensões das gaiolas e o número de animais presentes em cada gaiola. Caso este número possa variar, favor incluir o número mínimo e máximo de animais por gaiola durante, considerando todo o período do experimento. O número de animais por gaiola deve ser compatível com a área mínima por animal para a espécie definida pela RN 15 do CONCEA (https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/resolucao-normativa-no-15-de-16-de-dezembro-de-2013.pdf/view)

Na seção (e), informar o número de horas em ciclo claro e escuro, respectivamente.

Na seção (f), sobre alimentação, indicar a marca de ração que é utilizada no biotério em que os animais serão alojados durante o experimento, ou a composição da dieta específica que será utilizada no estudo em questão (se houver).

Caso haja durante o experimento algum período em que os animais devem receber algum tratamento específico e temporário (p. ex.: jejum alimentar ou hídrico, dieta especial, suspensão de troca de caixa) ou algum tratamento que exija algum cuidado específico para o manuseio (ex: infecção experimental, administração de compostos radioativos) a utilização de etiquetas específicas detalhando o procedimento, com data de início e fim, é fundamental para a comunicação com os demais pesquisadores que usam o biotério e com os bioteristas. Isto evita acidentes que podem prejudicar a equipe do biotério e/ou os próprios animais (ex: manutenção de jejum por tempo mais prolongado que o indicado).

**10) Laboratório(s) nos quais serão desenvolvidos os procedimentos com os animais e/ou amostras**

Na UFRJ, é usual que os experimentos com animais sejam realizados nos laboratórios, e não em espaços de experimentação dentro dos biotérios. Por isso, solicitamos a informação (baseada na estrutura física e equipamentos de proteção individual e coletiva disponíveis) sobre o nível de biossegurança tanto do biotério quanto do laboratório em que os experimentos serão realizados. Isto inclui tanto os experimentos realizados com os animais como aqueles realizados com amostras provenientes deles (para os quais o mesmo nível de biossegurança se aplica).

O nível de biossegurança de ambos os espaços deve ser compatível com o do projeto. Para mais informações sobre a legislação de biossegurança e a definição dos níveis, acesse <http://ctnbio.mctic.gov.br/resolucoes-normativas/-/asset_publisher/OgW431Rs9dQ6/content/resolucao-n%C2%BA-18-de-23-de-marco-de-2018>.

Caso o experimento seja realizado em uma área específica de experimentação dentro da área do biotério (e o animal não vá sair da área do biotério durante todo o período do experimento), considerar o nível de biossegurança do biotério para preencher esta informação.

A alternativa “não há biotério” se aplica aos estudos realizados em campo ou em animais domésticos, em que não há um alojamento controlado para manutenção dos animais.

Caso haja transporte entre espaços não contíguos (ou seja, caso os animais tenham que atravessar espaço público da UFRJ durante o projeto), favor detalhar como o transporte será realizado, e as medidas que serão tomadas para evitar o escape dos animais e minimizar o estresse e exposição dos mesmos durante o transporte.

**11) Delineamento experimental**

Esta seção se destina a descrever *cada um* dos experimentos a serem realizados no projeto separadamente. A CEUA entende por “experimento” um grupo de procedimentos realizados em um mesmo grupo de animais, ou em grupos que serão diretamente comparados entre si. Com isso, um projeto pode conter apenas um ou diversos experimentos. A seção de delineamento experimental se propõe a descrever o desenho geral de cada experimento, sem entrar em detalhes dos procedimentos.

No caso do projeto conter mais de um experimento – uma situação bastante comum –, é necessário preencher todos os campos do item 11 *para cada um deles separadamente* (copie e cole os campos quantas vezes for necessário). Para facilitar a conexão com outras seções e a comunicação com a CEUA, recomendamos que o pesquisador identifique cada experimento com um número e uma descrição sumária (e.g. “Experimento 1 – Influência da droga X na pressão arterial).

É importante ressaltar que *todos* os experimentos envolvendo animais devem ser descritos individualmente. Isto inclui tanto experimentos *in vivo* em que as intervenções em estudo ocorrem nos animais quanto experimentos *ex vivo* em que elas ocorrem em amostras ou culturas primárias derivadas deles.

**a) Dependência de experimentos prévios:**

Um experimento é considerado *independente* quando está planejado para ocorrer independentemente de outros resultados no projeto. Ele é *dependente de outro experimento* quando sua realização está condicionada a resultados obtidos neste outro.

Notar que, caso haja experimentos cuja realização é dependente de outros resultados, o número de animais previsto para este experimento poderá ser utilizado ou não (já que o experimento pode ou não ser realizado, dependendo do resultado do primeiro). Neste caso, a CEUA autorizará o número máximo de animais passível de ser utilizado no projeto (que deve ser incluído na seção 12). Dito isso, esse número só poderá ser usado caso todos os experimentos de fato aconteçam.

Para que a CEUA possa responsabilizar o pesquisador pelo uso do número correto de animais neste caso, é fundamental que o critério para a realização (ou não) de experimentos que dependem de outros experimentos seja descrito de forma clara e objetiva.

**b) Número de animais utilizados no experimento:**

Descrever aqui o número total de animais que será utilizado neste experimento. Este número deve ser compatível com o número de grupos e animais/unidades experimentais por grupo descrito no item (c). A soma dos números de todos os experimentos deve corresponder ao total de animais solicitado (item 12 do formulário).

**c) Grupos experimentais:**

Nesta seção, o pesquisador deve deixar claro:

- Quais são os grupos experimentais do experimento, e o que os diferencia entre si.

- Quantos animais/unidades experimentais serão usados em cada grupo. Caso a unidade experimental não seja o animal, e sim culturas ou amostras derivadas dele, favor descrever tanto o número de culturas/amostras quanto o número de animais necessário para obtê-las (e.g. 5 culturas primárias por grupo, obtidas a partir de um total de 15 camundongos por grupo)

Um grupo experimental é um grupo que receberá um tipo de intervenção/tratamento no experimento – seja ele um tratamento ativo ou um controle, como uma injeção de veículo. Um experimento normalmente possui dois ou mais grupos experimentais que são comparados (e.g. controle vs. uma ou mais intervenções). Dito isso, pode haver experimentos com um único grupo experimental, que visem estudar ou estimar algo nesse grupo em particular.

Grupos experimentais normalmente diferem em uma ou mais *variáveis independentes*, cujas categorias definem os grupos. Por exemplo, em um experimento que compara uma droga com um grupo que recebe veículo, o tratamento é a variável independente em estudo. Caso haja animais de dois genótipos diferentes recebendo cada um dos tratamentos, o genótipo representa uma segunda variável independente.

É importante que os grupos experimentais difiram *somente na(s) variável(is) em estudo*, e sejam comparáveis em todos os demais aspectos, para que o experimento seja informativo sobre o efeito desta variável. Por exemplo, os animais do grupo experimental e do grupo controle devem ser provenientes do(s) mesmo(s) biotério(s), receber o mesmo manejo, ser do(s) mesmo(s) sexo(s), e devem ser submetidos ao experimento durante o mesmo período.

**d) Unidade experimental:**

Esta é a unidade onde o tratamento/intervenção do experimento será aplicado(a) independentemente, que normalmente é a unidade sobre a qual a análise deve ser realizada.

Em experimentos *in vivo*, esta unidade costuma ser o animal individual (caso a administração do tratamento seja feita nele). Dito isso, ela pode eventualmente ser a gaiola (caso o tratamento seja oferecido na dieta ou na água), a ninhada (caso o tratamento seja realizado em ratas grávidas) ou outra unidade. Já em experimentos *ex vivo* que tratam amostras ou culturas derivadas de um animal, a unidade experimental pode ser o poço de cultura, o tubo de ensaio, ou seja qual for a unidade em que o tratamento é aplicado.

É importante notar que a análise *deve acompanhar a unidade experimental*. Com isso, o “n” amostral utilizado em um experimento em que ratas grávidas são tratadas deve ser de mães, e não de filhotes. Da mesma forma, um experimento em que o animal é tratado, a unidade experimental mínima é o animal. Caso vários filhotes sejam utilizados no primeiro caso, ou várias amostras sejam obtidas do mesmo animal no segundo, estas medidas constituem réplicas e não unidades experimentais de fato. Não considerar isso na análise leva a vieses de não-independência que tornam a análise não informativa sobre a pergunta experimental, numa situação conhecida como *pseudoreplicação*. Para mais sobre o tema, ver <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005282>.

Caso um animal dê origem a várias unidades experimentais, favor descrever também como elas serão distribuídas entre os grupos (e.g. serão obtidos quatro anéis de aorta de cada animal, que serão submetidos a diferentes tratamentos). Cabe notar que neste caso, as unidades experimentais derivadas do animal devem ser alocadas em grupos diferentes para serem utilizadas como unidade de análise. Caso diversas amostras de um mesmo animal sejam incluídas no mesmo grupo experimental, isto também gera um problema de não-independência entre as amostras, que requer que a análise seja feita a nível dos animais para evitar vieses.

**e) Alocação das unidades experimentais:**

Nesta seção, o pesquisador deve descrever a forma com que as unidades experimentais serão alocadas nos diferentes grupos experimentais. Idealmente, esta alocação deve ser *aleatória* (também dita *randomizada*), com um procedimento aleatório decidindo em que grupo cada unidade será alocada.

A alocação aleatória deve ser realizada a nível da unidade experimental que recebe o tratamento. Se o tratamento é aplicado em animais individuais, por exemplo, cada animal – e não cada gaiola – deve ser aleatorizado independentemente.

Não é infrequente que um pesquisador queira garantir um certo grau de similaridade entre os grupos – por exemplo, tentando manter animais de peso comparável ou dos mesmos sexos em ambos os grupos. Tais situações não são incompatíveis com a alocação aleatória: procedimentos como a aleatorização *blocada* ou *estratificada* podem aleatorizar animais individuais dentro de cada sexo ou cada faixa de peso, por exemplo, garantindo que os grupos gerados sejam comparáveis nesta variável. Para mais informações, ver <https://arriveguidelines.org/arrive-guidelines/randomisation>.

Caso a alocação seja aleatória, o pesquisador deve descrever o método de randomização (p. ex. um gerador de números randômicos, uma moeda, uma planilha aleatoriamente gerada).

Em uma minoria de situações, a alocação aleatória pode não ser possível: em um experimento com camundongos transgênicos, por exemplo, a alocação ocorre no momento da concepção do animal e independe do pesquisador. Nestes casos, é importante tentar garantir que nenhuma outra variável difira sistematicamente entre os grupos – por exemplo, utilizando animais controle e *knockout* vindos das mesmas ninhadas.

A CEUA considera a alocação aleatória obrigatória, salvo em situações que a impeçam. Nestes casos, favor utilizar o espaço fornecido para justificar a ausência de aleatorização e explicar o método de alocação utilizado.

**f) Linha do tempo:**

Neste item, o pesquisador deve detalhar a sequência cronológica de procedimentos e medidas a serem realizados em cada grupo. O pesquisador pode utilizar uma descrição textual, mas a utilização de um diagrama visual, como uma linha do tempo, é recomendada, desde que este diagrama seja claro e autoexplicativo.

Novamente, não é necessário fornecer aqui os detalhes dos procedimentos, que serão descritos de forma completa nos itens 14 e 15. A função desta seção é apenas possibilitar ao avaliador do projeto visualizar a sequência temporal do experimento e a relação entre os procedimentos.

**g) Cegamento:**

O cegamento se refere ao fato da pessoa que realiza um experimento ou análise não ter conhecimento do grupo de origem de cada animal ou unidade experimental. Ele pode ocorrer em diferentes etapas: durante a condução do experimento (e.g. quando os animais são tratados com uma droga ou um veículo), durante a avaliação dos desfechos do experimento (e.g. quando os animais são observados em um teste comportamental ou amostras são analisadas no microscópio) e durante a análise dos dados (e.g. quando a análise estatística é realizada). Para mais informações, ver <https://arriveguidelines.org/arrive-guidelines/blinding>.

Em todas estas etapas, o cegamento pode ser realizado de forma simples fazendo com que um pesquisador independente substitua por um código a identificação dos tratamentos a serem usados, dos animais ou amostras em análise, ou dos dados em uma planilha. A CEUA recomenda o cegamento em todos os níveis como forma de controle de viés, e considera-o obrigatório no momento de avaliação dos desfechos, salvo em situações em que esta seja totalmente automatizada, sem nenhuma etapa dependente do operador.

Algumas características do modelo podem fazer com que o cegamento não seja possível em algumas etapas (por exemplo, uma comparação entre cepas animais com fenótipo facilmente reconhecível). Ainda assim, ele costuma ser possível em pelo menos alguma das etapas. Com isso, solicitamos que o pesquisador marque em quais etapas o cegamento será realizado (intervenção/tratamento, avaliação dos desfechos e análise de dados), e forneça uma justificativa adequada caso o mesmo não seja realizado em alguma delas. Cabe ressaltar que a CEUA não considera que falta de pessoal para realizar o procedimento de cegamento seja uma justificativa adequada.

**h) Variáveis dependentes:**

Neste item, o pesquisador deve especificar todas as *variáveis dependentes* (ou *desfechos*) que serão medidas no estudo. Elas devem ser descritas de forma específica e objetiva, especificando como e em que momento serão medidas. Nesse sentido, pede-se que seja descrito exatamente o que será medido (e.g. “pressão ventricular direita” ou “concentração sérica de IL-1, IL-6 e IL-10” ao invés de utilizar termos genéricos (e.g. “parâmetros hemodinâmicos” ou “citocinas inflamatórias”).

As variáveis devem ser descritas mesmo que estas sejam medidas em experimentos *ex vivo* em amostras derivadas dos animais, já que o tipo e quantidade de variáveis têm impacto sobre a forma de análise estatística e o tamanho amostral.

Em experimentos com amostras *ex vivo*, existem situações em que, após as medidas previstas no projeto, amostras remanescentes serão armazenadas para eventuais medidas de outras variáveis no futuro. Caso este seja o caso, as medidas adicionais podem ser informadas posteriormente à CEUA através de um adendo.

**i) Plano de análise estatística:**

Experimentos com desfechos quantitativos normalmente usam alguma forma de análise estatística para determinar até que ponto os resultados obtidos na amostra podem ser extrapolados para uma população maior.

Isto é realizado mais comumente através de testes estatísticos frequentistas que fornecem um valor de p, ainda que existam diversas outras alternativas, como estimativas baseadas em tamanhos de efeito e intervalo de confiança e análises bayesianas.

Dado que o plano de análise estatística costuma determinar o número de animais necessário em um experimento, é fundamental para a CEUA que ele esteja descrito de forma clara. Também é importante que a forma de análise já esteja prevista no projeto para evitar vieses de análise e práticas como o *p-hacking* (<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0956797611417632>), que comprometem a validade do teste estatístico como evidência confirmatória de um fenômeno.

O grau de detalhamento mínimo exigido pela CEUA neste item inclui:

(a) as análises previstas para este experimento (que podem ser várias, caso haja uma quantidade grande de variáveis), incluindo os grupos a serem comparados e/ou as variáveis a serem correlacionadas.

(b) o teste ou tipo de modelo estatístico a ser usado em cada uma dessas análises, que deve estar em conformidade com o desenho experimental e as variáveis independentes e dependentes em estudo (descritos nos itens (b) e (d) acima).

Caso sua análise seja completamente exploratória e não haja um plano de análise pré-estabelecido, você pode explicitar isso nessa seção, lembrando que nesse caso os dados *não* devem ser usados como evidência confirmatória de uma hipótese, e idealmente devem ser seguidos por experimentos confirmatórios.

Algumas observações:

(i) Caso haja múltiplos grupos sendo comparados entre si, favor deixar claro quais comparações efetivamente serão realizadas (lembrando que um maior número de comparações levará a uma taxa maior de falsos positivos, ou a um menor poder estatístico caso um ajuste para múltiplas comparações seja realizado).

(ii) Caso haja múltiplas variáveis independentes no estudo, favor deixar claro se as mesmas serão analisadas em um mesmo teste/modelo (i.e. uma ANOVA de múltiplas vias ou um modelo multivariado) ou em análises separadas.

(iii) Caso um teste/modelo que analise diversas variáveis ao mesmo tempo seja usado (e.g. ANOVA de duas vias ou regressão multivariada), deixe claro quais serão estas variáveis.

(iv) Caso o experimento envolva um grande número de variáveis ou grupos experimentais, especifique se alguma forma de controle de múltiplas comparações será usada (e o número de comparações/grupos ao qual ela será aplicada).

(v) Caso o teste/modelo estatístico a ser usado dependa de algum atributo dos dados a serem coletados (e.g. teste de normalidade da amostra para determinação de uso de teste paramétrico ou não-paramétrico, ainda que a CEUA *não* recomende esta prática, vide <https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/using_a_normality_test_to_choo.htm>), favor deixar claro como esta decisão será tomada.

**i.1) Critérios de inclusão/exclusão:**

Caso algum critério sistemático seja utilizado para decidir quais animais ou dados serão utilizados na análise (e.g. uso de ganho de peso como um critério para inclusão de animais na análise em um experimento de dieta, exclusão de animais com baixa atividade em um teste comportamental, exclusão de *outliers* em um conjunto de dados por conta de sua variação em relação à média), por favor a descreva nesta seção.

A CEUA ressalta que quaisquer critérios para exclusão de animais ou dados da análise devem ser estabelecidos *a priori* e seguidos na condução do experimento. Exclusões feitas *ad hoc* com base nos resultados geralmente incutem vieses inaceitáveis na análise, e devem ser sempre descritas explicitamente ao relatar os resultados de um estudo (conforme <https://arriveguidelines.org/arrive-guidelines/inclusion-and-exclusion-criteria>) .

**j) Cálculo de tamanho amostral:**

Experimentos que utilizem alguma forma de análise estatística dos dados normalmente requerem um cálculo de tamanho amostral para estabelecer o número de animais suficiente para chegar a conclusões robustas. O presente manual não pretende ensinar pesquisadores a fazer este tipo de cálculo: para isso, utilizar o documento de orientações disponível em <https://cdn.sanity.io/files/o40cy30y/decaniaccs_dev/95aa75e90ab4cdcd2f76c6733c464f97b887b95d.pdf>. Aqui, nos limitaremos a explicar o que deve ser informado em cada um dos subitens desta seção.

O primeiro (j.1) diz respeito à variável dependente utilizada como base do cálculo (caso existam várias em estudo). Normalmente, esta corresponde ao desfecho principal do estudo. Também é possível calcular o tamanho amostral necessário para a análise de cada variável e utilizar o maior número encontrado.

O item j.2 requer que o pesquisador mencione como/onde realizou o cálculo (e.g. o código, software, site, ou método utilizado), e idealmente inclua um print do resultado, de forma a permitir a checagem do mesmo.

A seção seguinte (j.3) diz respeito aos parâmetros utilizados. Todos os experimentos que realizam o cálculo de tamanho amostral com base numa análise de poder estatístico (o caso mais comum quando são utilizados testes frequentistas) devem mencionar o *poder estatístico* e *limiar de significância* desejados na realização do cálculo (j.3.1). Estes parâmetros controlam as taxas de falsos-negativos e falsos-positivos do estudo, respectivamente, e são definidos pelo pesquisador. Diversos valores podem ser utilizados: dito isso, consideramos que valores de poder abaixo de 80% (ou 0,8) ou limiares de significância acima de 5% (ou 0,05) raramente são justificados. Valores mais estritos do que estes podem ser usados, à discrição do pesquisador.

Os demais parâmetros necessários para o cálculo (j.3.2) variam dependendo da variável dependente em estudo. Com isso, o pesquisador deve preencher apenas a versão desta seção que corresponda ao caso aplicável a seu experimento.

Em um estudo comparando médias de uma variável quantitativa entre dois grupos (j.3.2.1; talvez a situação mais comum em pesquisa experimental), é necessário informar o *tamanho do efeito que se pretende detectar*. Este pode ser informado como uma diferença absoluta ou relativa entre médias acompanhada do desvio-padrão, ou como um tamanho de efeito estandardizado (e.g. Cohen’s d). Caso um experimento compare uma variável qualitativa (j.3.2.2), devem ser informadas as *proporções esperadas em cada um dos grupos*. Outros tipos de testes estatísticos comportam diferentes formas de estimar o tamanho amostral, baseados em diferentes parâmetros. Nestes casos (j.3.2.3), favor informar os parâmetros utilizados no subitem “*Para outros casos, descreva abaixo os parâmetros utilizados*”. Isto pode incluir outros tipos de tamanho de efeito para outras análises de poder estatístico (*r* ou β para análises de correlação e regressão*, f* ou η2 para ANOVAs, etc.) ou intervalos de confiança desejados para experimentos que visem estimar o valor de uma variável.

É importante ressaltar que os parâmetros utilizados devem possuir algum embasamento – seja em trabalhos da literatura, em trabalhos anteriores do próprio grupo, seja na intuição biológica dos autores sobre o que considera um efeito relevante. Desta forma, estimulamos que o pesquisador inclua justificativas e/ou referências para os parâmetros escolhidos. A CEUA se reserva o direito de questionar estimativas de tamanho de efeito e/ou variabilidade que pareçam implausíveis.

Por fim, entendemos que existem situações em que a realização de um cálculo de tamanho amostral não é possível – como em estudos exploratórios em que não haja uma boa estimativa da variabilidade esperada entre as unidades experimentais. Nestes casos, sugerimos a realização de um estudo piloto antes do planejamento do experimento definitivo. Tais situações representam exceções, e podem ser justificadas no último item (j.4).

**12) Número de animais**

Neste item, deve ser incluído o número máximo de animais a ser utilizado no experimento, que deve estar de acordo com os números de animais especificados para cada experimento (bem como com os cálculos de tamanho amostral realizados. Solicitamos o número “máximo” e não “total”, pois no caso de experimentos que só serão realizados conforme os resultados de outros experimentos (ver item 11a).

Caso haja animais de diferentes sexos, linhagens, espécies ou biotérios de origem, deve ser informado o número de animais de cada um dos diferentes grupos, pois esta informação deve constar na carta de aprovação.

Caso haja expectativa de perdas experimentais (por exemplo, por mortalidade relacionada a procedimentos, ou por animais que não atendam critérios para inclusão no experimento), os pesquisadores podem solicitar um número de animais de reserva, para além do número informado pelo(s) cálculo(s) amostral(is). Neste caso, favor incluir justificativas para esta expectativa (incluindo referências se possível), bem como as medidas tomadas para tentar minimizar estas perdas. A CEUA analisará as justificativas e poderá aceitar este número de reserva, ou, em casos em que as perdas previstas sejam muito altas, solicitar que formas mais efetivas de refinamento sejam propostas pelo pesquisador.

**13) Características dos procedimentos**

Estes itens devem ser respondidos preenchendo as escalas dicotômicas ou categóricas. Para estas respostas, devem ser considerados todos os experimentos que compõem o estudo. A classificação de invasividade do estudo e todas as demais questões categóricas devem ser respondidas de acordo com o experimento de maior invasividade dentre os que compõem o estudo. Para mais informações sobre as definições de grau de invasividade, acesse a RN55 do CONCEA:

<https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-55-de-5-de-outubro-de-2022.pdf>

Para a classificação categórica de dor e estresse, é recomendado o uso do princípio da analogia. Considerando que os animais possuem um sistema nervoso semelhante ao dos seres humanos, a intensidade da dor para um determinado procedimento em humanos deve ser usada como um guia para a classificação da gravidade do procedimento para os animais. A partir da classificação inicial, deve ser estabelecido um protocolo analgésico ,e constantes reavaliações devem ser realizadas para verificar se o tratamento instituído está adequado, ou se deve ser realizado resgate analgésico ou aplicação de critério de ponto final.

**14) Procedimentos experimentais**

Esta seção se destina ao detalhamento dos procedimentos aos quais os animais serão submetidos. Assim como na seção de desenho experimental, esta seção deve ser preenchida separadamente *para cada procedimento* a que os animais serão submetidos. Para isto, copie e cole os campos quantas vezes for necessário).

Cada um dos procedimentos deve ser descrito em detalhes no item (a), incluindo todos os passos a serem realizados – com exceção de procedimentos cirúrgicos, que serão descritos no item 15. No item (b), devem ser especificados os experimentos do item 11 em que os procedimentos acontecerão. No item (c), o momento do procedimento diz respeito à linha do tempo informada no item 11.

No caso de qualquer procedimento não-cirúrgico que inclua um procedimento doloroso, deverão obrigatoriamente ser tomadas medidas para minimizar dor e estresse durante e após a execução do procedimento, bem como para avaliar o bem-estar do animal durante o mesmo. Estas medidas, realizadas durante o procedimento, devem ser descritas nos itens (d), (e) e (f) (incluindo fármacos anestésicos e analgésicos).

Caso algum material biológico seja coletado durante o procedimento, inclua-o no item (g).

**15) Procedimentos cirúrgicos (terminais ou não terminais).**

Esta seção se dedica ao detalhamento de procedimentos cirúrgicos. Definimos um procedimento cirúrgico como uma intervenção no corpo do animal que envolva corte e sutura Isto vale tanto para experimentos não terminais (nos quais o animal desperta da anestesia) como para procedimentos terminais (sem despertar anestésico).

Assim como no item 14, cada procedimento deve ser descrito separadamente, copiando e colando os campos quantas vezes for necessário. Uma descrição completa do processo cirúrgico, incluindo os diversos passos do mesmo, deve ser fornecida no item (a).

No item (b), devem ser especificados os experimentos do item 11 em que os procedimentos acontecerão. No item (c), o momento do procedimento diz respeito à linha do tempo informada no item 11.

No caso de qualquer procedimento cirúrgico, deverão *obrigatoriamente* ser administrados fármacos anestésicos e analgésicos antes da execução da cirurgia. Os fármacos utilizados durante o procedimento devem ser descritos no item (d), incluindo a dose utilizada e via de administração. Outras medidas para minimizar o desconforto do animal devem ser descritas no item (e).

Antes de iniciar o procedimento, é obrigatório avaliar se o animal está em plano anestésico adequado. Um método usual para a avaliação de plano anestésico em roedores e lagomorfos é através da resposta reflexa motora a um estímulo doloroso (tal como pinçamento de cauda ou de prega interdigital). Ao detectar-se a ausência de resposta motora reflexa (mais facilmente medida que ausência de consciência), sabe-se que a consciência já foi, anteriormente, abolida, e que, com isso, a dor não pode ser percebida. Tanto a estratégia de avaliação como os protocolos de resgate anestésico caso o plano não esteja adequado deve ser descrito no item (f).

No item (g), descreva se haverá coleta de algum material biológico durante a cirurgia.

O item (h) destina-se a diferenciar procedimentos terminais de não-terminais. Em procedimentos terminais, a preocupação central é que o animal seja mantido em plano anestésico adequado durante todo o procedimento, já que isso garante que estarão inconscientes e, portanto, incapazes de experimentar a experiência de dor.

Já em procedimentos com despertar anestésico, além de garantir a manutenção de plano adequado de anestesia, é fundamental o uso de analgésicos que atuem nos diferentes pontos das vias da dor. Esse cuidado deve ser tomado, para que quando o animal recupere a consciência e possa perceber a dor, esta seja mais facilmente controlada. Todos estes detalhes devem ser descritos no item (i).

A analgesia pós-operatória é *obrigatória* em qualquer procedimento cirúrgico com despertar do animal. Considerando as dificuldades na avaliação da dor, a intensidade do trauma deve ser estimada antes do procedimento através da classificação de sua gravidade estimada. A intensidade da dor para um determinado procedimento em humanos pode servir de guia para esta classificação nos animais (princípio da analogia). Ela deve ser um ponto de partida para estimar a dor pós-operatória e definir o protocolo analgésico inicial.

A partir da classificação inicial, deve ser estabelecido também um protocolo de avaliações regulares para verificar se o tratamento instituído está adequado ou se deve ser realizado resgate analgésico ou eutanásia precoce (conforme o item 16). O controle da temperatura corporal também é um fator importante a ser controlado durante e após o procedimento anestésico. Tanto a analgesia inicial como o plano de avaliação devem ser descritos neste item.

**16) Bem-Estar Animal e Ponto Final Humanitário**

Em qualquer projeto de pesquisa envolvendo animais, é responsabilidade do pesquisador garantir que condições mínimas de bem-estar sejam mantidas durante todo o experimento. Com isso, os critérios e frequência de avalição de bem-estar devem estar, obrigatoriamente, detalhados no projeto de pesquisa enviado a CEUA.

A principal forma de “quantificar” a condição de bem-estar é a partir da análise de parâmetros fisiológicos e comportamentais, sendo fundamental conhecer os parâmetros de normalidade para reconhecer alterações compatíveis com ausência de bem-estar. Caso a condição de bem-estar esteja abaixo do aceitável, o animal deve sofrer eutanásia antes do momento previsto pelo desenho experimental original.

Em qualquer estudo, devem ser avaliados parâmetros fisiológicos e comportamentais gerais (padrão de alimentação, perda de peso, locomoção, padrão respiratório...), mas também devem ser incluídos parâmetros específicos relacionados a alterações que podem ocorrer na aplicação deste modelo experimental específico. Os parâmetros avaliados e alterações esperadas devem ser descritos nos itens (a) e (b).

Há estudos de alto potencial de sofrimento para o animal, inclusive com possibilidade de morte ocasionada pela evolução da condição criada no modelo experimental. Nestes casos, os critérios de avaliação de bem-estar devem ter alta frequência (ao menos uma vez ao dia), e critérios de ponto final rigorosos devem ser definidos. Quando for avaliado que o animal não está dentro de uma condição mínima de bem-estar, deve ser realizada a eutanásia precoce. A frequência de avaliação deve ser informado no item (c), e estar de acordo com o grau de invasividade do estudo,.

Para preenchimento do item (d), em estudos muito invasivos, em que o risco de perda de bem-estar do animal é alto, é obrigatória a construção de uma escala de avaliação diária do bem-estar, com um ponto de corte objetivo que indique a eutanásia precoce. Nos casos menos agressivos, a escala é recomendada, mas também é aceita uma descrição simplificada dos parâmetros de bem-estar avaliados e da definição dos critérios de ponto final. Para recomendações sobre a construção de escala de avaliação de bem-estar e ponto de corte para critério de ponto-final, acesse nosso material de orientações em <https://cdn.sanity.io/files/o40cy30y/decaniaccs_dev/829a0451fa64a89ebc81bfaf5f8440eacc76e58d.pdf>.

**17) Eutanásia**

Esta seção se destina à descrição do método de eutanásia e forma de descarte da carcaça.

Os métodos de eutanásia utilizados devem estar entre os descritos pelo anexo das diretrizes de eutanásia do CONCEA como recomendáveis ou aceitos com restrição.

<https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/anexo-da-resolucao-normativa-no-37-de-15-de-fevereiro-de-2018.pdf>

Preferencialmente, devem ser utilizados métodos recomendáveis. Quando for necessário o uso de métodos aceitos com restrição sem anestesia prévia, eles devem ser justificados (incluindo referências bibliográficas que embasem a justificativa, demonstrando a impossibilidade de usar um método recomendável). Caso o animal seja submetido a anestesia geral com verificação de plano anestésico antes da realização de um método aceito com restrição, esta justificativa não é necessária.

O descarte de carcaça do animal deve ser realizado em bolsa específica para material biológico (branca) e esta deve estar devidamente identificada com nome do laboratório, pesquisador responsável, data, tipo de carcaça (com caneta permanente). Estas bolsas identificadas devem ser depositadas nos containers específicos para resíduos de material biológico do CCS. As carcaças devem ser congeladas antes do depósito, e devem ser depositadas no período da manhã, para que sejam recolhidas pela empresa responsável no mesmo dia.

**18. Participantes do projeto:**

Esta seção se destina a informar os responsáveis por todas as atividades envolvendo animais dentro do projeto. De acordo com a RN 49 do CONCEA (<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-concea/mcti-n-49-de-7-de-maio-de-2021-318712950>), todos os envolvidos com animais de experimentação precisarão apresentar comprovação de capacitação na submissão do projeto.

No formulário, devem ser informados o nome, e-mail e função no laboratório de cada um dos envolvidos. Também devem ser descritas as atividades específicas que serão realizadas por esta pessoa, e o curso específico e/ou período de experiência adquirida em manejo de animais de laboratório.