

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP
RELATÓRIO DE CONSULTA

TÍTULO DO PROJETO: “Efeito da vacinação contra febre amarela sobre a taxa de fertilidade em camundongos”

PESQUISADORA: Fernanda Carini da Silva

ORIENTADORA: Professora Doutora Estela Bevilacqua

INSTITUIÇÃO: Instituto de Ciências Biomédicas – USP

FINALIDADE DO PROJETO: Mestrado

PARTICIPANTES DA ENTREVISTA: Fernanda Carini da Silva
Estela Bevilacqua
Lúcia Pereira Barroso
Júlia Maria Pavan Soler
Altino Sheu
Lucélia Song
Regis Chinen

DATA: 15/03/2005

FINALIDADE DA CONSULTA: Críticas sobre o planejamento realizado e sugestões para o dimensionamento amostral.

RELATÓRIO ELABORADO POR: Altino Sheu
Lucélia Song

1. Introdução

A placenta estabelece conexões funcionais que são críticas para a sobrevivência embrionária. Alterações uterinas acontecem constantemente, e dispõem de mecanismos capazes de proteger o embrião/feto para que seja possível a continuidade da gestação. Por outro lado, durante a gestação, podem ocorrer infecções e a própria resposta imune materna contra um agente infeccioso pode acabar induzindo à perda embrionária. Atualmente, tecnologias para diagnóstico e tratamento destas doenças da gestação estão limitadas, principalmente, devido à nossa inabilidade de entender suas causas.

A febre amarela é uma doença infecciosa aguda, de natureza viral, causada pelo vírus, do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, sendo transmitida pela picada do mosquito *Aedes aegypti*. Uma extensa faixa do território brasileiro é considerada endêmica para a febre amarela e o vírus amarelo circula nas áreas de matas em todos os estados das regiões Norte e Centro-Oeste, além do Maranhão, na região Nordeste.

O risco hipotético de infecção transplacentária e a constatação de que fetos são susceptíveis a neuroinvasão pelo vírus 17D, levaram à recomendação geral de que a vacina anti-febre amarela não fosse administrada durante a gravidez e permitida somente após o sexto mês de gestação. Apesar da relevância médica, humana e social envolvidas neste contexto, estudos mais aprofundados sobre os mecanismos inerentes a estes processos, em humanos, são impossíveis de serem delineados.

Por esse motivo, este estudo contempla a avaliação do efeito da vacina anti-febre amarela, que utiliza vírus atenuados com capacidade replicativa e forte atividade imunogênica na progressão da gestação, em camundongos. Pretende-se, por meio de uma amostra piloto, obter críticas em relação ao planejamento amostral, bem como obter sugestões sobre o dimensionamento amostral, tais que possibilitem alcançar os objetivos propostos: avaliar o padrão reprodutivo de fêmeas prenhes na presença ou ausência de vacinação anti-febre amarela (com base no índice de mortalidade embrionária/fetal), e verificar se houve alteração nos pesos dos fetos e das placentas quando comparados os grupos experimental e controle.

2. Descrição do Estudo

Foi realizado um estudo piloto para as doses de vacina anti-febre amarela iguais a 0,1 ml e 0,2 ml (não se sabe bem a dose correta ou suficiente para a imunização em camundongos).

O universo da pesquisa é composto por camundongos *Mus domesticus* com idade aproximada de 3 meses, sob regime de água e ração granulada ad libitum. Duas vezes por semana a dieta foi suplementada com semente de girassol e milho na relação 1:3:6.

Foram colocadas 18 fêmeas nas gaiolas dos machos, para a dose de 0,1 ml; 16 para a dose de 0,2 ml e mais 14 fêmeas para o grupo controle (na proporção de uma fêmea para cada macho), permitindo o acasalamento. Na manhã seguinte foi verificada a presença de rolha vaginal (a manhã em que esta estrutura for encontrada determinará a metade do 1º dia de gestação (denominado 1º ddg)).

As fêmeas foram vacinadas ao ser determinado o 1º ddg. A via utilizada foi a subcutânea, sendo utilizadas agulha e seringa para insulina.

Para avaliar uma possível ação abortiva da vacina, as fêmeas prenhes foram vacinadas no 1º, 6º e 12º ddg (em média, 5 fêmeas prenhes por dia de gestação). No 18º ddg, as fêmeas foram anestesiadas e sacrificadas por deslocamento cervical e submetidas a laparotomia. Os cornos uterinos foram seccionados na extensão longitudinal e, após a retirada dos fetos das placentas e das reabsorções tardias, colocados em sulfato de amônia 10%, por 10 min, para contagem dos sítios de implantação e de reabsorções embrionárias precoces (SALEWSK, 1964). As reabsorções tardias, os embriões ou fetos degenerados ou mortos e os fetos vivos foram contados. As placentas, fetos e ovários foram também pesados.

As observações dos pesos do ovário, fetos e placenta (em gramas), têm como finalidade permitir avaliar a interferência da resposta imune no desenvolvimento da gestação, bem como a observação quanto à presença de malformações externas nos fetos.

Em resumo, foram observados: número de reabsorção embrionária, número de fetos vivos e mortos, peso dos fetos, das placentas e dos ovários (em gramas) e número de corpos lúteos.

O mesmo procedimento foi realizado com o grupo controle de fêmeas, nas quais foi injetado PBS 0,1 M estéril no 1º, 6º e 12º ddg.

3. Descrição das Variáveis

3.1. Variáveis Controladas no Estudo

Grupo: Dose 0,1 ml

Dose 0,2 ml

Controle

Dias de gestação:

1º dia de gestação

6º dia de gestação

12º dia de gestação

3.2. Variáveis Mensuradas

3.2.1. Índice de Mortalidade (ou desempenho reprodutivo)

O Índice de Mortalidade (em %), é dado pela razão:

$$I.M. = \frac{[C - D] + B}{A} \times 100 ,$$

onde: A: áreas de sulfeto positivo (quantidade de fetos no útero)

B: número total de reabsorções (quantidade de fetos absorvidos pelo organismo materno)

C: total de fetos ao nascimento

D: número de fetos viáveis (fetos que nasceram vivos).

3.2.2. Pesos Placenta-Feto

Pesou-se cada placenta e cada feto nascido vivo ou morto, em gramas.

Os dados foram armazenados em planilhas do Microsoft Excel for Windows.

4. Situação do Projeto

Dispõe-se dos dados de um estudo piloto para doses de vacina anti-febre amarela 0,1 ml e 0,2 ml, como também para o grupo controle.

5. Sugestões do CEA

Por intermédio do coeficiente de variação, percebemos uma variabilidade grande no índice de mortalidade em cada período ou dia de gestação em ambas as doses (ver Tabela A.1 e Figura B.2). O mesmo se dá com o peso da placenta (Tabelas A.2 a A.4) no grupo controle para o 1º ddg, com a dose 0,1 ml para o 6º ddg e, em especial, com a dose de 0,2 ml para o 12º ddg. Ainda, observando os pesos dos fetos, para cada dia de gestação, percebemos, em geral, pouca variabilidade entre os dados (Tabelas A.2 a A.4).

Neste estudo tem-se um fator fixo, grupo, em três níveis (dose 0,1 ml, dose 0,2 ml e controle) e as variáveis são observadas em três períodos diferentes (1º, 6º e 12º ddg), cada período com unidades experimentais (camundongos) independentes.

Em comum acordo com a pesquisadora, para o dimensionamento amostral, adotaremos a variável resposta Índice de Mortalidade (%) (definida no item 3.2.1). Para uma posterior análise de variância dos dados, sugerimos um dimensionamento de amostra balanceado (tamanhos iguais para cada dia de gestação) para detectarmos, com maior precisão, diferenças significantes entre os grupos, e dias de gestação. Utilizamos o método “Planning of Samples Sizes with Power Approach” (NETER et al., 1996). Tal critério considera o desvio padrão (σ) dos Índices de Mortalidade, o número de grupos (nesse caso, $r = 9$), o valor de α (probabilidade do erro tipo I), o poder ($1 - \beta$) e Δ definido como a mínima diferença de interesse a ser detectada entre as médias dos grupos.

Assim, com base na Tabela A.1 (valores obtidos no estudo piloto), adotamos $\Delta = 36,00 - 6,17 = 29,83$ %, e encontramos o desvio padrão ponderado ($s = 21,40\%$). A partir daí, utilizamos a relação Δ/s para estimarmos o número de camundongos a serem testados em cada grupo e dia de gestação (nesse caso, obtivemos $\Delta/s = 1,39$).

Na Tabela 1 apresentamos alguns tamanhos amostrais calculados para diferentes α 's e poder do teste ($1-\beta$), considerando o número de tratamentos igual a 9. Cabe à pesquisadora analisar qual o número de camundongos por grupo mais adequado (levando em consideração o erro e poder), de acordo com as limitações da coleta dos dados.

Dessa forma, para $\Delta/s = 1,39$, considerando $\alpha = 5\%$ e $(1-\beta) = 95\%$, teremos uma amostra de 25 camundongos em cada grupo.

Tabela 1: Número de camundongos para cada dia de gestação, por grupo

Número de Tratamentos (r)	Poder (1- β)	$\Delta/s = 1,39$			
		α			
		20%	10%	5%	1%
9	70%	8	11	14	20
9	80%	11	14	17	23
9	90%	14	18	21	28
9	95%	18	22	25	32

A pesquisadora deve decidir qual valor de Δ é mais adequado para a conclusão de que os grupos são diferentes entre si, considerando as limitações logísticas e operacionais da coleta dos dados. A partir daí, utilizamos a relação Δ/σ para estimarmos o número de camundongos a serem testados em cada grupo e dia de gestação. A Tabela A.5 exibe os tamanhos amostrais para vários valores de Δ/σ . Note, que quanto menor a diferença a ser detectada entre as médias dos grupos maior o tamanho amostral dimensionado (fixados o erro e poder).

6. Referências Bibliográficas

NETER J.; KUTNER, M.H.; NACHTSHEIM C.J. and WASSERMAN W. **Applied Linear Statistical Models**. p.1057, 4ed. Boston: McGraw-Hill, 1996.

SALEWSK, E. Färbemethode zum makroskopischen nachweis von implantationsstellen am uterus der ratte. **Arch.Exp.Path.Pharm.** v. 247, p. 367, 1964.

Apêndice A

(Tabelas)

Tabela A.1 Medidas resumo do índice de mortalidade do estudo piloto (camundongos mães)

Grupo	ddg	Número de camundongos (mãe)	Média	Desvio Padrão	CV(%)*	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Dose 0,1 ml	1	5	27,80	24,40	87,77	7,69	8,39	15,40	53,50	62,50
	6	5	12,69	18,02	142,00	0,00	0,00	0,00	31,73	38,46
	12	6	11,98	10,94	91,32	0,00	4,69	7,42	23,81	28,57
Dose 0,2 ml	1	5	23,30	29,70	127,47	0,00	4,17	16,70	45,80	75,00
	6	3	24,20	34,40	142,15	0,00	0,00	9,09	63,60	63,60
	12	4	10,80	12,77	118,24	0,00	0,00	9,09	23,30	25,00
Controle	1	4	36,00	35,80	99,44	10,00	12,50	22,50	72,90	88,90
	6	5	6,17	5,82	94,33	0,00	0,00	8,33	11,25	12,50
	12	5	9,87	10,89	110,33	0,00	0,00	7,69	20,84	25,00

* CV = Coeficiente de Variação

Tabela A.2 Medidas resumo para o 1º ddg (camundongos filhotes)

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	CV(%)	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Peso do Feto	dose 0,1 ml	44	0,908	0,127	13,99	0,534	0,831	0,907	0,968	1,223
	dose 0,2 ml	48	0,864	0,184	21,30	0,105	0,827	0,886	0,980	1,175
	controle	29	0,973	0,302	31,04	0,000	0,886	1,006	1,155	1,383
Peso da Placenta	dose 0,1 ml	44	0,142	0,041	28,87	0,076	0,116	0,907	0,968	1,223
	dose 0,2 ml	48	0,130	0,024	18,46	0,092	0,114	0,125	0,149	0,199
	controle	29	0,163	0,153	93,87	0,022	0,090	0,132	0,188	0,880

Tabela A.3 Medidas resumo para o 6º ddg (camundongos filhotes)

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	CV(%)	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Peso do Feto	dose 0,1 ml	50	0,948	0,198	20,89	0,114	0,926	0,994	1,049	1,119
	dose 0,2 ml	23	0,864	0,111	12,85	0,685	0,811	0,849	0,902	1,238
	controle	48	1,239	0,196	15,82	0,269	1,188	1,256	1,351	1,537
Peso da Placenta	dose 0,1 ml	50	0,151	0,108	71,52	0,063	0,12	0,994	1,049	1,119
	dose 0,2 ml	23	0,134	0,025	18,66	0,076	0,117	0,849	0,902	1,238
	controle	48	0,115	0,018	15,65	0,078	0,105	0,112	0,127	0,152

Tabela A.4 Medidas resumo para o 12º ddg (camundongos filhotes)

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	CV(%)	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Peso do Feto	dose 0,1 ml	72	0,866	0,181	20,90	0,152	0,808	0,900	0,951	1,241
	dose 0,2 ml	41	0,872	0,088	10,09	0,683	0,825	0,876	0,927	1,041
	controle	48	0,830	0,172	20,72	0,154	0,727	0,863	0,927	1,120
Peso da Placenta	dose 0,1 ml	72	0,128	0,041	32,03	0,000	0,112	0,126	0,148	0,262
	dose 0,2 ml	41	0,136	0,373	274,27	0,081	0,116	0,128	0,148	0,262
	controle	48	0,129	0,06	46,51	0,031	0,098	0,114	0,134	0,369

Tabela A.5 Número de camundongos para cada dia de gestação, por grupo

Número de Tratamentos (r)	Poder (1-β)	$\Delta/\sigma = 1,0$			
		α			
		0,2	0,1	0,05	0,01
9	0,70	15	20	25	35
9	0,80	20	26	31	43
9	0,90	27	33	40	52
9	0,95	33	40	47	60

Número de Tratamentos (r)	Poder (1-β)	$\Delta/\sigma = 1,25$			
		α			
		0,2	0,1	0,05	0,01
9	0,70	10	13	16	23
9	0,80	13	17	21	28
9	0,90	17	22	26	34
9	0,95	22	26	30	39

Número de Tratamentos (r)	Poder (1-β)	$\Delta/\sigma = 1,50$			
		α			
		0,2	0,1	0,05	0,01
9	0,70	7	10	12	17
9	0,80	9	12	15	20
9	0,90	13	16	18	24
9	0,95	15	19	22	28

Número de Tratamientos (r)	Poder (1-β)	$\Delta/\sigma = 1,75$			
		α			
		0,2	0,1	0,05	0,01
9	0,70	6	7	9	13
9	0,80	7	9	11	15
9	0,90	9	12	14	18
9	0,95	12	14	16	21

Número de Tratamientos (r)	Poder (1-β)	$\Delta/\sigma = 2,0$			
		α			
		0,2	0,1	0,05	0,01
9	0,70	5	6	7	10
9	0,80	6	7	9	12
9	0,90	8	9	11	14
9	0,95	9	11	13	16

Número de Tratamientos (r)	Poder (1-β)	$\Delta/\sigma = 2,5$			
		α			
		0,2	0,1	0,05	0,01
9	0,70	3	4	5	7
9	0,80	4	5	6	8
9	0,90	5	6	8	10
9	0,95	6	8	9	11

Número de Tratamientos (r)	Poder (1-β)	$\Delta/\sigma = 3,0$			
		α			
		0,2	0,1	0,05	0,01
9	0,70	3	3	4	5
9	0,80	3	4	5	6
9	0,90	4	5	6	7
9	0,95	5	6	6	8

Apêndice B

(Gráficos)

Figura B.1 Perfis Médios para a Variável Índice de Mortalidade (%) (camundongos mães)

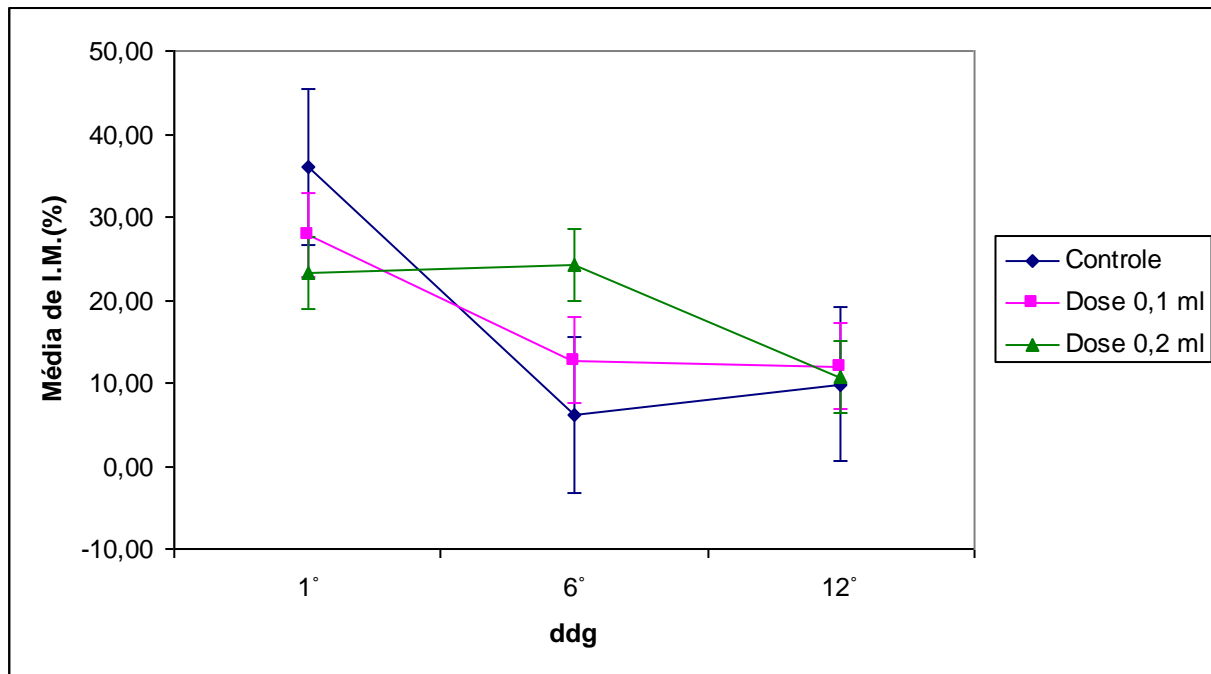


Figura B.2 Distribuição da variável Índice de Mortalidade (%), por Dose (ml) e ddg (camundongos mães)

