

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA
RELATÓRIO DE CONSULTA

TÍTULO DO PROJETO: “Estudo *in vitro* da integridade da membrana plaquetária humana quando submetida a criopreservação e descongelamento”.

PESQUISADORA: Sueli Doghi Melende

ORIENTADOR: Dr. Élbio D’Amico

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Medicina – USP

FINALIDADE DO PROJETO: Mestrado

PARTICIPANTES DA ENTREVISTA: Antonio Carlos Pedroso de Lima
Carmen Diva Saldiva de André
Daniela Soares Costa
Dr. Élbio D’Amico
Sueli Doghi Melende

DATA: 06/11/2001

FINALIDADE DA CONSULTA: Sugestões para análise de dados e dimensionamento amostral.

RELATÓRIO ELABORADO POR: Daniela Soares Costa

1. Introdução

Todas as células do sangue (hemácias, linfócitos e plaquetas) têm sua origem e maturação na medula óssea, que está sujeita a doenças. A maioria dos pacientes submetidos à transfusão de plaquetas desenvolve anticorpos que diminuem a vida média das plaquetas transfundidas (refratariedade). Uma alternativa terapêutica seria a criopreservação do concentrado de plaquetas do próprio paciente (doação autoplástica ou homóloga). Segundo a Associação Americana de Bancos de Sangue, as plaquetas apresentam um grande dano celular durante a criopreservação, apresentando uma redução funcional. Dessa forma, torna-se importante desenvolver técnicas de criopreservação que mantenham a viabilidade, a atividade e a capacidade funcional das plaquetas pós-descongelamento, prolongando o período de estocagem, o que representa um risco potencial de propagação bacteriana no concentrado plaquetário.

O objetivo principal desse estudo é comparar diferentes soluções criopreservantes a partir da avaliação laboratorial dos concentrados plaquetários criopreservados e descongelados.

Essa consulta tem como finalidade determinar o tamanho amostral necessário para proceder à avaliação descrita, bem como indicar sugestões para análise estatística dos dados a serem coletados.

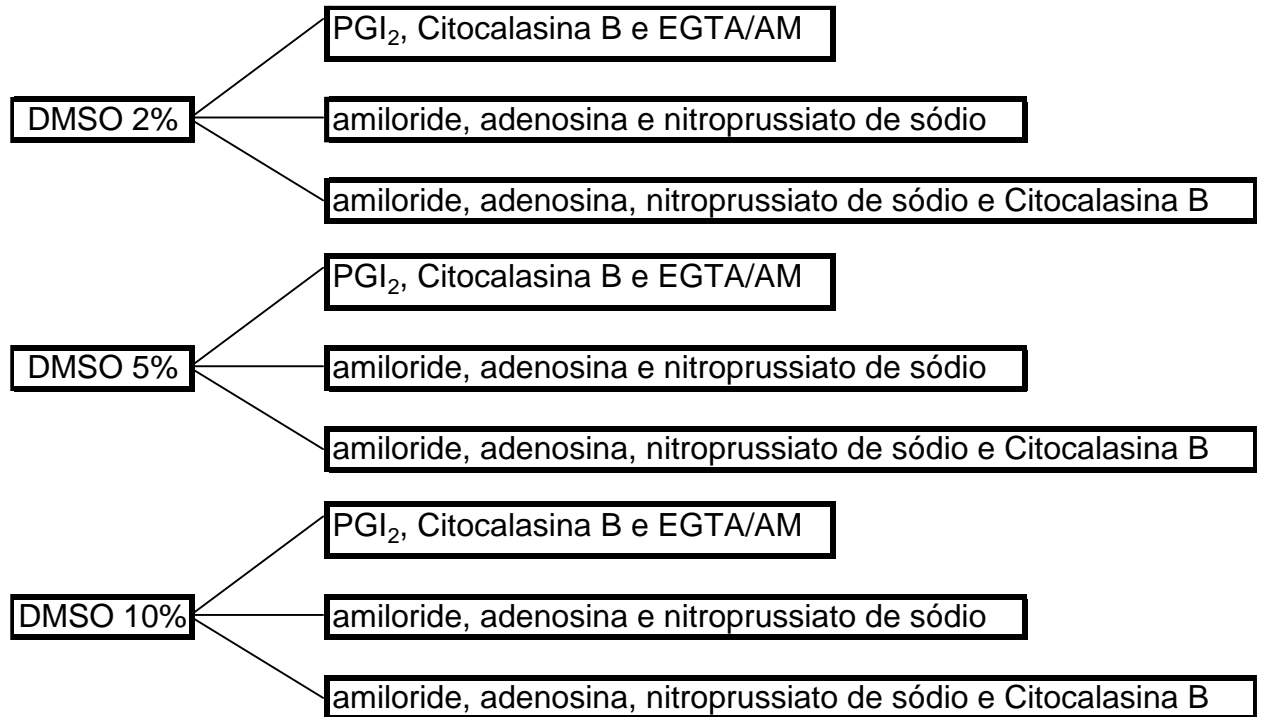
2. Descrição do estudo

Serão utilizadas 10 alíquotas de concentrado de plaquetas de cada doador, com 20 ml cada. Uma dessas alíquotas, denominada alíquota 10 (fresca), não será criopreservada, servindo como parâmetro comparativo (controle) para as outras 9 alíquotas, que serão criopreservadas uma a uma em 9 soluções (Figura 2.1), obtidas combinando diferentes concentrações do agente crioprotetor DMSO (2%, 5% e 10%) com os seguintes estabilizadores de citoesqueleto:

- PGI_2 , Citocalasina B e EGTA/AM;
- amiloride, adenosina e nitroprussiato de sódio;

- amiloride, adenosina, nitroprussiato de sódio e Citocalasina B.

Figura 2.1: Composição das 9 soluções criopreservantes.



Todas as alíquotas criopreservadas serão descongeladas e analisadas 3 meses após o congelamento, a fim de se avaliar a ação das soluções utilizadas sobre a integridade da membrana plaquetária.

3. Descrição das variáveis

As variáveis envolvidas no estudo são:

- **contagem plaquetária** (em plaquetas / mm³);
- **pH** (adimensional);
- **resposta ao choque hipotônico** (em %);
- **citometria de fluxo** (em %);
- **teste de agregação plaquetária** (em %);
- **quantificação da mudança de forma plaquetária induzida pelo ADP** (em %);
- **quantificação da mudança de forma plaquetária induzida pela agitação** (em %);
- **reação de liberação de lactato desidrogenase** (em %);
- **produção de dialdeído malônico** (em η moles / 10³ plaquetas).

4. Estágio atual do projeto

Atualmente, os pesquisadores aguardam os cálculos de tamanho de amostra, apresentados a seguir, para a realização do experimento.

5. Sugestões do CEA

As informações que serão coletadas devem ser armazenadas numa planilha de dados, por exemplo, no Microsoft Excel, no formato recomendado para leitura de dados pelos pacotes de análise estatística mais utilizados. Ou seja, cada linha deve representar um doador (unidade experimental) e cada coluna uma informação (variável) dos doadores, como mostra a tabela a seguir.

Tabela 5.1: Exemplo de organização do banco de dados (valores hipotéticos).

doador	grupo	contagem plaquetária ($10^{11} \times$ plaquetas/mm ³)	pH	resposta ao choque ipotônico (%)	...
1	controle	2,53	6,05	89,76	
2	controle	3,22	6,11	93,03	
3	soluçãoII	1,69	7,00	83,02	
4	soluçãoV	2,36	6,74	84,61	
1	soluçãool	2,04	7,21	85,35	
3	controle	2,67	6,43	95,72	
7	soluçãoIII	2,48	6,90	82,89	
:	:	:	:	:	

Inicialmente, para o cálculo do tamanho amostral considera-se um modelo de análise de variância para medidas repetidas em um fator fixo, com 10 níveis, compostos pelas 9 soluções criopreservantes (Figura 2.1) e a solução controle. Maiores detalhes sobre esse modelo podem ser vistos em Neter et al. (1996).

Como não se tem uma amostra piloto, os desvios padrão das variáveis **citometria de fluxo** e **teste de agregação plaquetária** (mais importantes no estudo, segundo os pesquisadores) são obtidos da literatura. São eles 12% e 24%, respectivamente.

Com base nos desvios padrão, calculam-se os tamanhos amostrais (Neter et al., 1996) para alguns valores da diferença mínima detectável entre as médias dos níveis do fator (tratamentos), fixando as probabilidades dos erros tipo I (probabilidade de

concluir erroneamente que pelo menos uma das 10 médias difere das demais) e tipo II (probabilidade de concluir erroneamente que todas as 10 médias são iguais) em 0,05. Os resultados estão apresentados nas Tabela 5.2 e 5.3.

Tabela 5.2: Número de doadores necessários com base na variável **citometria de fluxo** ($\sigma = 12\%$) .

diferença mínima detectável (Δ) (%)	$\frac{\Delta}{\sigma}$	número de doadores
12	1,00	48
15	1,25	31
18	1,50	22
21	1,75	17
24	2,00	13
30	2,50	9
36	3,00	7

Tabela 5.3: Número de doadores necessários com base na variável **teste de agregação plaquetária** ($\sigma = 24\%$) .

diferença mínima detectável (Δ) (%)	$\frac{\Delta}{\sigma}$	número de doadores
24	1,00	48
30	1,25	31
36	1,50	22
42	1,75	17
48	2,00	13
60	2,50	9
72	3,00	7

Essas tabelas sugerem um número de doadores entre 7 e 48, lembrando que de cada doador será utilizada uma alíquota para cada tratamento.

O tamanho amostral varia de acordo com a diferença mínima detectável entre as médias dos tratamentos, representada por Δ nas tabelas. Por exemplo, de acordo com a Tabela 5.2, para se detectar no mínimo uma diferença de 36% entre as médias dos tratamentos para a variável **citometria de fluxo**, serão necessários pelo menos 7 doadores. Note que à medida que diminui essa diferença, maior deve ser o número de doadores. A obtenção do tamanho amostral também pode ser feita considerando-se a variável **teste de agregação plaquetária** (Tabela 5.3).

Depois de obtidos os dados, recomenda-se uma análise descritiva inicial, através de medidas resumo (como médias e desvios padrão) e gráficos (por exemplo, do tipo “box-plot”). Maiores detalhes podem ser vistos em Bussab e Morettin (1987).

Posteriormente, sugere-se o uso do mesmo modelo de análise de variância citado no cálculo do tamanho amostral considerando medidas repetidas em um fator fixo, com 10 níveis (soluçãoI, soluçãoII, ..., soluçãoIX e controle) para analisar o comportamento médio das variáveis do estudo. Caso sejam detectadas diferenças estatisticamente significantes, comparações múltiplas devem ser utilizadas para analisar as médias duas a duas, identificando quais tratamentos diferem. O método mais indicado em casos como esse, em que se tem um único controle, é o método de comparações de Duncan (Hair et al., 1998).

6. Conclusão

Os tamanhos de amostra calculados nas Tabelas 5.2 e 5.3 devem ser avaliados com relação ao tempo e custo necessários para a obtenção da amostra. Uma vez coletados os dados, a organização de seus valores deve ser feita conforme a Tabela 5.1. Sugere-se que os pesquisadores realizem uma análise descritiva inicial, quando a qualidade dos dados deve ser avaliada.

O projeto deve então ser encaminhado para o CEA para a análise estatística durante um dos semestres letivos de 2002.

7. Referências Bibliográficas

BUSSAB, W. O. e MORETTIN, P. A. (1987). **Estatística Básica – Métodos Quantitativos**. 4.ed. São Paulo: Atual. 321p.

HAIR JR., J. F., ANDERSON, R. E., TATHAM, R. L. and BLACK, W. C. (1998). **Multivariate Data Analysis**. 5.ed. New Jersey: Prentice Hall. 730p.

NETER, J., KUTNER, M. H., NACHTSHEIM, C. J. and WASSERMAN, W. (1996). **Applied Linear Statistical Models**. 4.ed. Boston: Mc Graw Hill. 1408p.