

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA - USP
RELATÓRIO DE CONSULTA

TÍTULO : “Estudo da ação de terpenos na biossíntese de isoprenóides em Leishmania”.

PESQUISADORA: Denise Costa Arruda

ORIENTADORA: Silvia Reni Bortolin Uliana

INSTITUIÇÃO: ICB II - USP

FINALIDADE : Tese de Doutorado

RESPONSÁVEIS PELA ANÁLISE:

- Denise Costa Arruda
- Silvia Reni Bortolin Uliana
- Lúcia Pereira Barroso
- Júlia Maria Pavan Soler
- Cesar Augusto Zanardi Dias Castaldi
- Regis Chinen
- Tatiana Terabayashi Melhado
- Lourdes Contreras Montenegro

DATA: 26/04/2005

FINALIDADE DA ENTREVISTA: Crítica à medida resumo utilizada e sugestão de análise estatística

RELATÓRIO ELABORADO POR:

- Cesar Augusto Zanardi Dias Castaldi
- Regis Chinen

1. Introdução

A *Leishmaniose* é uma doença infecto-contagiosa que pode ser transmissível ao homem por certos animais (ou vice-versa), causada por um protozoário e transmitida por mosquitos de pequeno porte (SESPA), conforme ilustrado na Figura 1. Ela pode assumir duas formas distintas: visceral ou cutânea (tegumentar).

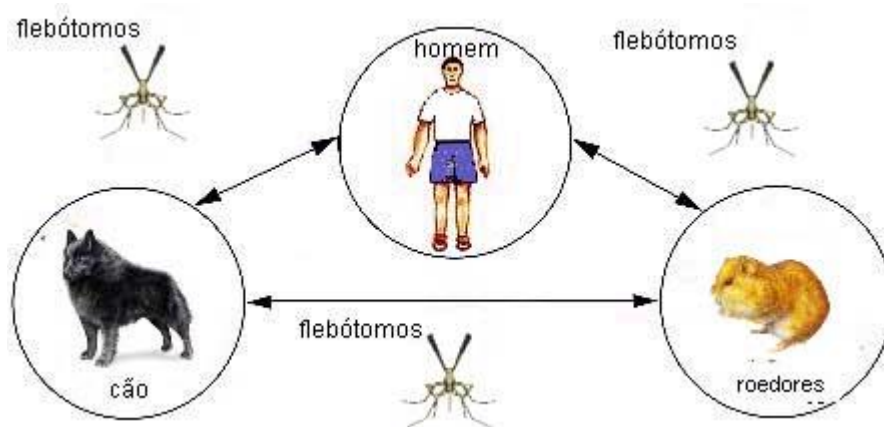


Figura 1. Formas de transmissão de *Leishmaniose*.

Neste projeto, foca-se a forma cutânea em busca de avaliar a ação da antileishmania dos terpenos (compostos naturais) nas lesões. Atualmente os medicamentos em uso têm graves efeitos colaterais por serem tóxicos, sendo esse o principal motivo para a pesquisa.

O estudo foi realizado em 3 etapas, das quais abordaremos neste relatório apenas a última, que consiste na avaliação da atividade antileishmania de terpenos no tratamento de camundongos infectados com *Leishmania amazonensis*.

O projeto está em andamento, com três experimentos já realizados, e a finalidade da consulta é auxiliar a pesquisadora na obtenção de uma medida resumo para quantificar o desenvolvimento da lesão e dar sugestão para análise estatística dos dados.

2. Descrição do Estudo

Com a escassez de estudos anteriores sobre o tratamento em camundongos de lesões causadas pela *Leishmaniose*, deseja-se averiguar a atividade dos terpenos. Para isso, nos experimentos, camundongos (de mesma linhagem) foram infectados (com cerca de 10^6 amastigotas) na base da cauda. Para que a toxicidade do medicamento fosse verificada e uma medida padrão basal da cauda obtida, manteve-se um grupo controle (não infectado) para comparação.

Após um mês de infecção, os camundongos apresentam um inchaço na região em que foram infectados. Neste período, os mesmos foram separados em cinco grupos por tratamento:

- Controle: sem nenhum tratamento;
- Placebo: lanovaselina por via tópica;
- Limo 10%: limoneno 10%, por via tópica;
- Limo 100mg/Kg*dia: limoneno 100mg/Kg*dia, por via intra-retal;
- L+N: uma mistura de Limoneno a 10% com Nerolidol a 10%, por via tópica.

Os tratamentos por via tópica foram administrados duas vezes por dia, por volta das 10h da manhã e no fim da tarde, por meio da aplicação do medicamento na região infectada com o auxílio de cotonetes. Já o tratamento por via intra-retal foi administrado uma vez ao dia. Todos os tratamentos têm duração de 30 a 45 dias.

No primeiro dia de tratamento ocorre a mensuração da região mais crítica (com maior inchaço) na cauda do camundongo. Assim também se procede para as semanas subseqüentes durante o período do experimento.

Realizaram-se três experimentos, sendo que cada grupo de tratamento continha de 3 a 6 animais, com duração distinta. Existe, ainda, a possibilidade de haver reincidência da doença após um determinado período posterior ao fim do experimento. Para evitar qualquer equívoco no diagnóstico da eficácia do medicamento, continuou-se mensurando a região mais afetada da cauda dos

animais por um período após o término do tratamento, sendo que o número de semanas variou por experimento.

No primeiro experimento (nº 3), o número amostral foi de 19 camundongos, como indicado na Figura 2. Separados por tratamento, todos por via tópica, obteve-se 5 animais para o grupo controle, 4 para placebo, 5 para limoneno 10% e 5 para mistura limoneno 10% e Nerolidol 10%. Após 10 semanas os animais foram examinados e foi feita uma avaliação da lesão.

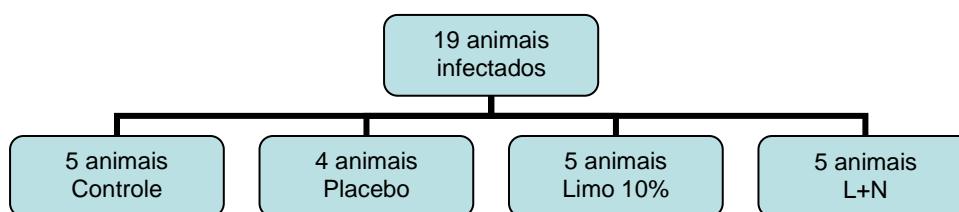


Figura 2. Esquema do experimento nº 3.

Para o experimento seguinte (nº 5), o número amostral foi de 18 camundongos. Separados por tratamento, todos estes administrados por via tópica obteve-se 3 animais para controle, 3 para placebo, 6 para limoneno 10% e 6 para mistura limoneno 10% e Nerolidol 10%, como descrito na Figura 3. Após 19 semanas os animais foram sacrificados.

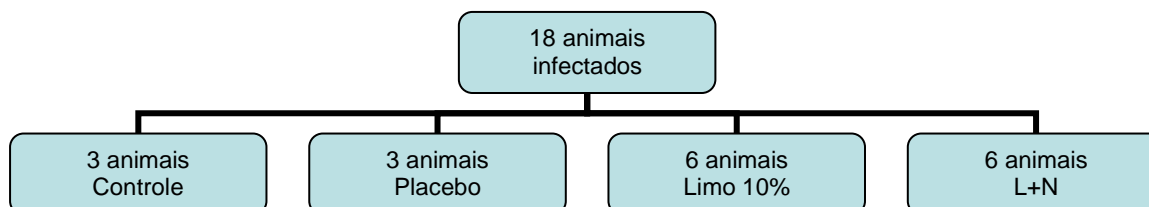


Figura 3. Esquema do experimento nº 5.

Quanto ao último experimento (nº 7), o número amostral foi de 9 camundongos. Separados por tratamento obteve-se 4 animais para controle e 5 para limoneno 100mg/Kg*dia por via intra-retal (Figura 4). Ao fim de 12 semanas os animais foram examinados e foi feita uma avaliação da lesão. Neste experimento não foram obtidos os valores da 9ª a 11ª semanas.

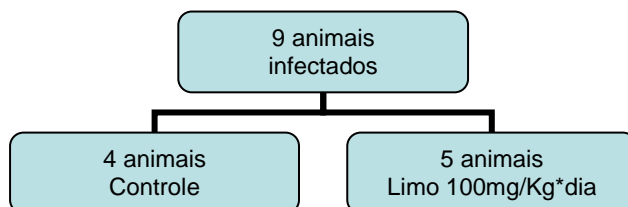


Figura 4. Esquema do experimento nº 7.

3. Descrição das Variáveis e Processo de Coleta de Dados

A variável resposta do experimento foi o diâmetro médio, que é calculado como a média das medidas da altura e largura transversais da parte com maior lesão na cauda do camundongo, como ilustrado na Figura 5. Para se obter tais valores, foi utilizada uma ferramenta de medição com precisão centesimal: o paquímetro.

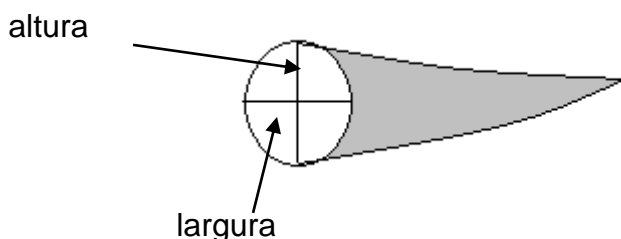


Figura 5. Esquema de obtenção das medidas da altura e largura.

É importante ressaltar que não foi realizado um controle preciso do número inicial de parasitas usados na infecção da cauda dos camundongos. Visando a avaliação final da eficácia de cada tratamento, têm-se duas metodologias: exame histopatológico e diluição limitante. O primeiro consiste em cortar transversalmente uma região da cauda afetada e efetuar a verificação laboratorial da quantidade de

parasitas, obtendo-se as seguintes respostas qualitativas: *Não há parasitas*, *Há poucos parasitas* ou *Há muitos parasitas*. Não obstante, na diluição limitante, sacrifica-se o animal, remove-se a lesão e se homogeniza o tecido para estimar a carga parasitária.

As medições obtidas foram armazenadas em planilhas do MS Excel. Alocaram-se os dados dos três experimentos (Experimento nº 3, nº 5 e nº 7) em planilhas diferentes, distinguindo os grupos de tratamento e indicando os diâmetros médios da cauda dos animais e a semana em questão, classificando ao final do experimento sob critério visual (Experimento nº 3 e nº 7), a lesão no camundongo como *Sem Lesão*, *Lesão Pequena*, *Lesão Média* ou *Lesão Grande*.

4. Situação do Projeto

O projeto encontra-se na fase de análise estatística dos dados dos experimentos com camundongos, os quais já foram realizados e os valores das variáveis obtidos.

Nenhuma análise inferencial foi realizada até o momento, apenas gráficos de perfis de média foram construídos pelos pesquisadores.

Descritivamente, se considerarmos a diâmetro médio da cauda na parte infectada, parece haver indícios de que o tratamento com a mistura de Limoneno a 10% com Nerolidol a 10% foi o melhor para o experimento nº 3. Ao passo que o tratamento com apenas Limonemo, aparentemente, teve uma forte retomada da *leishmania*, estando no nível do controle ao final da 10ª semana (Gráfico B.1).

Nota-se (Gráfico B.2), no experimento nº 5, que os tratamentos que contém Limonemo, têm comportamento semelhante e, aparentemente, melhor que o controle à partir da oitava semana .

Considerando a variabilidade dos dados, observa-se que alguns experimentos apresentaram tendências no decorrer do tempo, ou seja, com o passar das semanas o coeficiente de variação não permaneceu o mesmo. Tal fato, evidencia-se para os grupos *Placebo* e *Limo 10%* no experimento nº 3 (Tabela A.1), para o grupo *Controle*

no experimento nº 5 (Tabela A.2) e para o grupo *Limo 10%* no experimento nº 5, os quais apresentam uma variação bastante heterogênea, com redução dos valores nas semanas subseqüentes

Um dos problemas relacionados à coleta de dados foi a dispersão dos parasitas pelo corpo dos camundongos, uma vez que a infecção e as medições das variáveis resposta se deram na cauda dos animais. Além disso, após algum tempo, as lesões tendem a necrosar, ou seja, o diâmetro médio da cauda dos camundongos diminui. A interpretação dessa medida fica assim comprometida, podendo ser confundida entre duas situações extremas, ambas conduzindo a uma diminuição no valor da resposta: uma melhora da doença alcançada através dos tratamentos ou a continuação da doença resultando na necrose da cauda do animal.

5. Sugestão do CEA

Sendo o interesse comparar o efeito de medicamentos, pode-se utilizar uma comparação de médias (Bussab e Morettin, 2002), desde que análises mais robustas não sejam diagnosticadas como necessárias. Conforme a estrutura do experimento, camundongos de mesma linhagem são mensurados ao longo do tempo em diferentes tratamentos. Trata-se de um modelo de análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas, pois as caudas dos camundongos são medidas ao longo do tempo. Mais detalhes sobre modelos longitudinais podem ser encontrados em McCulloch (2001) e Singer e Andrade (1986).

Quanto à variável resposta, uma alternativa ao diâmetro médio a ser considerada é o volume aproximado da parte infectada da cauda. Esse valor pode ser calculado por:

$$V = \pi R^2 * h$$

onde,

R: maior raio compreendido no intervalo da região afetada pelos parasitas;

h: comprimento da região afetada, partindo de uma extremidade até a outra compreendida no intervalo em questão;

V: Volume aproximado da região afetada.

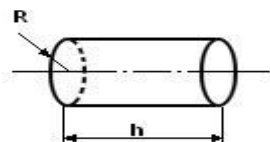


Figura 6. Ilustração da obtenção das medidas para o volume.

Dessa maneira, evita-se o confundimento entre pequenos valores das respostas (comum na melhora da doença alcançada através dos tratamentos e na continuação da doença resultando na necrose da cauda do animal) pelo fato de animais sadios possuírem o comprimento da região afetada igual a zero, resultando no volume igual a zero, distinto de baixos valores volumétricos dos infectados após necrose.

Pode-se aplicar a mesma análise inferencial, (ANOVA) com medidas repetidas, para essa nova proposta de medida da região afetada.

Uma outra alternativa, ainda utilizando o diâmetro médio, seria adotar como variável resposta a diferença entre o diâmetro médio da semana com o valor da cauda não infectada. Com isso, pode-se verificar a eficácia dos tratamentos. Aqueles instantes que indicarem diferenças positivas mostrarão indícios da presença de inchaço (pouca eficiência do tratamento), ao passo que aqueles que apresentarem diferenças próximas de zero indicarão ausência de inchaço (maior eficiência do tratamento). Já os que apresentarem diferenças negativas poderão ser camundongos portadores de caudas necrosadas. Vale ressaltar que tal análise pode ser feita por meio do modelo de ANOVA com medidas repetidas.

Sugere-se que o trabalho seja inscrito no CEA para triagem de projetos para serem analisados no 2º semestre de 2005.

6. Referências Bibliográficas

BUSSAB, W.O. e MORETTIN, P. A. (2002). **Estatística Básica**. 5. ed. São Paulo: Saraiva.

MCCULLOCH, C. E. (2001). **Generalized, linear, and mixed models**. New York : John Wiley & Sons.

SESPA. http://www.sespa.pa.gov.br/Atualização/Agravos/agravos_leishmaniose.htm

SINGER, J. M. e ANDRADE, D. F. (1986). **Análise de Dados Longitudinais**. VII Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística. Campinas.

Apêndice A

Tabelas

Tabela A.1. Medidas descritivas do diâmetro médio para o experimento nº 3.

Experimento nº 3						
tratamento	semana	média	erro padrão	desvio padrão	mediana	CV (%)
Controle (n=5)	0	3,780	0,268	0,600	3,550	6,300
	1a	3,830	0,252	0,563	3,750	6,803
	2a	4,120	0,294	0,657	3,950	6,271
	3a	4,130	0,244	0,546	4,200	7,564
	4a	4,300	0,262	0,585	4,350	7,350
	5a	4,400	0,314	0,703	4,450	6,259
	6a	4,290	0,274	0,614	4,500	6,987
	7a	4,375	0,282	0,629	4,525	6,955
	8a	4,430	0,288	0,645	4,600	6,868
	9a	4,330	0,297	0,664	4,500	6,521
	10a	4,510	0,293	0,654	4,650	6,896
Placebo (n=4)	0	3,613	0,101	0,202	3,600	17,886
	01a	3,800	0,054	0,108	3,775	35,185
	02a	3,825	0,032	0,065	3,825	59,302
	03a	3,913	0,112	0,225	3,950	17,391
	04a	3,963	0,128	0,256	3,950	15,480
	05a	4,088	0,118	0,236	4,175	17,322
	06a	3,950	0,154	0,308	3,850	12,825
	07a	4,038	0,163	0,325	3,950	12,425
	08a	4,075	0,252	0,504	3,925	8,085
	09a	4,000	0,222	0,443	3,850	9,029
	10a	4,075	0,217	0,435	3,950	9,368
Limo 10% (n=5)	0	3,670	0,118	0,264	3,700	13,902
	01a	3,740	0,181	0,404	3,850	9,257
	02a	3,670	0,162	0,362	3,650	10,138
	03a	3,810	0,276	0,618	3,500	6,165
	04a	3,850	0,313	0,701	3,550	5,492
	05a	3,840	0,285	0,638	3,550	6,019
	06a	4,040	0,348	0,777	3,600	5,199
	07a	4,210	0,470	1,050	3,550	4,010
	08a	4,500	0,603	1,348	3,850	3,338
	09a	4,450	0,591	1,321	3,700	3,369
	10a	4,500	0,565	1,262	3,750	3,566
L+N (n=5)	0	3,600	0,297	0,663	3,350	5,430
	01a	3,720	0,327	0,731	3,350	5,089
	02a	3,890	0,309	0,690	3,650	5,638
	03a	3,810	0,341	0,764	3,550	4,987
	04a	3,700	0,292	0,654	3,500	5,657
	05a	3,680	0,256	0,573	3,450	6,422
	06a	3,730	0,268	0,600	3,500	6,217
	07a	3,750	0,239	0,535	3,550	7,009
	08a	3,740	0,254	0,567	3,525	6,596
	09a	3,810	0,211	0,472	3,550	8,072
	10a	3,700	0,180	0,402	3,550	9,204

Tabela A.2. Medidas descritivas do diâmetro médio para o experimento nº 5.

Experimento nº 5						
tratamento	semana	média	erro padrão	desvio padrão	mediana	CV(%)
Controle (n=3)	0	3,467	0,0167	0,0289	3,450	119,955
	1a	3,517	0,060	0,104	3,550	33,782
	2a	3,467	0,017	0,029	3,450	119,955
	3a	3,567	0,033	0,058	3,600	61,815
	4a	3,533	0,017	0,029	3,550	122,260
	5a	3,617	0,017	0,029	3,600	125,145
	6a	3,633	0,044	0,076	3,650	47,556
	7a	3,983	0,017	0,029	4,000	137,830
	8a	4,033	0,044	0,076	4,050	52,792
	9a	3,950	0,029	0,050	3,950	79,000
	10a	4,100	0,058	0,100	4,100	41,000
	11a	4,033	0,109	0,189	3,950	21,339
	12a	4,167	0,203	0,351	4,200	11,872
	13a	4,183	0,159	0,275	4,050	15,211
	14a	4,400	0,362	0,626	4,350	7,029
	15a	4,367	0,317	0,548	4,050	7,969
	16a	4,367	0,159	0,275	4,350	15,880
	17a	4,467	0,203	0,351	4,500	12,726
	18a	4,667	0,196	0,340	4,550	13,726
	19a	4,783	0,174	0,301	4,750	15,890
Placebo (n=3)	0	3,533	0,021	0,052	3,500	68,475
	1a	3,550	0,018	0,045	3,550	79,418
	2a	3,617	0,021	0,052	3,650	70,091
	3a	3,583	0,011	0,026	3,600	138,888
	4a	3,633	0,028	0,068	3,650	53,196
	5a	3,600	0,018	0,045	3,600	80,537
	6a	3,517	0,086	0,211	3,600	16,643
	7a	3,750	0,018	0,045	3,750	83,893
	8a	3,750	0,000	0,000	3,750	-
	9a	3,625	0,016	0,039	3,600	93,669
	10a	3,683	0,023	0,056	3,675	65,423
	11a	3,683	0,011	0,026	3,700	142,764
	12a	3,850	0,018	0,045	3,850	86,130
	13a	3,717	0,038	0,093	3,750	39,922
	14a	3,817	0,011	0,026	3,800	147,934
	15a	3,867	0,021	0,052	3,900	74,936
	16a	3,783	0,021	0,052	3,750	73,320
	17a	3,800	0,000	0,000	3,800	-
	18a	3,800	0,000	0,000	3,800	-
	19a	3,817	0,028	0,068	3,800	55,881

Experimento nº 5 – continuação						
tratamento	semana	média	erro padrão	desvio padrão	mediana	CV(%)
Limo 10% (n=6)	0	3,500	0,048	0,118	3,475	29,586
	1a	3,483	0,033	0,082	3,475	42,688
	2a	3,517	0,033	0,082	3,525	43,097
	3a	3,550	0,048	0,118	3,550	30,008
	4a	3,542	0,065	0,159	3,500	22,219
	5a	3,617	0,054	0,133	3,625	27,214
	6a	3,608	0,060	0,146	3,575	24,664
	7a	3,750	0,078	0,190	3,750	19,768
	8a	3,725	0,124	0,303	3,725	12,294
	9a	3,625	0,092	0,225	3,575	16,090
	10a	3,800	0,159	0,390	3,575	9,744
	11a	3,842	0,206	0,505	3,625	7,608
	12a	3,842	0,204	0,500	3,575	7,684
	13a	3,850	0,188	0,462	3,650	8,333
	14a	3,892	0,219	0,537	3,600	7,248
	15a	3,975	0,282	0,690	3,675	5,761
	16a	3,942	0,257	0,629	3,675	6,267
	17a	4,042	0,288	0,705	3,700	5,733
	18a	4,033	0,249	0,610	3,750	6,611
	19a	4,250	0,339	0,830	3,875	5,120
L+N (n=6)	0	3,492	0,047	3,350	3,525	1,042
	1a	3,542	0,035	3,400	3,550	1,042
	2a	3,558	0,051	3,350	3,575	1,062
	3a	3,558	0,030	3,450	3,575	1,031
	4a	3,608	0,054	3,400	3,625	1,061
	5a	3,675	0,095	3,450	3,600	1,065
	6a	3,650	0,047	3,500	3,650	1,043
	7a	3,867	0,125	3,600	3,750	1,074
	8a	3,842	0,134	3,600	3,725	1,067
	9a	3,600	0,083	3,450	3,525	1,043
	10a	0,370	0,012	0,345	0,358	1,072
	11a	3,750	0,161	3,400	3,600	1,103
	12a	3,942	0,210	3,600	3,700	1,095
	13a	3,917	0,245	3,500	3,575	1,119
	14a	3,825	0,184	3,450	3,600	1,109
	15a	3,892	0,268	3,400	3,550	1,145
	16a	3,892	0,263	3,500	3,600	1,112
	17a	3,958	0,327	3,350	3,600	1,181
	18a	4,017	0,338	3,450	3,575	1,164
	19a	3,975	0,319	3,450	3,650	1,152

Apêndice B

Gráficos

Gráfico B.1. Perfis médios dos diâmetros médios do experimento n° 3.

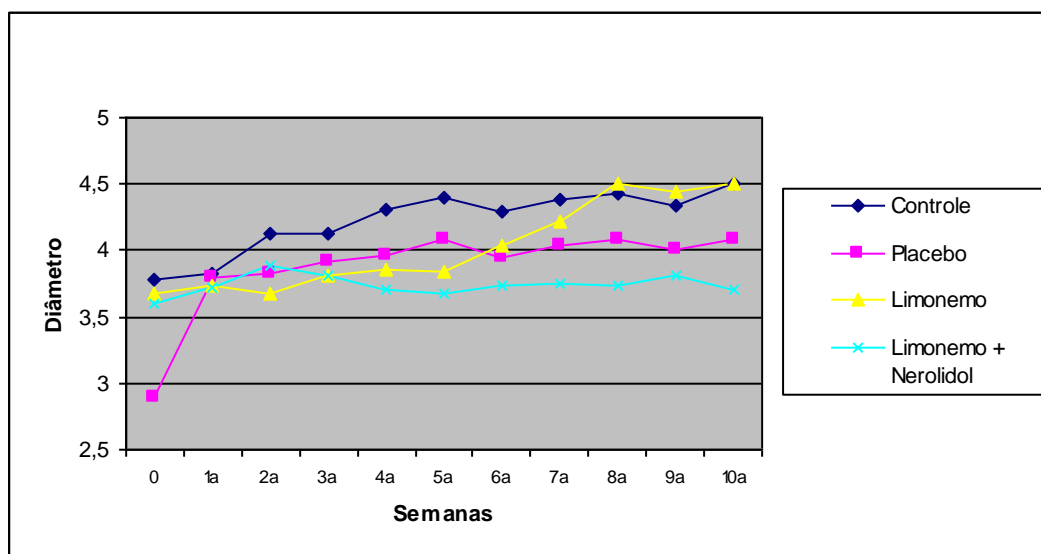


Gráfico B.2. Perfis médios dos diâmetros médios do experimento n° 5.

