

# Análise estatística de experimentos de imunologia

**Projeto para:** Evelyn de Carvalho

**Análise:** Wasim Aluísio Prates-Syed

wasim.syed@usp.br

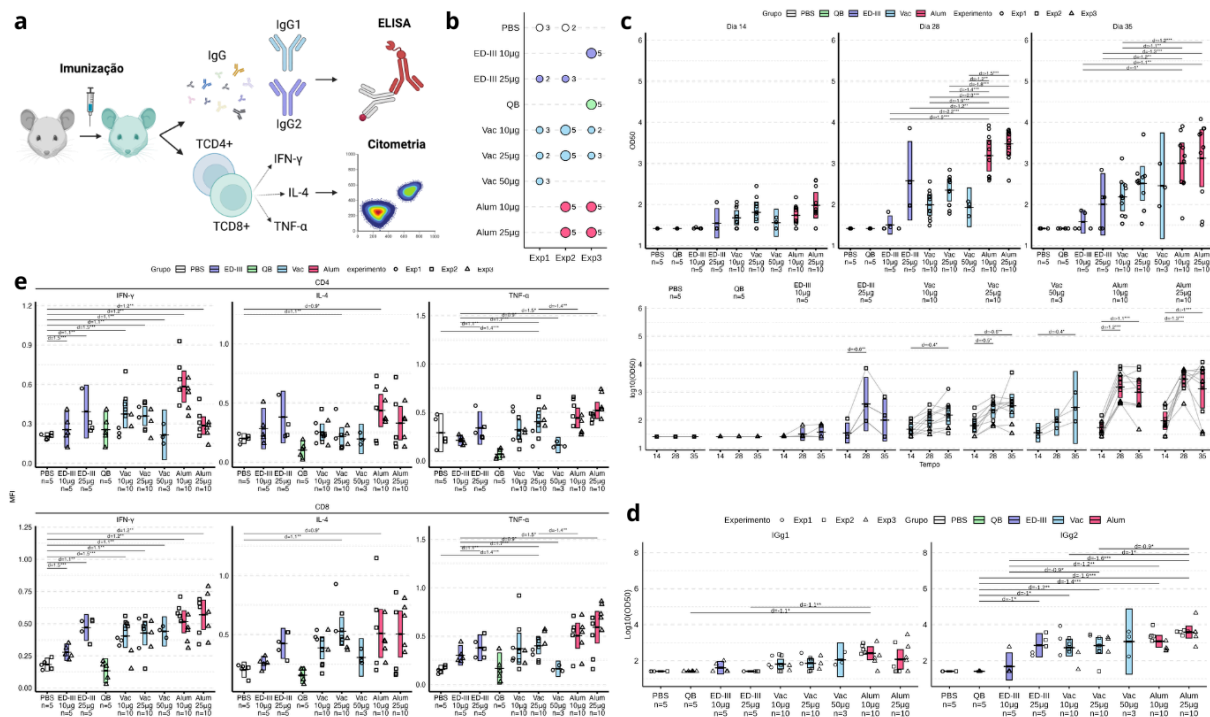
# Resumo

## Análises

- Este relatório detalha o desenvolvimento e a análise estatística de formulações vacinais baseadas no antígeno ED-III, utilizando partículas semelhantes a vírus (VLPs) e o adjuvante Alum.
- A metodologia empregada evoluiu de uma abordagem exploratória inicial para um delineamento robusto de medidas repetidas, com o processamento de dados realizado no ambiente R.
- Para garantir a validade das inferências, os dados brutos foram convertidos para o formato longo e as absorbâncias do ELISA passaram por transformação logarítmica.
- A normalidade e a homogeneidade das variâncias foram verificadas por meio de gráficos Q-Q e testes de Shapiro-Wilk e Levene, permitindo a aplicação de modelos lineares mistos e testes paramétricos sensíveis, como a ANOVA de Welch, que elevaram o poder estatístico das análises longitudinais.
- Os dados, gráficos e códigos estão disponíveis no repositório do Github: <https://github.com/wapsyed/collabs>.

## Resultados

- Os resultados de todos os experimentos, bem como o desenho e a amostragem experimental estão sumarizados na **Figura resumo**.



**Figura resumo. Desenho experimental e resultados.** a) Os camundongos foram imunizados em diferentes grupos e as amostras de sangue foram analisadas por ELISA para anticorpos totais (IgG) e depois separados em subtipos IgG1 e IgG2. Finalmente, as células TCD4+ e TCD8+ foram quantificadas e analisadas pela expressão das citocinas IFN-γ, IL-4, TNF-α. b) Amostragem dos grupos imunizados, por experimento. As cores correspondem aos grupos de imunização. O tamanho dos círculos correspondem ao tamanho das amostras. **Cinética da produção de IgG total (c) e anticorpos IgG específicos (d) medida por ELISA (OD50).** Os títulos de anticorpos foram avaliados em três pontos temporais distintos, compreendendo 14 dias após a primeira dose, seguidos por 14 (Dia 28) e 21 dias (Dia 35) após a administração da dose de reforço. Os animais foram imunizados com PBS (controle negativo), antígeno ED-III isolado em diferentes concentrações (10 ug e 25 ug ug) ou formulações contendo o adjuvante Alum (Alum 10 ug e Alum 25 ug). Os resultados estão apresentados em escala logarítmica no eixo Y, onde os box plots representam a média (linha preta horizontal) e os os intervalos de confiança de 95% extremos das caixas, e círculos sobrepostos indicando os valores individuais de cada amostra. As comparações estatísticas foram realizadas entre os grupos dentro de cada dia (c) e longitudinalmente entre os dias para cada grupo (d). **Perfil de expressão de citocinas em linfócitos TCD4+ e TCD8+ (e).** Os gráficos de box-plot apresentam a Intensidade Média de Fluorescência (MFI) para as citocinas IFN-g, IL-4 e TNF-α. Os dados estão estratificados por grupos experimentais e respectivos regimes de dosagem. As linhas pretas espessas no interior dos boxes representam a média aritmética da distribuição. A análise estatística foi realizada por meio da aplicação de modelos lineares mistos considerando o lote experimental, seguido pelo ajuste do p-valor pelo método de Tukey. Os valores do tamanho de efeito (d) são indicados com as diferenças estatisticamente significativas, indicadas por: \*  $p < 0,10$ ; \*\*  $p < 0,05$ ; e \*\*\*  $p < 0,01$ .

# Metodologia

Os dados brutos foram convertidos do formato largo para o longo para viabilizar a análise por grupos e marcadores. A manipulação de dados e a análise estatística foram realizadas no ambiente R, utilizando os pacotes tidyverse, rstatix, lme4 e emmeans. A padronização incluiu a limpeza de nomes e a organização hierárquica dos grupos de tratamento e doses. Para normalização da distribuição, os valores de absorbância (ELISA) foram transformados em escala logarítmica.

A normalidade foi verificada visualmente por gráficos Q-Q e confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk. Devido à detecção de heterocedasticidade pelo teste de Levene, aplicaram-se modelos lineares mistos (LMM) ajustando pelo lote experimental e, para a análise longitudinal (títulos de anticorpos por dose e dia), o modelo foi ajustado para medidas repetidas. As comparações múltiplas foram realizadas via médias marginais estimadas, com ajuste de p-valor pelo método de Tukey para controle da taxa de erro familiar. Nos gráficos dos experimentos anteriores a dezembro, foram utilizados boxplots box-and-whiskers convencionais, com os whiskers definidos como 1.5x o intervalo interquartis Q1-Q3. Nos experimentos de dezembro, os gráficos foram elaborados em boxplots representando o intervalo de 95% de confiança derivado de uma distribuição t, quando a maioria das distribuições dos grupos de testes seguiu uma tendência linear nas análises de Q-Q plots.

Os dados, gráficos e códigos estão disponíveis no repositório do Github: <https://github.com/wapsyed/collabs>.

# Resultados

## Preparação das tabelas

As tabelas estavam no formato do Graphpad Prisma, em uma formatação larga com os testes e grupos mesclados, o que dificulta a importação e processamento dos dados no R.

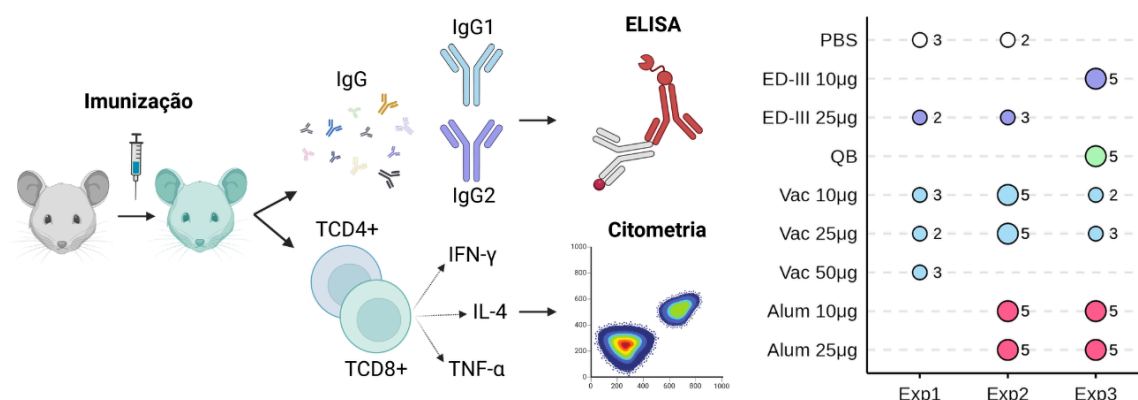
IGg1	PBS					Vacina 10 µg									
	25	25	25	25	25	58	42	193	25	200	226	58	25	28	55
	M.1	M.2	M.3	M.4	M.5	M.21	M.22	M.23	M.24	M.25	M.26	M.27	M.28	M.29	M.30
	Proteína ED-III 10 µg					Vacina 25 µg									
	25	25	65	25	100	69	271	142	25	119	27	39	69	33	190
	M.6	M.7	M.8	M.9	M.10	M.31	M.32	M.33	M.34	M.35	M.36	M.37	M.38	M.39	M.40
	Proteína ED-III 25 µg					Vacina Alum 10 µg									
	25	25	25	25	25	241	422	689	955	279	25	97	194	138	1194
	M.11	M.12	M.13	M.14	M.15	M.41	M.42	M.43	M.44	M.45	M.46	M.47	M.48	M.49	M.50
	QB					Vacina Alum 25 µg									
	25	25	25	25	25	25	1065	25	25	47	151	102	2787	598	25
	M.16	M.17	M.18	M.19	M.20	M.51	M.52	M.53	M.54	M.55	M.56	M.57	M.58	M.59	M.60

A tabela, então, foi adaptada ainda em formato largo para um formato compatível com o R, que finalmente foi pivotada para um formato longo,

	teste	PBS	PBS	PBS	ED-III 25 µg	ED-III 25 µg	ED-III 25 µg	ED-III 25 µg	ED-III 25 µg	ED-III 25 µg	ED-III 25 µg	ED-III 25 µg
Ex1	IGg1	25	25	25	25	25	58	42	193			
	IGg2	25	25	25	288	194						
	teste	PBS	PBS	ED-III 25 µg	ED-III 25 µg	ED-III 25 µg	ED-III 25 µg	ED-III 25 µg	ED-III 25 µg	ED-III 25 µg	ED-III 25 µg	ED-III 25 µg
Ex2	IGg1	25	25	25	25	25	25	119	27	39	69	
	IGg2	25	25	640	1437	3750	326	449	1741	330	861	
	teste	QB	QB	QB	QB	QB	ED-III 10 µg	ED-III 10 µg	ED-III 10 µg	ED-III 10 µg	ED-III 10 µg	ED-III 10 µg
Ex3	IGg1	25	25	25	25	25	25	25	65	25	100	
	IGg2	25	25	25	25	25	25	25	588	25	25	

# Amostragem

O desenho experimental do estudo foi ilustrado no Biorender (**Figura 1a**) e as tabelas foram utilizadas para calcular o número de animais por condição de imunização e discriminar por lote experimental (**Figura 1b**).

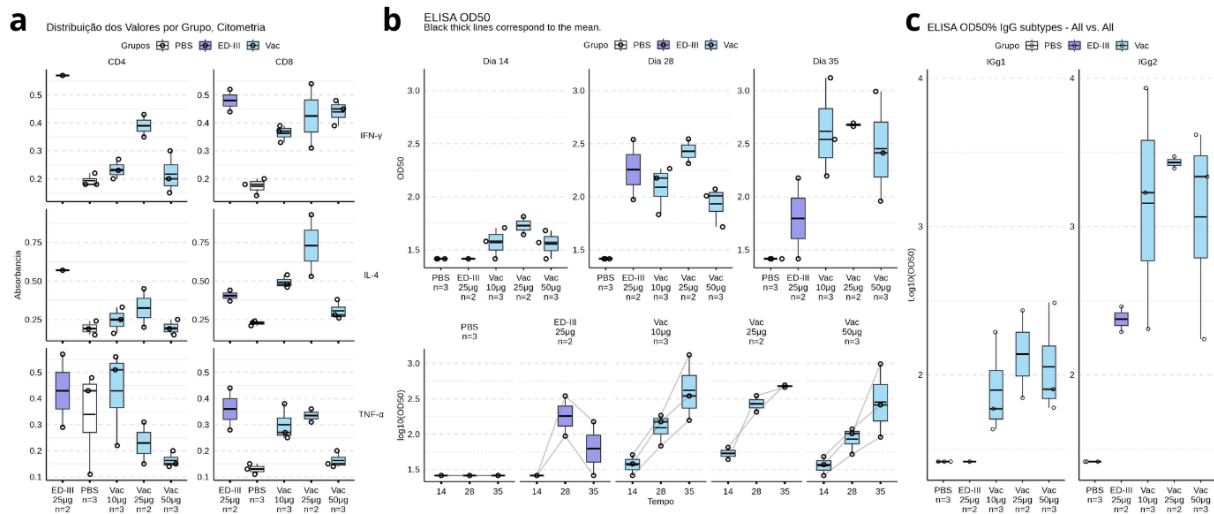


**Figura 1.** a) Os camundongos foram imunizados em diferentes grupos e as amostras de sangue foram analisadas por ELISA para anticorpos totais (IgG) e depois separados em subtipos IgG1 e IgG2. Finalmente, as células TCD4+ e TCD8+ foram quantificadas e analisadas pela expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, TNF- $\alpha$ . b) Amostragem dos grupos imunizados, por experimento. As cores correspondem aos grupos de imunização. O tamanho dos círculos correspondem ao tamanho das amostras.

## Experimento 1

Considerando o caráter exploratório, piloto do experimento 1, optou-se por não realizar testes de hipóteses formais devido ao reduzido tamanho amostral (n baixo), o que limitaria o poder estatístico e a confiabilidade das inferências (**Figura 2**). No entanto, a apresentação dos dados via boxplots foi mantida para demonstrar comportamento preliminar dos grupos frente à imunização, servindo como base para a seleção das melhores estratégias vacinais. Com base nessas observações iniciais, o delineamento experimental foi refinado para o Experimento 2, onde o grupo de 50ug foi descontinuado em favor da inclusão do

grupo adjuvado com Alum e de um aumento no número de animais por grupo. Posteriormente, um terceiro experimento foi conduzido para ampliar ainda mais o n amostral, garantindo o rigor e o poder estatístico necessários para as análises comparativas finais após a consolidação dos dados.

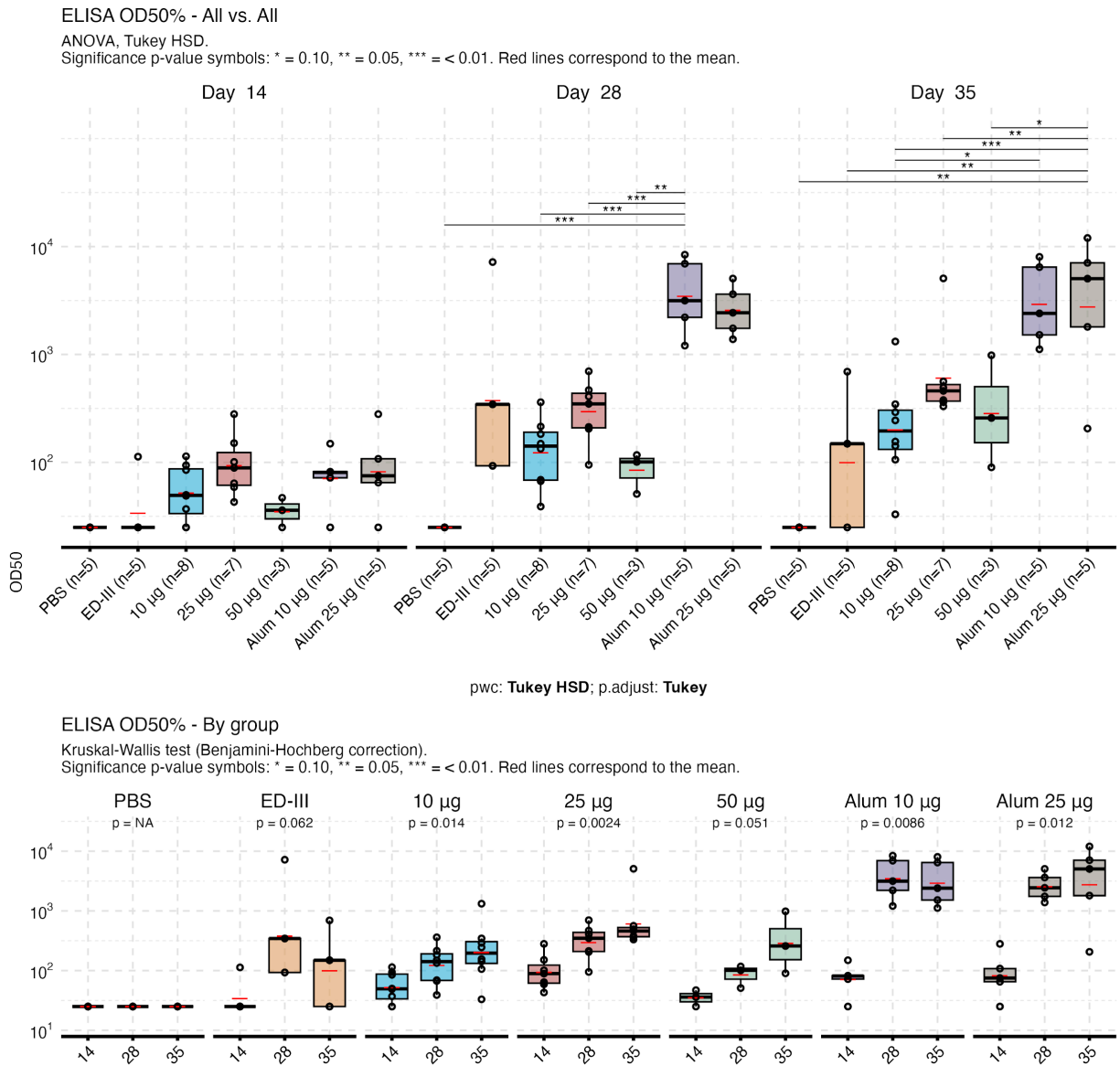


**Figura 2. Perfil de expressão de citocinas e cinética da produção de IgG total e subclasses medida por ELISA (OD50).** a) Os gráficos de box-plot apresentam a Intensidade Média de Fluorescência (MFI) para as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e TNF- $\alpha$ . Os dados estão estratificados por grupos experimentais e respectivos regimes de dosagem. As linhas pretas espessas no interior dos boxes representam a média aritmética da distribuição. b) Os títulos de anticorpos foram avaliados em três pontos temporais distintos, compreendendo 14 dias após a primeira dose (Dia 14), seguidos por 14 (Dia 28) e 21 dias (Dia 35) após a administração da dose de reforço. Os animais foram imunizados com PBS (controle negativo), antígeno ED-III isolado em diferentes concentrações (10  $\mu$ g, 25  $\mu$ g e 50  $\mu$ g) ou formulações contendo o adjuvante Alum (Alum 10  $\mu$ g e Alum 25  $\mu$ g). Os resultados estão apresentados em escala logarítmica no eixo Y, onde os box plots indicam a mediana (linha preta horizontal) e a média (linha preta espessa), com os bigodes representando a variabilidade dos dados e círculos sobrepostos indicando os valores individuais de cada amostra. c) Os animais foram imunizados com PBS (controle negativo), antígeno ED-III isolado em diferentes concentrações (10  $\mu$ g e 25  $\mu$ g) ou formulações contendo o adjuvante Alum (Alum 10  $\mu$ g e Alum 25  $\mu$ g). Os resultados estão apresentados em escala logarítmica no eixo Y, onde os box plots representam a média (linha preta horizontal) e os intervalos de confiança de 95% extremos das caixas, e círculos sobrepostos indicando os valores individuais de cada amostra.

## Experimentos 1 e 2

Os resultados indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos dias 14 e 35 (**Figura 3**). No entanto, no dia 28, foram observadas diferenças estatísticas relevantes entre os grupos controle e as formulações contendo VLPs + EDIII, bem como entre os grupos com e sem Alum. Esses achados sugerem que as formulações sem alum são similares entre si, enquanto as formulações contendo VLP + EDIII (10 µg, 25 µg e 50 µg) apresentam respostas equivalentes à proteína EDIII isolada (25 µg). Dessa forma, 10 µg de EDIII + VLP mostram-se tão antigênicos quanto a proteína isolada, sem que concentrações maiores ofereçam vantagens, considerando o custo de produção da proteína e a possível toxicidade em animais. Assim, o foco deve ser direcionado às formulações com 10 µg de EDIII, que apresentam menor custo e boa resposta imunogênica, além de reduzir o número de grupos e animais.





**Figura 3. Cinética da produção de IgG total medida por ELISA (OD50), comparados entre grupos por dia e entre dias por grupo.** Os títulos de anticorpos foram avaliados em três pontos temporais distintos, compreendendo 14 dias após a primeira dose (Dia 14), seguidos por 14 (Dia 28) e 21 dias (Dia 35) após a administração da dose de reforço. Os animais foram imunizados com PBS (controle negativo), antígeno ED-III isolado em diferentes concentrações (10 µg, 25 µg e 50 µg) ou formulações contendo o adjuvante Alum (Alum 10 µg e Alum 25 µg). Os resultados estão apresentados em escala logarítmica no eixo Y, onde os box plots indicam a mediana (linha preta horizontal) e a média (linha vermelha), com os bigodes representando a variabilidade dos dados e círculos sobrepostos indicando os valores individuais de cada amostra. As diferenças estatisticamente significativas, são indicadas pelos símbolos: \*  $p < 0,10$ , \*\*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,01$ .

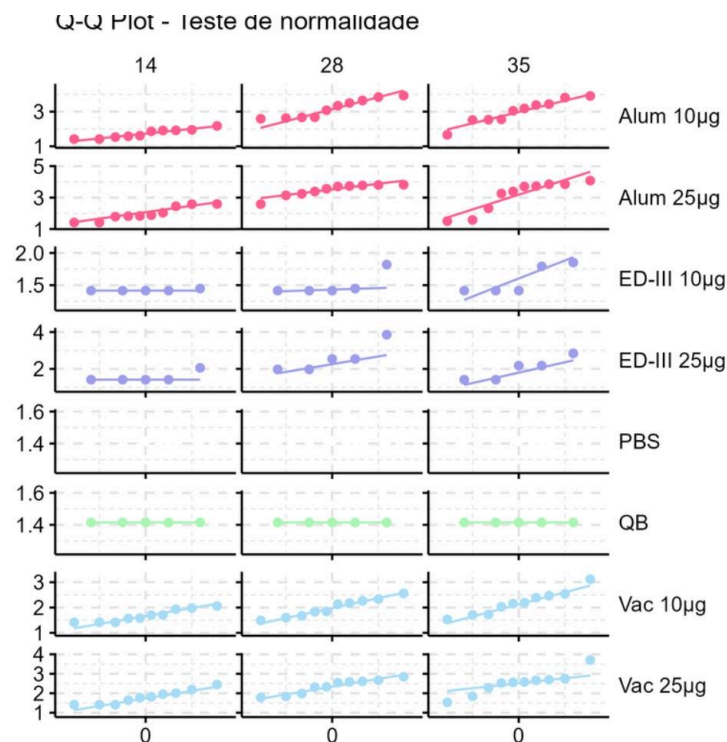
## Discussões pertinentes com o orientador

- Discutir por que repetir experimentos, em blocos, com os mesmos grupos é vantajoso em relação ao rigor experimental e ao risco de erros devido ao cansaço e alta demanda laboral.
- Este trabalho caracteriza-se como um estudo exploratório piloto, e não um estudo pré-clínico confirmatório. Os dados obtidos (médias e variâncias) servem como base para o cálculo do poder estatístico, permitindo o dimensionamento de experimentos futuros. O objetivo é determinar um tamanho amostral que assegure rigor estatístico, com um alfa de 0,05 e um poder de 0,80, para detectar diferenças biologicamente relevantes entre os grupos de maior interesse.
- **Recomendação para o próximo experimento.**
  - Adicione um número mínimo de animais a cada grupo para aumentar o poder estatístico. Adicione as seguintes quantidades de animais para completar as amostras com 10 animais cada. Considere a viabilidade e a relevância experimental e biológica de incluir ou excluir grupos.
    - EDIII 10ug: 5 animais
    - Qb 10ug: 5 animais
    - Alum (ctrl neg.): Não fazer (qnt. proteína indisponível e animais)
    - Qb-EDIII 10ug: +2
    - Qb-EDIII 25ug: +3
    - Alum Qb-EDIII 10ug: +5
    - Alum Qb-EDIII 25ug: +5

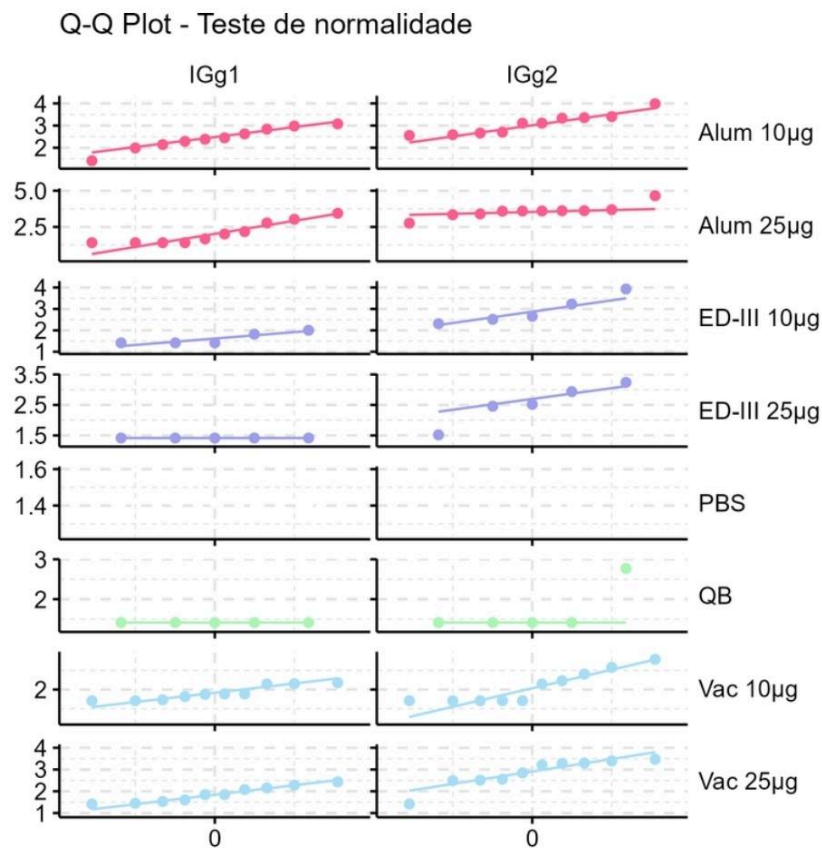
# Experimentos de Dezembro de 2025

## Validação Estatística e Normalidade

Antes das análises comparativas, a distribuição dos dados foi verificada através de gráficos Quantil-Quantil (Q-Q Plot) (Figuras 4-6). A distribuição dos quantis observados para IgG total (Figura 4) e subtipos (IgG1/IgG2) (Figura 5) seguiu a linha teórica esperada na escala logarítmica, validando o uso de testes paramétricos após a transformação dos dados

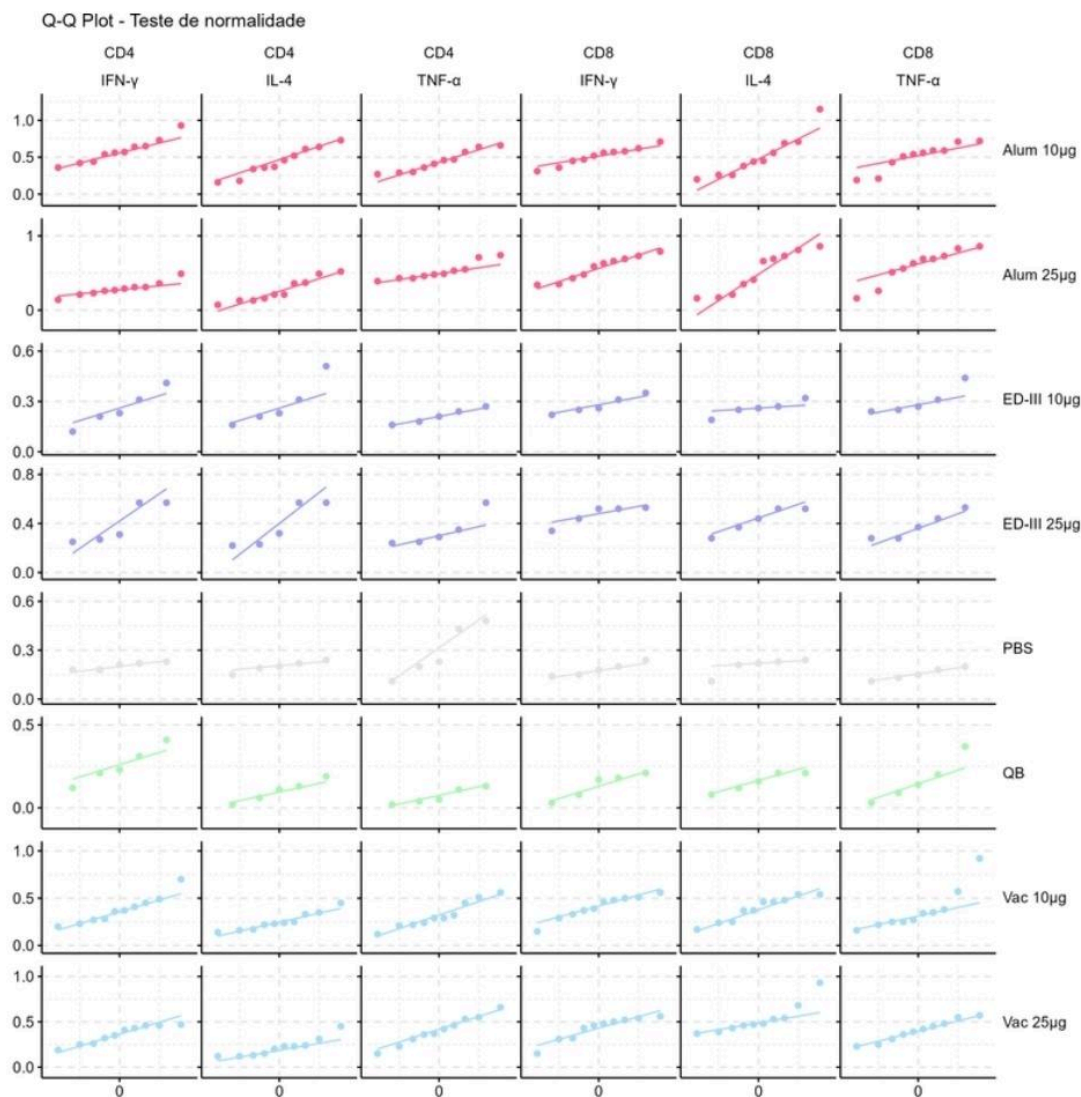


**Figura 4. Avaliação da normalidade das respostas de citocinas via gráficos Quantil-Quantil (Q-Q).** A matriz correlaciona a distribuição de MFI de citocinas (IFN-g, IL-4 e TNF-a) em linfócitos T CD4+ e CD8+ para os diferentes grupos experimentais (PBS, Alum, ED-III e Vacina). Os pontos representam os quantis observados nos dados amostrais, enquanto a linha diagonal contínua indica a distribuição normal teórica esperada. Desvios sistemáticos dos pontos em relação à reta sugerem distribuições não paramétricas ou presença de outliers em condições específicas de estimulação e dosagem.



**Figura 5. Avaliação da normalidade dos títulos de anticorpos específicos com gráficos Quantil-Quantil (Q-Q).** A matriz correlaciona a distribuição de anticorpos IgG1 e IgG2, em escala logarítmica, para os diferentes grupos experimentais (PBS, QB, Alum, ED-III e Vacina). Os pontos representam os quantis observados nos dados amostrais, enquanto a linha diagonal contínua indica a distribuição normal teórica esperada. Desvios sistemáticos dos pontos em relação à reta sugerem distribuições não paramétricas ou presença de outliers em condições específicas de estimulação e dosagem.

Na **citometria**, a análise de normalidade da Intensidade Média de Fluorescência (MFI) para citocinas em linfócitos T CD4+ e CD8+ revelou desvios pontuais da reta diagonal, sugerindo a presença de outliers ou distribuições não paramétricas em condições específicas de dosagem (**Figura 6**).



**Figura 6. Avaliação da normalidade das respostas de citocinas via gráficos Quantil-Quantil (Q-Q).** A matriz correlaciona a distribuição de MFI de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-4 e TNF- $\alpha$ ) em linfócitos T CD4 $^{+}$  e CD8 $^{+}$  para os diferentes grupos experimentais (PBS, Alum, ED-III e Vacina). Os pontos representam os quantis observados nos dados amostrais, enquanto a linha diagonal contínua indica a distribuição normal teórica esperada. Desvios sistemáticos dos pontos em relação à reta sugerem distribuições não paramétricas ou presença de outliers em condições específicas de estimulação e dosagem.

## Teste de diferenças

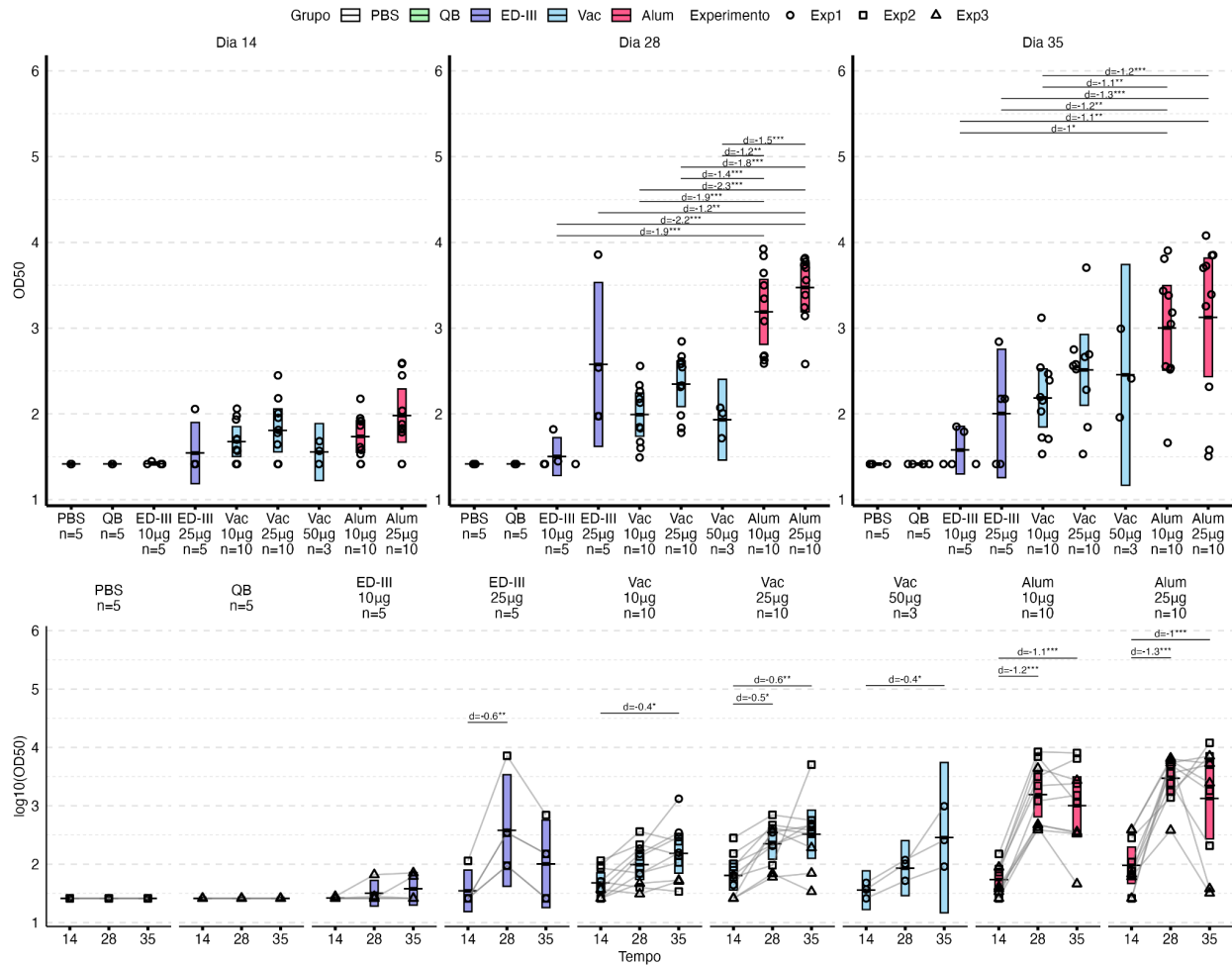
Nas análises dos experimentos anteriores, a aplicação de testes não paramétricos para avaliações longitudinais comprometeu o poder estatístico, limitando a detecção de diferenças sutis entre os grupos. Com o aumento do tamanho amostral nos experimentos subsequentes, observou-se que as distribuições convergiram para a normalidade, conforme validado por gráficos Q-Q e pelo teste de Shapiro-Wilk. Essa adequação permitiu a transição para métodos paramétricos mais sensíveis, como modelos lineares de efeitos mistos. A utilização de testes paramétricos, tanto para medidas independentes quanto para medidas repetidas, elevou o poder estatístico do estudo, permitindo a identificação de diferenças entre as formulações e cinéticas vacinais que não eram detectáveis em amostras reduzidas.

A cinética de produção de IgG total foi monitorada nos dias 14, 28 e 35 (**Figura 7**). No dia 14, observou-se uma resposta inicial discreta, com as formulações vacinais (Vac 10 µg e 25 µg) e os grupos com adjuvante Alum apresentando níveis superiores aos controles PBS e QB. Nos dias 28 e 35, houve um aumento substancial nos títulos de anticorpos. No Dia 28, as diferenças foram estatisticamente significativas entre os grupos controle e as formulações contendo VLPs+EDIII (Vac), bem como para os grupos com Alum. As respostas obtidas com 10 µg de Vac foram equivalentes às de 25 µg, indicando que o aumento da concentração protéica não resultou em ganho estatístico de imunogenicidade.

Fig. 4. 2550 no modelo linear misto, ajustado por efeito do lote de experimento, com o método de tukey para correção de p-valores. Significance p-value symbols: \* = 0.10, \*\* = 0.05, \*\*\* = < 0.01. Black thick lines correspond to the mean.

Significance p-value symbols: \* = 0.10, \*\* = 0.05, \*\*\* = < 0.01.

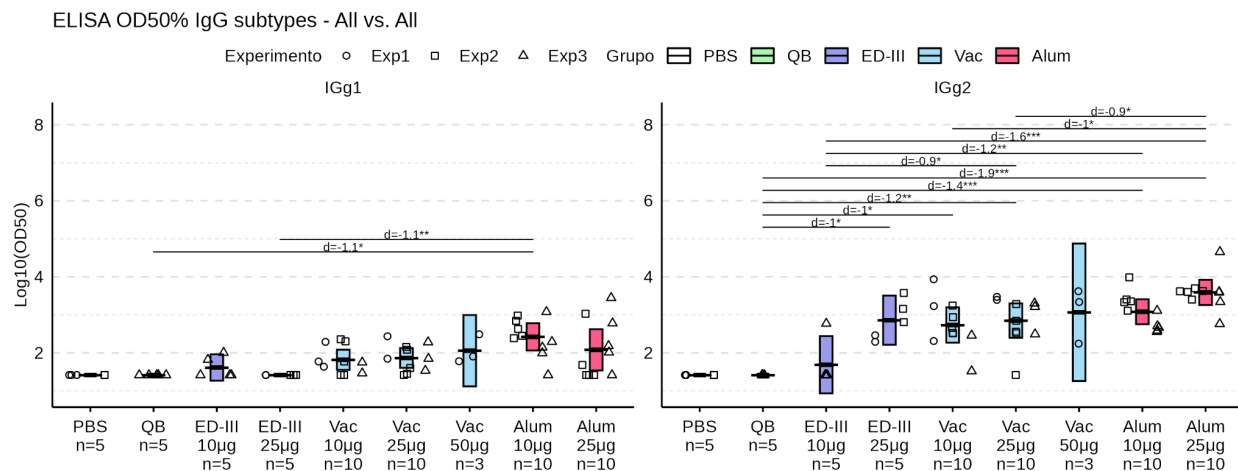
Black thick lines correspond to the mean.



**Figura 7. Cinética da produção de IgG total (a) e anticorpos IgG específicos (b) medida por ELISA (OD50).** Os títulos de anticorpos foram avaliados em três pontos temporais distintos, compreendendo 14 dias após a primeira dose, seguidos por 14 (Dia 28) e 21 dias (Dia 35) após a administração da dose de reforço. Os animais foram imunizados com PBS (controle negativo), antígeno ED-III isolado em diferentes concentrações (10 ug e 25 ug ug) ou formulações contendo o adjuvante Alum (Alum 10 ug e Alum 25 ug). Os resultados estão apresentados em escala logarítmica no eixo Y, onde os box plots representam a média (linha preta horizontal) e os os intervalos de confiança de 95% extremos das caixas, e círculos sobrepostos indicando os valores individuais de cada amostra. As comparações estatísticas foram realizadas entre os grupos dentro de cada dia (a) e longitudinalmente entre os dias para cada grupo (b). Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por: \*  $p < 0,10$ ; \*\*  $p < 0,05$ ; e \*\*\*  $p < 0,01$ .

A análise detalhada dos subtipos de IgG permitiu caracterizar o perfil da resposta imune (**Figura 8**). Na subtipagem de **IgG1**, as formulações vacinais e os grupos Alum (10 µg e 25 µg) induziram títulos significativamente elevados de IgG1 em comparação aos grupos PBS e ED-III isolado ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ). Observou-se

um perfil similar quanto ao **IgG2**, com destaque para a formulação Alum 25 µg, que apresentou a maior média de títulos entre todos os grupos testados para este subtipo.



**Figura 8. Perfil da produção de IgG específicos medida por ELISA (OD50).** Os animais foram imunizados com PBS (controle negativo), antígeno ED-III isolado em diferentes concentrações (10 ug w 25 ug) ou formulações contendo o adjuvante Alum (Alum 10 ug e Alum 25 ug). Os resultados estão apresentados em escala logarítmica no eixo Y, onde os box plots representam a média (linha preta horizontal) e os intervalos de confiança de 95% extremos das caixas, e círculos sobrepostos indicando os valores individuais de cada amostra. As diferenças estatisticamente significativas são indicadas pelos símbolos: \*  $p < 0,10$ , \*\*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,01$ .

A análise de citometria de fluxo quantificou a produção de citocinas pró-inflamatórias e efetoras. Nas populações de **Linfócitos T CD4+**, o grupo Alum 10 µg e as formulações Vac apresentaram aumentos significativos na MFI de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em relação ao controle PBS ( $p < 0,01$ ) (**Figura 9**). Quanto à população de **Linfócitos T CD8+**, observou-se uma indução robusta de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos grupos vacinados e com adjuvante. O teste de Welch's ANOVA confirmou que as médias de MFI para esses marcadores foram estatisticamente superiores às dos grupos QB e PBS. Além disso, a expressão de IL-4 em células CD4+ e CD8+ também foi significativamente maior nos grupos Alum e Vac, sugerindo uma resposta imune equilibrada.

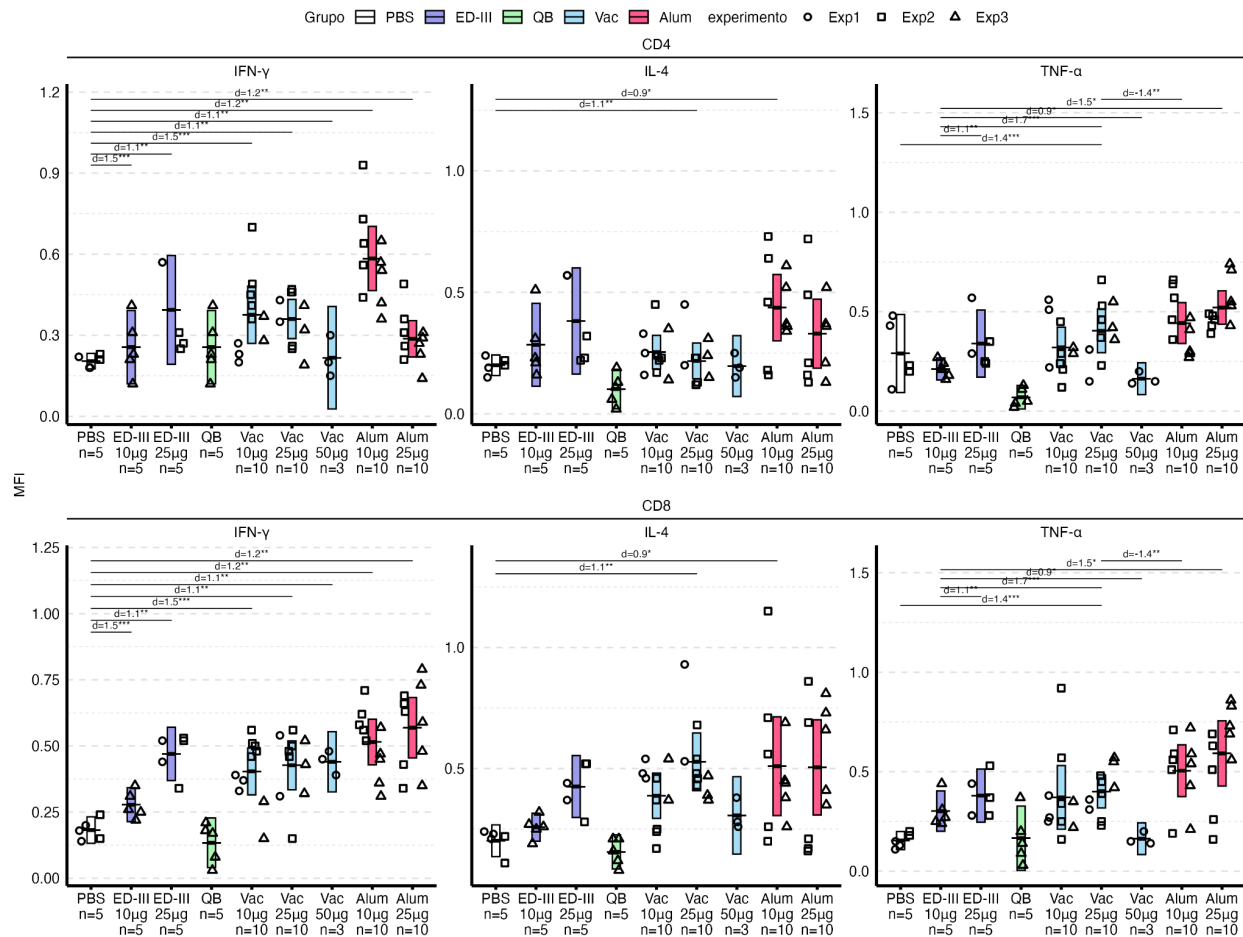


# Citometria - All vs. All

ANOVA baseado no modelo linear misto, ajustado por efeito do lote de experimento, com o método de tukey para correção de p-valores.

Significance p-value symbols: \* = 0.10, \*\* = 0.05, \*\*\* = < 0.01.

Black thick lines correspond to the mean.



**Figura 9. Perfil de expressão de citocinas em linfócitos TCD4+ e TCD8+.** Os gráficos de box-plot apresentam a Intensidade Média de Fluorescência (MFI) para as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e TNF- $\alpha$ . Os dados estão estratificados por grupos experimentais e respectivos regimes de dosagem. As linhas pretas espessas no interior dos boxes representam a média aritmética da distribuição. A análise estatística foi realizada por meio do teste Welch's ANOVA, seguido pelo teste post-hoc de Games-Howell para comparações múltiplas, no qual os símbolos indicam os níveis de significância: \*p = 0,10; \*\*p = 0,05 e \*\*\*p < 0,01.

# Sugestões para reflexão sobre os resultados obtidos

- Os grupos que tiveram ou não diferença estatisticamente significativa corrobora com as suas **hipóteses**?
- A diferença ou não-diferença estatística é **relevante** entre os grupos?
- O grupo contra o qual você **comparou** é relevante ou não? Ex.: Imunógeno A vs. PBS, Imunógeno A vs Imunógeno B, Imunógeno A 10ug vs. Imunógeno A 25 ug.
- Qual a conclusão que você chega ao saber que uma **concentração maior** de imunógeno não aumenta ou mesmo diminui a resposta?
- A significância estatística ( $p < 0,05$ ) indica que a diferença provavelmente não é ao acaso, mas o **tamanho do efeito** diz o quão "forte" é essa resposta. Apesar da significância estatística, o **tamanho do efeito** observado é suficiente para garantir uma proteção vacinal robusta? Como a magnitude dessa diferença impactaria o desfecho clínico?
- Considerando a utilização de **animais isogênicos (variância baixa)**, como você projeta que a variabilidade genética humana impactaria o poder estatístico e a eficácia da vacina em ensaios clínicos?
- O que a **dispersão/variância** dos dados descreve como o seu experimento foi realizado? Você acha que essa dispersão é devido a variáveis **técnicas** (aplicação da vacina, manejo dos animais etc.), de **lote** de experimentos, ou **biológicas** (efeito do imunógeno)?
- O que você conclui quando a **dispersão** dos dados é igual entre os grupos (homoscedacidade)? E quando é diferente (heteroscedasticidade)? Observe que as **dispersões dos grupos são diferentes nos testes realizados**. O que você conclui sobre isso?
- Você acha que o terceiro experimento pode ter inserido **variabilidade de lote** em relação aos experimentos anteriores?

- Sobre os outliers nos gráficos de Q-Q plot e nos boxplots, você acha que esses animais são **outliers biológicos legítimos**, por lote de **experimento**, ou por **erro técnico**? Será que esses **mesmos animais** são outliers em todos os testes?
- Quanto ao experimento ter sido feito em dias diferentes, em **três lotes**, você acha que isso impactou os seus dados? Talvez isso explicaria esses outliers?
- Você acha que o **número** de indivíduos por grupo e experimento deveria ser maior ou menor? Todos os grupos deveriam ter o **mesmo número**?
- Caso você tenha perdido um animal, você acha que no próximo experimento você deverá ter alguns a mais de **reserva**?
- A partir da descrição destes dados, você consegue concluir qual ou quais são as **formulações mais viáveis** de serem avaliadas em um teste pré-clínico?
- Agora que diferenças estatisticamente significantes foram encontradas em comparações feitas nos experimentos anteriores, o que você conclui sobre o **tamanho amostral**? O que acontece se você adicionar mais animais para cada grupo? O **p-valor** seria ainda menor? Existem grupos, como os grupos controle QB, PBS e ED-III, que não precisariam ter mais animais?
- Com base na **variância, média e tamanho do efeito** dos grupos em todos esses testes e experimentos, você acha que é possível **calcular uma amostra de indivíduos** dessa formulação de forma racional, com poder estatístico (80%) e um nível de significância estatística (5%) definidos?
- Você acredita que os primeiros experimentos deveriam ter definido um **n amostral** antes de serem realizados? Eles deveriam ser maiores ou menores? Você já esperava algum desses resultados com base em experimentos anteriores descritos na literatura ou foram resultados totalmente novos?
- Qual dos marcadores e testes são mais importantes para você afirmar que sua formulação funciona?

## Para os próximos experimentos

- Ao fazer novos lotes de experimentos, reporte mais dados sobre o experimento e os animais, como o identificador do experimento e algumas características dos animais que você acha peculiares e que podem explicar comportamentos diferentes na resposta aos testes feitos.
- O tamanho amostral para o estudo confirmatório será determinado através de uma análise de poder a priori, utilizando as médias e variâncias obtidas nos ensaios pilotos. Para garantir a robustez de todos os parâmetros imunológicos avaliados, o cálculo foi realizado de forma independente para cada desfecho primário e secundário. Embora os títulos de anticorpos (ELISA) apresentassem um tamanho de efeito elevado, exigindo um  $n$  menor, os ensaios de citometria de fluxo para citocinas intracelulares (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) revelaram uma maior dispersão característica. Portanto, visando evitar o erro tipo II (falso-negativo) e assegurar um poder estatístico global de 80%, com um nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), optou-se pela seleção do maior tamanho amostral calculado entre as variáveis essenciais. Este delineamento permitirá a detecção de diferenças biologicamente relevantes em todos os marcadores celulares e humorais, respeitando o princípio da redução dos 3Rs ao evitar a necessidade de repetições experimentais por falta de poder estatístico.