

## **Estudo longitudinal de ganhos de peso de ratas no período de gestação: avaliação da toxicidade de um produto químico**

**Luzia Pedroso de Oliveira<sup>1</sup>, César Gonçalves de Lima<sup>2</sup>, Vera Lúcia Scherholz S. de Castro<sup>3</sup>,  
Aline de Holanda Nunes Maia<sup>4</sup>**

### **1. Introdução**

Para avaliar a segurança de um produto químico para a saúde são necessários testes toxicológicos, realizados na maioria das vezes com ratos. Nos testes para avaliar a toxicidade do produto no desenvolvimento pré-natal as ratas são expostas a substância diariamente via oral ao longo da gestação e são avaliados os efeitos nas ratas e nos filhotes. Embora nestes testes sejam observados os pesos diários das ratas durante o período gestacional, é comum encontrar nas revistas na área de toxicologia análises estatísticas univariadas bastante simplificadas que não levam em conta a correlação entre as observações no mesmo animal e a variância não constante.

O modelo para dados longitudinais possibilita avaliar as mudanças ao longo do tempo associadas aos fatores em estudo e levam em conta toda a informação contida nos dados. Quando a estrutura de dependência não é considerada as inferências nem sempre são válidas. Em se tratando de dados longitudinais, o modelo estatístico deve descrever apropriadamente os perfis médios levando-se em conta a variabilidade e as correções entre as respostas observadas na mesma unidade experimental.

Neste trabalho analisou-se os ganhos de pesos diários de ratas expostas a um nanocomposto usado em revestimentos para conservação de alimentos. As mudanças ao longo do tempo foram descritas usando regressão quadrática por partes com pontos de mudança fixados. Essa abordagem mostra-se bastante flexível para acomodar tendências não lineares com crescimentos mais rápidos em determinados períodos, como é o caso dos ganhos de pesos das ratas que são mais acelerados no final da gestação. Foram considerados efeitos aleatórios e algumas estruturas para a matriz de covariâncias dos erros para explicar a variância não constante ao longo do tempo e as correlações na mesma rata.

### **2. Material e métodos**

Os dados utilizados são de um experimento conduzido no laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança da EMBRAPA Meio Ambiente. A dose do nanocomposto administrada diariamente, via oral, ao longo do período de gestação foi 150µg/kg. Foram utilizadas 10 ratas Wistar nulíparas para cada grupo: controle e tratado. O dia em que se encontrou um rolhão vaginal ou espermatozoides no esfregaço vaginal, foi considerado 1º dia de gestação. As ratas foram alojadas em gaiolas separadas, examinadas e pesadas individualmente e diariamente a partir do 1º dia de gestação até o parto.

Os dados analisados foram as diferenças entre os pesos diários observados ao longo da gestação com relação aos pesos das ratas no início do experimento (incrementos em gramas com relação ao peso inicial). Foram considerados apenas os 20 primeiros dias de gestação ainda que

---

<sup>1</sup> ICT- UNIFESP. email: [luzia.oliveira@unifesp.br](mailto:luzia.oliveira@unifesp.br).

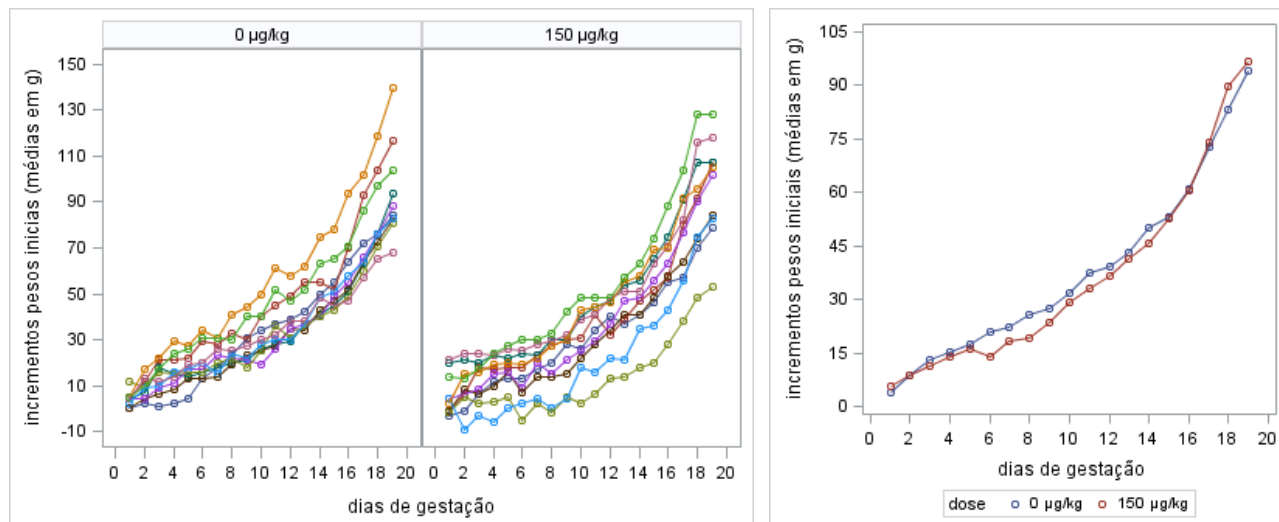
<sup>2</sup> ZAB - FZEA/USP. email: [cegdlima@usp.br](mailto:cegdlima@usp.br).

<sup>3</sup> Embrapa Meio Ambiente. email: [vera-lucia.castro@embrapa.br](mailto:vera-lucia.castro@embrapa.br).

<sup>4</sup> Embrapa Meio Ambiente. email: [aline.maia@embrapa.br](mailto:aline.maia@embrapa.br).

algumas ratas tenham atingido até 22 dias, evitando-se assim, que alguma rata pudesse ser pesada após a ruptura da placenta. Dessa forma, o experimento foi considerado balanceado com relação ao tempo.

A Figura 1 apresenta os perfis médios (a) e individuais por dose (b) das diferenças entre os pesos observados diariamente ao longo da gestação com relação aos pesos iniciais das ratas.



Fonte: elaborado pela autora

Fonte: elaborado pela autora

(a) Perfis individuais por dose

(b) Perfis médios por dose

Figura 1. Incrementos diários (g) com relação aos pesos iniciais das ratas.

As respostas médias ao longo do tempo foram descritas usando regressão quadrática por partes (piecewise regression), com pontos de mudança fixados. Foram ajustados modelos considerando dois e três pontos de mudança, fixados no início da 2ª e da 3ª semanas de gestação ou em intervalos de 5 dias.

O perfil médio na população no caso de subintervalos semanais é apresentado em (1) e no caso dos subintervalos de 5 dias é apresentado em (2).

$$E(Y_{ij}) = \beta_{01}D_{0i} + \beta_{02}D_{1i} + (\beta_{11}D_{0i} + \beta_{12}D_{1i}) \times t_{ij} + (\beta_{21}D_{0i} + \beta_{22}D_{1i}) \times t_{ij}^2 + \\ + (\beta_{31}D_{0i} + \beta_{32}D_{1i}) \times (t_{ij} - 6)_+ + (\beta_{41}D_{0i} + \beta_{42}D_{1i}) \times (t_{ij} - 6)_+^2 + \\ + (\beta_{51}D_{0i} + \beta_{52}D_{1i}) \times (t_{ij} - 13)_+ + (\beta_{61}D_{0i} + \beta_{62}D_{1i}) \times (t_{ij} - 13)_+^2. \quad (1)$$

$$E(Y_{ij}) = \beta_{01}D_{0i} + \beta_{02}D_{1i} + (\beta_{11}D_{0i} + \beta_{12}D_{1i}) \times t_{ij} + (\beta_{21}D_{0i} + \beta_{22}D_{1i}) \times t_{ij}^2 + \\ + (\beta_{31}D_{0i} + \beta_{32}D_{1i}) \times (t_{ij} - 5)_+ + (\beta_{41}D_{0i} + \beta_{42}D_{1i}) \times (t_{ij} - 5)_+^2 + \\ + (\beta_{51}D_{0i} + \beta_{52}D_{1i}) \times (t_{ij} - 10)_+ + (\beta_{61}D_{0i} + \beta_{62}D_{1i}) \times (t_{ij} - 10)_+^2 + \\ + (\beta_{71}D_{0i} + \beta_{72}D_{1i}) \times (t_{ij} - 15)_+ + (\beta_{81}D_{0i} + \beta_{82}D_{1i}) \times (t_{ij} - 15)_+^2. \quad (2)$$

A resposta  $Y_{ij}$  corresponde à diferença entre o peso da rata  $i$  no  $j$ -ésimo dia de gestação e o peso da rata  $i$  no início do experimento;  $D_{0i}$  e  $D_{1i}$  são variáveis indicadoras que assumem o valor 1

se a rata  $i$  é do grupo controle ou recebeu a dose  $150\mu\text{g/kg}$ , respectivamente, e 0 caso contrário. A variável longitudinal (dia) foi considerada contínua e centrada em 1, sendo  $t_{ij} = (\text{dia} - 1)$ , de modo que o intercepto da curva média ajustada corresponde ao ganho médio esperado de peso do grupo de ratas no 1º dia da gestação. As mudanças nas tendências são consideradas a partir das funções truncadas  $(t_{ij} - a)_+$  e  $(t_{ij} - a)_+^2$  que assumem, respectivamente, os valores  $(t_{ij} - a)$  e  $(t_{ij} - a)^2$  se  $t_{ij} > a$  e 0 caso contrário, sendo  $a$  cada ponto fixado.

Assumiu-se normalidade multivariada para os vetores de efeitos aleatórios e de erros. A grande vantagem dessas suposições é a correspondência entre os parâmetros dos modelos condicionais e marginais, de forma que as hipóteses de interesse (com relação aos parâmetros que definem os perfis médios populacionais) podem ser testadas a partir dos modelos condicionais.

O modelo condicional com parte fixa especificada em (1) e efeitos aleatórios no intercepto ( $b_{0i}$ ), nos coeficientes linear ( $b_{1i}$ ) e quadrático ( $b_{2i}$ ) e nos respectivos incrementos nos coeficientes lineares e quadráticos após o 6º e 13º dias de gestação ( $b_{3i}$ ,  $b_{4i}$ ,  $b_{5i}$  e  $b_{6i}$ ) é especificado em (3):

$$Y_{ij}|_{\sim}^{b_i} = \text{parte fixa em (1)} + b_{0i} + b_{1i}t_{ij} + b_{2i}t_{ij}^2 + b_{3i}(t_{ij} - 6)_+ + b_{4i}(t_{ij} - 6)_+^2 + b_{5i}(t_{ij} - 13)_+ + b_{6i}(t_{ij} - 13)_+^2 + \varepsilon_{ij} \quad (3)$$

As suposições assumidas com relação aos efeitos aleatórios foram independência entre  $b_i$  e  $b_{i'}$  para

$i \neq i'$  e normalidade:  $b_i = (b_{0i}, b_{1i}, b_{2i}, b_{3i}, b_{4i}) \sim N(\vec{0}, G)$ , sendo  $G (7 \times 7)$  a matriz de variâncias e covariâncias populacionais dos efeitos aleatórios. Nos modelos condicionais assumiu-se normalidade para o vetor de erros aleatórios associados a  $Y_{ij}$ , ou seja,  $\varepsilon_i = (\varepsilon_{0i}, \varepsilon_{1i}, \dots, \varepsilon_{18i}) \sim N(\vec{0}, R_i)$  e uma estrutura para a matriz  $R_i (18 \times 18)$ . Considerou-se  $G$  não estruturada (UN).

O modelo condicional com parte fixa em (2) é especificado de maneira análoga a (3).

Os modelos foram comparados por meio de critérios de informação AIC e BIC (WEST; WELCH; GALECKI, 2007) e análise de resíduos marginais e/ou condicionais. De acordo com esses critérios de informação, quanto menores os valores de AIC e/ou BIC melhor o ajuste.

As hipóteses científicas de interesse foram formuladas e testadas a partir do modelo com melhor ajuste. No caso do modelo com parte fixa especificada em (1), para avaliar o efeito da dose do nanocomposto no intercepto, componentes linear e quadrático e nos respectivos incrementos após o 6º e 13º dias de gestação são testadas as hipóteses:  $H_{01i}: \beta_{i1} = \beta_{i2}$  para  $i = 1, 2, \dots, 8$ . A significância dos efeitos linear, quadrático e dos incrementos são testadas a partir das hipóteses:  $H_{02i}: (\beta_{i1} + \beta_{i2})/2 = 0$ . As hipóteses foram testadas por meio das estatísticas F dos testes tipo III de efeitos fixos (SAS/STAT, 2011). De acordo com Verbeke e Molenbergh (1997), após testar essas hipóteses o próximo passo é obter um modelo reduzido, ou seja, com uma estrutura média mais parcimoniosa, facilitando assim, a interpretação dos resultados obtidos. O modelo deve ser reajustado após a exclusão de cada um dos efeitos fixos não significativos, iniciando-se com os de maior ordem (termos quadráticos, interações, etc.).

As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS.

### 3. Resultados e discussões

A Tabela 1 apresenta o resumo de alguns modelos ajustados considerando os perfis médios em (1) e (2). Os modelos estão em ordem crescente de acordo com os valores de AIC.

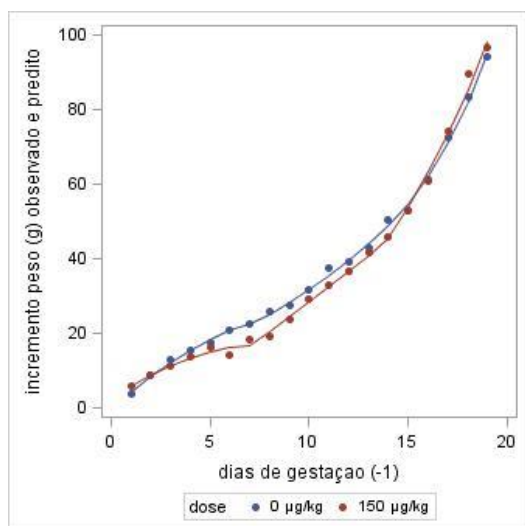
Dependendo dos efeitos aleatórios e/ou da estrutura de covariância especificados o ajuste não pode ser realizado, devido a problemas na convergência ou dificuldade na obtenção da matriz hessiana positiva definida ou ainda devido a máxima verossimilhança infinita. Por exemplo, para o perfil médio em (1) houve problema quando considerou-se a estrutura TOEPH inclusive sem efeitos aleatórios; com a estrutura ANTE(1) dentre várias combinações testadas houve convergência quando incluiu-se apenas os efeitos aleatórios no intercepto e no componente quadrático.

Tabela 1 – Estatísticas de ajuste de alguns modelos com perfil médio em (1) e (2) (Método de estimação máxima verossimilhança restrita).

modelo	parte fixa	Efeitos Aleatórios	nº param. Covariância	estrutura $R_i$	AIC	BIC
M1	(1)	Int quad i6_2 i13 i13_2	17	AR(1)	2232,0	2247,9
M2	(1)	Int quad	40	ANTE(1)	2232,0	2271,8
M3	(1)	Int quad i6_2 i13 i13_2	35	ARH(1)	2232,5	2265,4
M4	(1)	Int quad i6_2 i13_2	12	AR(1)	2234,2	2246,2
M5	(1)	Int lin quad i6 i6_2 i13 i13_2	30	AR(1)	2235,2	2263,1
M6	(1)	Nenhum	20	ARH(1)	2249,7	2269,6
M7	(1)	Nenhum	37	ANTE(1)	2255,5	2292,3
M8	(2)	Int quad i5_2 i10_2 i15_2	17	AR(1)	2199,8	2216,7
M9	(2)	Int lin quad i5 i5_2 i10 i10_2 i15 i15_2	47	AR(1)	2215,4	2261,2
M10	(2)	Nenhum	20	ARH(1)	2224,9	2244,8
M11	(2)	Nenhum	37	ANTE(1)	2231,9	2268,8
M12	(2)	Nenhum	19	TOEPH	2897,2	2916,1

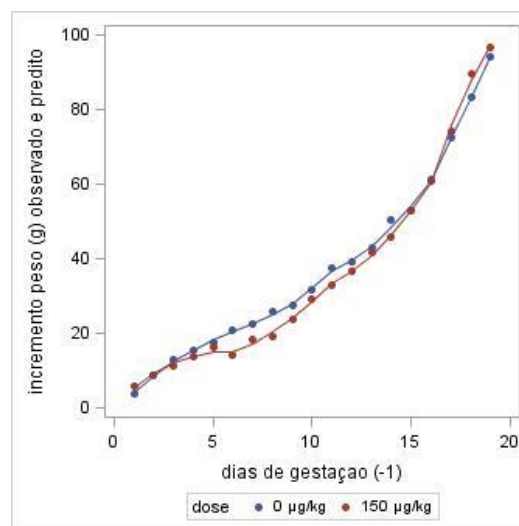
Fonte: elaborado pela autora

Nota: int= $b_{0i}$ , lin= $b_{1i}$  quad= $b_{2i}$ , i6= $b_{3i}$ , i13= $b_{4i}$  i13\_2= $b_{5i}$  em (1). Análogo em (2).



Fonte: elaborado pela autora

(a) Perfis médios modelo M1



Fonte: elaborado pela autora

(b) Perfis médios modelo M8

Figura 2. Incrementos diários preditos (g) com relação ao pesos iniciais das ratas.

De acordo com os critérios AIC e BIC (Tabela 1) o Modelo M1 foi o que apresentou melhor ajuste quando considerou-se dois pontos de mudança e o modelo M8 quando considerou-se três pontos de mudança. A Figura 2 apresenta os perfis médios populacional e individuais obtidos a partir dos Modelos M1 e M8.

Nos modelos M1 e M8 as hipóteses  $H_{01i}$  não foram rejeitadas já que apresentaram p-valores  $> 0,05$ . Assim sendo, nos dois casos (dois ou três pontos de mudança) não houve diferença significativa nos parâmetros que definem a tendência dos ganhos de pesos ao longo da gestação. Com relação as hipóteses  $H_{02i}$ , no modelo M1 as mesmas foram rejeitadas com excessão a relativa ao incremento linear no início da 2ª semana de gestação e no modelo M3 não foram rejeitadas as relativas aos incrementos linear no 5º dia e quadrático no 10º dia de gestação.

#### 4. Conclusões

Os modelos condicionais apresentaram menores valores de AIC e BIC comparados com os modelos marginais. Considerando a estrutura AR(1) foi possível testar várias combinações de efeitos aleatórios e além disso proporcionou o melhor ajuste nos casos de dois e três pontos de mudança.

De acordo com os testes de hipóteses realizados pôde-se concluir que não houve evidências de efeito do nanocomposto nos perfis de ganhos de peso. Testes de hipóteses adicionais devem ser realizados a partir de modelos reduzidos (obtidos a partir do modelo ajustado) para avaliar inclusive o efeito do nanocomposto nos ganhos de pesos das ratas durante alguns períodos da gestação.

#### 5 Referências bibliográficas

FITZMAURICE, G. M.; LAIRD, N. M.; WARE, J. H. Applied longitudinal analysis. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011. 701 p.

VERBEKE, G.; MOLENBERGHS, G. Linear mixed models in practice. A SAS - oriented approach. New York: Springer, 1997. 306 p.

SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT 9.3 USER'S GUIDE. Cary, NC: SAS Institute Inc, 2011. 8621p. URL <http://support.sas.com/documentation/cdl/en/statug/63962/PDF/default/statug.pdf>.

WEST, B. T.; WELCH, K. B.; GALECKI, A. T. Linear mixed models: a practical guide using