

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP
RELATÓRIO DE CONSULTA

TÍTULO: “Avaliação das concentrações eritrocitárias de glutathione total, glutathione reduzida, glutathione-peroxidase, glutathione reductase e superóxido-dismutase e das concentrações plasmáticas de malondialdeído e hidroperóxidos em cães hígidos e em cães com insuficiência renal crônica”.

PESQUISADOR: Márcio Dentello Lustoza.

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Márcia Mery Kogika.

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

FINALIDADE: Publicação e Mestrado.

PARTICIPANTES DA ENTREVISTA:

Antonio Carlos Pedroso de Lima

Lúcia Pereira Barroso

Danilo Clemente Coelho

Lincoln Cardoso Yamasaki

DATA: 06/05/2003

FINALIDADE DA CONSULTA: Orientação para análise de dados.

RELATÓRIO ELABORADO POR:

Danilo Clemente Coelho

Lincoln Cardoso Yamasaki

Índice

1. Introdução.....	1
2. Descrição do Estudo.....	1
3. Descrição das Variáveis	2
4. Situação do Projeto.....	3
5. Sugestão do CEA	4
6. Referências Bibliográficas.	8
Apêndice A “Seção do Minitab”	9
Apêndice B “Saídas do Minitab”	17
Apêndice C “Gráficos”	20

1. Introdução

Em seres humanos, existe estresse oxidativo em pacientes com problemas renais crônicos e acredita-se que o esse estresse seja um dos fatores envolvidos na etiologia da anemia da insuficiência renal crônica, embora o fator mais importante seja a deficiência de eritropoetina. Nesses pacientes, mesmo após o tratamento com eritropoetina recombinante, a anemia pode persistir e as hemácias têm um tempo de vida menor, o que pode ocorrer, em parte, devido ao estresse oxidativo.

Dado o conhecimento da presença do estresse oxidativo em pessoas com problemas renais crônicos, é de interesse avaliar o estresse oxidativo em hemácias de cães com insuficiência renal crônica e em cães normais utilizando a mensuração de algumas substâncias e enzimas com atividades antioxidantes. Além disso, serão avaliados subprodutos de peroxidação lipídica que são substâncias originadas da ação das espécies reativas do oxigênio sobre os ácidos graxos no plasma desses animais. O objetivo é saber se existe diferença nos valores dessas substâncias entre os animais doentes e normais.

2. Descrição do Estudo

Para a formação do grupo caso, será coletada, por conveniência, uma amostra de 30 cães com insuficiência renal crônica e com anemia atendidos pelo Serviço de Clínica Médica do HOVET/USP. Os animais serão triados por dados de anamnese e por exames complementares que deverão apresentar valores de hematócrito abaixo de 37%, creatina sérica acima de 1,8 mg/dl e uréia sérica acima de 70 mg/dl e não poderão apresentar nenhum outro distúrbio hematopoiético. Será coletada também uma amostra de 40 cães domiciliados de raça e sexo variados com idade entre 1 e 12 anos da região do Butantã, que formarão o grupo controle. O período de coleta será durante o ano de 2003.

Para o grupo controle, os cães serão avaliados em relação à idade e classificados segundo as seguintes categorias: 1 a 6 anos e 6 meses e, 6 anos e 7 meses a 12 anos.

O sangue de todos os animais será coletado e feita a separação entre a massa plaquetária e o plasma do sangue. Estes serão congelados e armazenados para que, ao fim da coleta, todos os materiais sejam descongelados e analisados em um curto período a fim de controlar a homogeneidade das medidas em relação às influências externas.

A fim de detectar diferenças entre os grupos caso e controle, serão analisadas, independentemente, sete variáveis, sendo que cinco delas serão medidas a partir da massa plaquetária e as outras duas a partir do plasma do sangue. As concentrações eritrocitárias medidas a partir da massa plaquetária e as concentrações plasmáticas medidas no plasma, respectivamente, são: glutathione total, glutathione reduzida, glutathione peroxidase, glutathione reductase e superóxido dismutase; malondialdehyde e hidroperóxidos. As medidas de glutathione total e reduzida serão mensuradas por eletroforese capilar de alta performance e os demais, por métodos colorimétricos.

3. Descrição das Variáveis

3.1. Variáveis controladas no estudo.

- Grupo:
Caso;
Controle.
- Idade:
0: 1 a 6 anos e 6 meses;
1: 6 anos e 7 meses a 12 anos.

3.2. Variáveis da massa plaquetária.

- **Concentração Eritrocitárias de Glutathione Total:** número de mols de glutathione total dividido pela quantidade de massa de hemoglobina; ($\mu\text{mol/g}$)
- **Concentração Eritrocitárias de Glutathione Reduzida:** número de mols de glutathione reduzida dividido pela quantidade de massa de hemoglobina; ($\mu\text{mol/g}$)
- **Concentração Eritrocitárias de Glutathione Peroxidase:** número de unidades de glutathione peroxidase dividido pela quantidade de massa de hemoglobina; (UI/g)
- **Concentração Eritrocitárias de Glutathione Redutase:** número de unidades de glutathione redutase dividido pela quantidade de massa de hemoglobina; (UI/g)
- **Concentração Eritrocitárias de Superóxido Dismutase:** número de unidades de superóxido dismutase dividido pela quantidade de massa de hemoglobina. (UI/g)

3.3. Variáveis do plasma.

- **Concentração Plasmática de Malondialdeído:** número de mols de malondialdeído dividido pelo volume de plasma; (nmol/ml)
- **Concentração Plasmática de Hidroperóxidos:** número de mols de hidroperóxidos dividido pelo volume de plasma; ($\mu\text{M/ml}$)

4. Situação do Projeto

O projeto encontra-se na etapa de planejamento. Após a entrega do relatório de consulta, a pesquisadora dará início à coleta de sangue dos cães que, provavelmente, se estenderá ao longo do ano de 2003. A análise clínica do material coletado será feita no final do ano de 2003 segundo a pesquisadora.

5. Sugestão do CEA

Realizamos a análise de um exemplo hipotético conforme a descrição do estudo e, para isso utilizamos o “software” Minitab v.13. Sugerimos que a organização dos dados siga a estrutura da Tabela 1, ou seja, em cada linha encontram-se os dados de um animal e nas colunas os valores das variáveis mensuradas. A primeira coluna destina-se à identificação do cão; na segunda coluna, temos a variável Grupo que define se o cão possui insuficiência renal (caso) ou se é um cão saudável (controle); na terceira coluna, temos a variável Idade que define se o cão tem até 6 anos e seis meses de vida (0) ou se tem mais de seis anos e seis meses (1). A partir da quarta coluna, encontram-se as variáveis que temos interesse em estudar. No nosso exemplo, estudamos a Variável 1 sendo que os procedimentos são análogos para a análise das demais variáveis.

Tabela 1: Estrutura do Banco de Dados.

Cão	Grupo	Idade	Variável 1	Variável 2	...	Variável 7
1	caso	0	5.63
2	caso	0	2.67
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
29	caso	1	5.45
30	caso	1	6.19
31	controle	0	7.05
32	controle	0	6.25
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
69	controle	1	5.41
70	controle	1	5.08

A Variável 1 é chamada de variável resposta e, as variáveis Idade e Grupo de fatores. À combinação dos níveis dos fatores, denominamos Tratamento, com a seguinte codificação:

- **Tratamento 1:** cães do grupo caso com menos de seis anos e seis meses;
- **Tratamento 2:** cães do grupo caso com mais de seis anos e seis meses;
- **Tratamento 3:** cães do grupo controle com menos de seis anos e seis meses;
- **Tratamento 4:** cães do grupo controle com mais de seis anos e seis meses.

Tabela 2: Estrutura do Banco de Dados com a Variável Tratamento.

Cão	Grupo	Idade	Tratamento	Variável 1	Variável 2	...	Variável 7
1	caso	0	1	5.63
2	caso	0	1	2.67
⋮	⋮	⋮		⋮	⋮	⋮	⋮
29	caso	1	2	5.45
30	caso	1	2	6.19
31	controle	0	3	7.05
32	controle	0	3	6.25
⋮	⋮	⋮		⋮	⋮	⋮	⋮
69	controle	1	4	5.41
70	controle	1	4	5.08

Fizemos uma análise descritiva dos dados para descrever a amostra e verificar possíveis inconsistências. Sugerimos o uso de gráficos do tipo “boxplot” (Bussab e Morettin, 2002) para descrever a distribuição da variável resposta em relação aos níveis dos fatores e auxiliar na detecção de pontos aberrantes. As Figuras A1 e A2 exemplificam a obtenção desses gráficos no Minitab.

O Gráfico C1 mostra que os cães dos tratamentos 1 e 2 (caso) parecem ter a mesma distribuição da variável resposta, bem como os cães dos tratamentos 3 e 4 (controle), o que nos sugere ausência de efeito de Idade. Porém, os valores da Variável 1 parecem ser menores para os cães dos tratamentos 1 e 2 do que para os cães dos tratamentos 3 e 4 o que nos indica um efeito de Grupo. Percebemos também pelos “boxplots” que a variação da variável resposta parece ser a mesma para todos os tratamentos.

Outro gráfico interessante é do tipo Perfis de Médias (Neter et al. 1996) onde analisamos se a variação da média da variável resposta é a mesma quando variamos os níveis de um fator a cada nível do outro fator, este efeito é que chamamos de interação. Por exemplo, se a diferença entre as médias da Variável 1 para os cães dos grupos Caso e Controle forem diferentes quando variamos o nível de Idade, dizemos que há interação entre Idade e Grupo. No Gráfico C.2 notamos que as retas são quase paralelas, ou seja, a diferença entre as médias da Variável 1 para os cães dos grupos Caso e Controle parece ser a mesma quando variamos o nível de idade, o que nos indica ausência de interação. As Figuras A3 e A4 exemplificam como obtê-los.

Tendo uma prévia do comportamento dos dados sugerimos um modelo estatístico para explicação dos mesmos. Propomos a técnica de Análise de Variância (ANOVA) utilizando o modelo com dois fatores fixos cruzados e não balanceados (Neter et al. 1996). Para a aplicação do modelo as suposições de homocedasticidade, normalidade e independência dos resíduos devem ser satisfeitas.

Com a planilha de dados já aberta e organizada como na Tabela 2, ajustamos o modelo de ANOVA. Como o estudo é desbalanceado, ou seja, não temos o mesmo número de observações em cada tratamento, usaremos a opção “General Linear Model” como mostra a Figura A5. Abrir-se-á uma janela onde devemos preencher o campo “*reponses*” com a variável resposta e o campo “*model*” com os fatores e a interação entre eles, como ilustrado na Figura A6. A janela da Figura A7 aparece quando acionamos a opção “*storage...*” da Figura A6 e tem a finalidade de guardar os valores ajustados pelo modelo e os resíduos para a sua posterior análise. Nas janelas das Figuras A8 a A13, temos como fazer a análise de resíduos para verificar se as suposições do modelo estão satisfeitas. Feito isso, será gerada uma saída com a tabela da ANOVA e os gráficos solicitados, que estão dispostos no Apêndice B.

Analisando a tabela apresentada na Tabela B3, notamos uma coluna denotada por P (P-valor). Nela temos o nível descritivo do teste de ausência de efeito do fator da linha correspondente. Usualmente, se esse valor for menor que 0,05 (5%), rejeitamos tal hipótese, caso contrário, dizemos não ter evidências suficientes para rejeitá-la. Por exemplo, o nível descritivo do teste de hipótese de ausência do efeito de interação é 0,823 o que nos leva a concluir que não há um efeito de interação. O mesmo acontece com efeito de Idade o que vem ao encontro da análise descritiva. Entretanto, notamos que o nível descritivo associado ao teste de ausência de efeito de Grupo é praticamente zero o que nos leva a acreditar que exista evidência de efeito de Grupo, o que também já esperávamos segundo os gráficos descritivos.

Analisando os Gráficos C3 e C4, notamos que não há evidências de heterocedasticidade e não normalidade, confirmados com os testes apresentados, respectivamente, nas Tabelas B1 e B2, o que nos leva a aceitar o modelo para análises inferenciais.

Se as análises de resíduos e os testes indicarem uma fuga das suposições do modelo, poderemos tentar uma transformação na variável resposta e ajustar outro modelo ou tentar outras técnicas mais complexas (Neter et al. 1996).

6. Referências Bibliográficas.

BUSSAB, W. O. e MORETTIN, P. A. (2002). **Estatística Básica**. 4. ed. São Paulo: Editora Atual. 312p.

NETER, J., KUTNER, M. H., NACHTSHEIM, C. J. and WASSERMAN, W. (1996). **Applied linear statistical models: regression, analysis of variance and experimental design**. 4.ed. Homewood: Richard D. Irwing. 1408p.

Apêndice A

Seção do Minitab

Figura A1. Construção dos Boxplots.

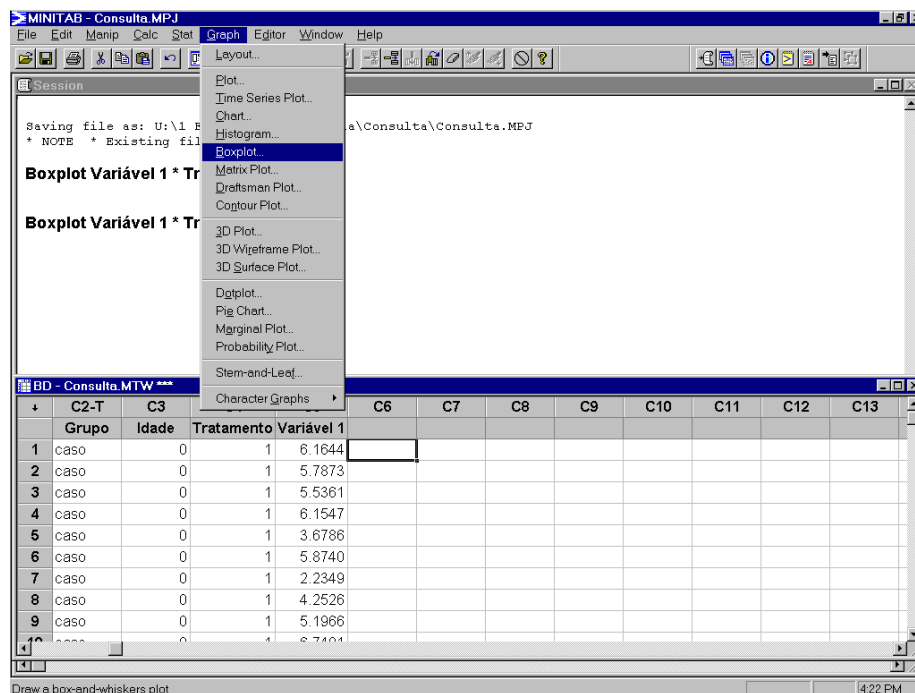


Figura A2. Escolha das Variáveis para Construção dos Boxplots.

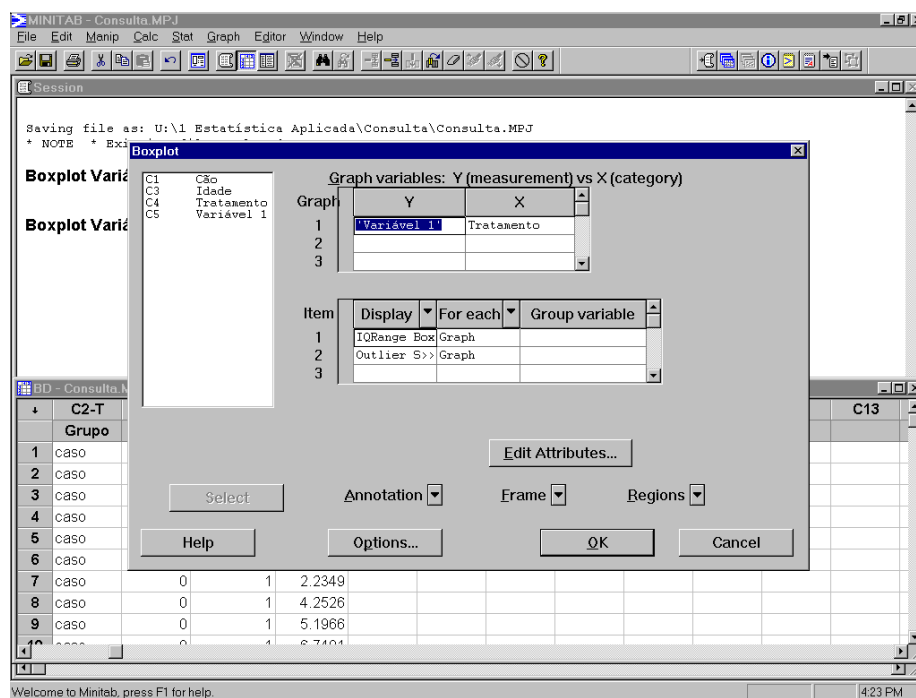


Figura A3. Construção do Gráfico de Perfis de Médias.

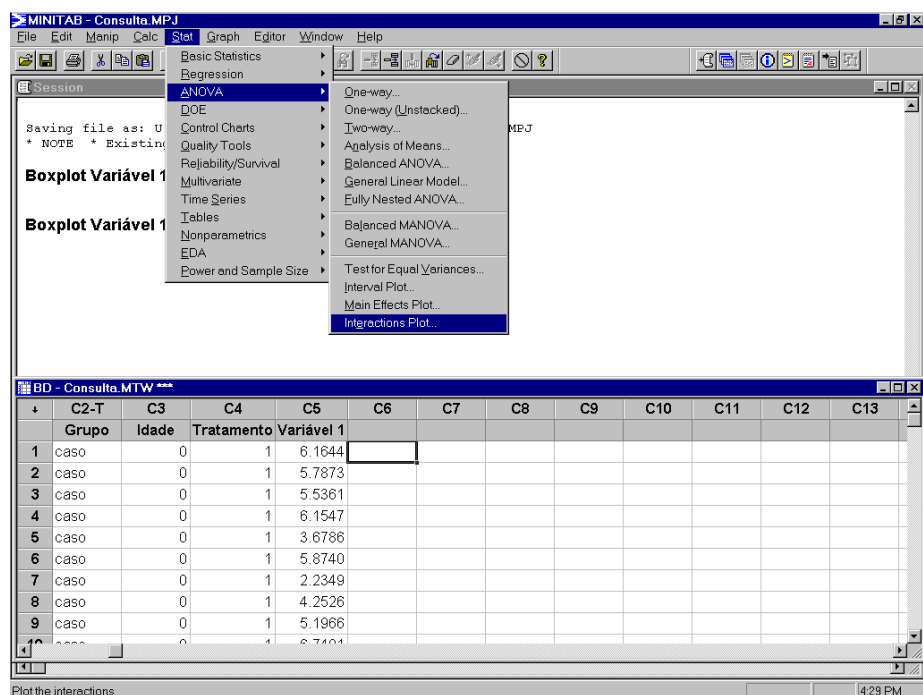


Figura A4. Escolha das Variáveis para Construção dos Gráficos de Perfis Médios.

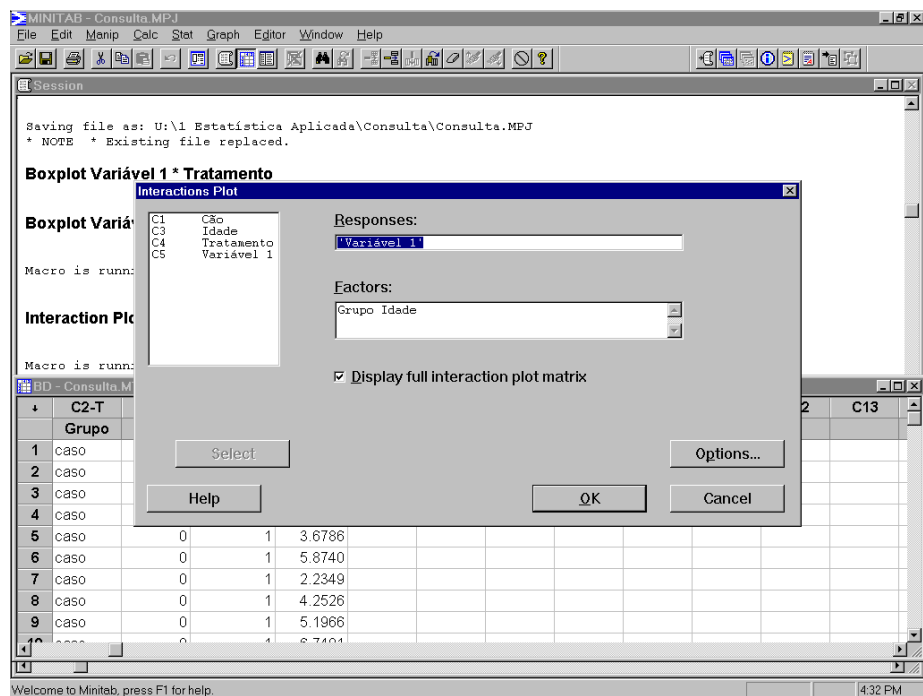


Figura A9. Seleção das Variáveis para o Teste de Igualdade de Variâncias.

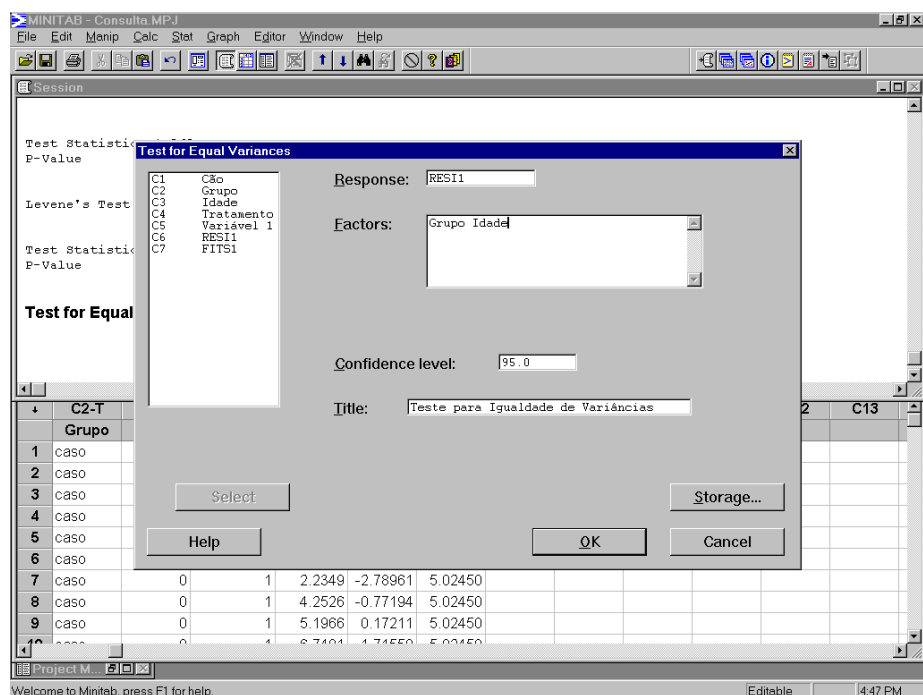


Figura A10. Análise de Resíduos – Teste para Normalidade dos Resíduos.

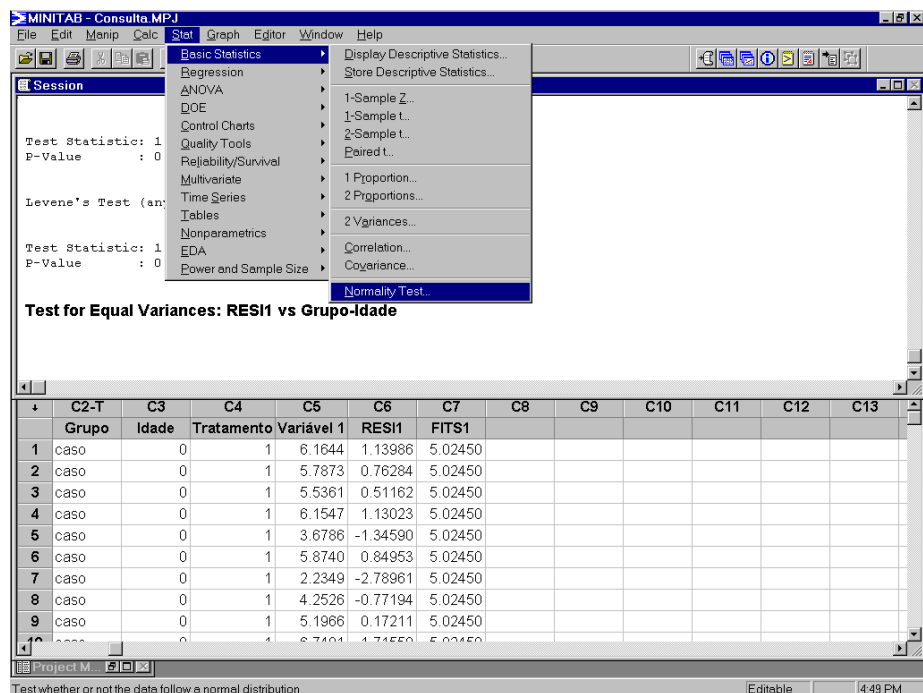


Figura A11. Seleção das Variáveis para o Teste de Normalidade dos Resíduos.

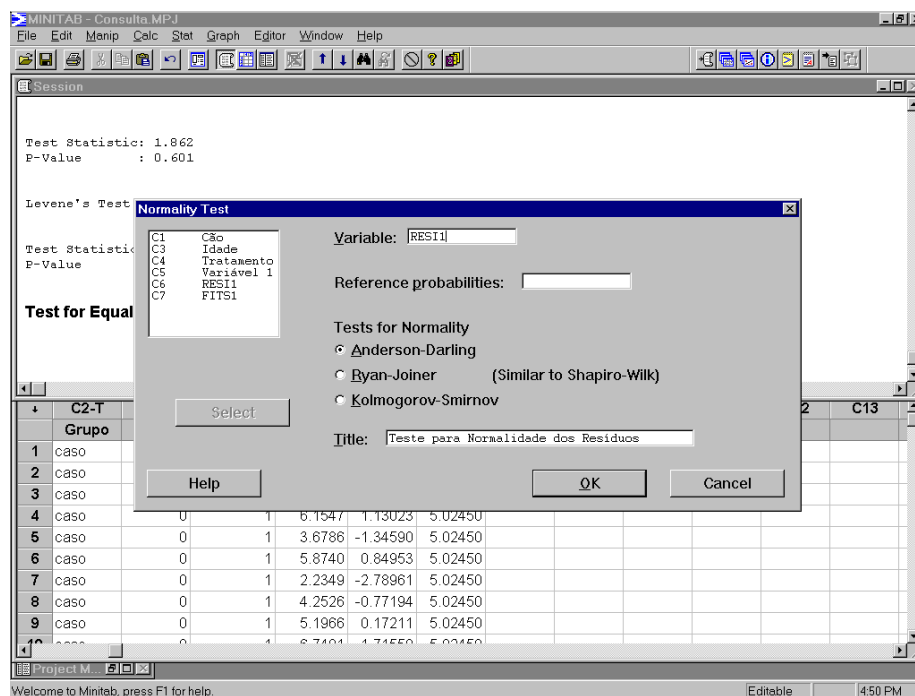


Figura A12. Verificação da Aleatoriedade dos Resíduos em Relação aos Valores Ajustados “Fits”.

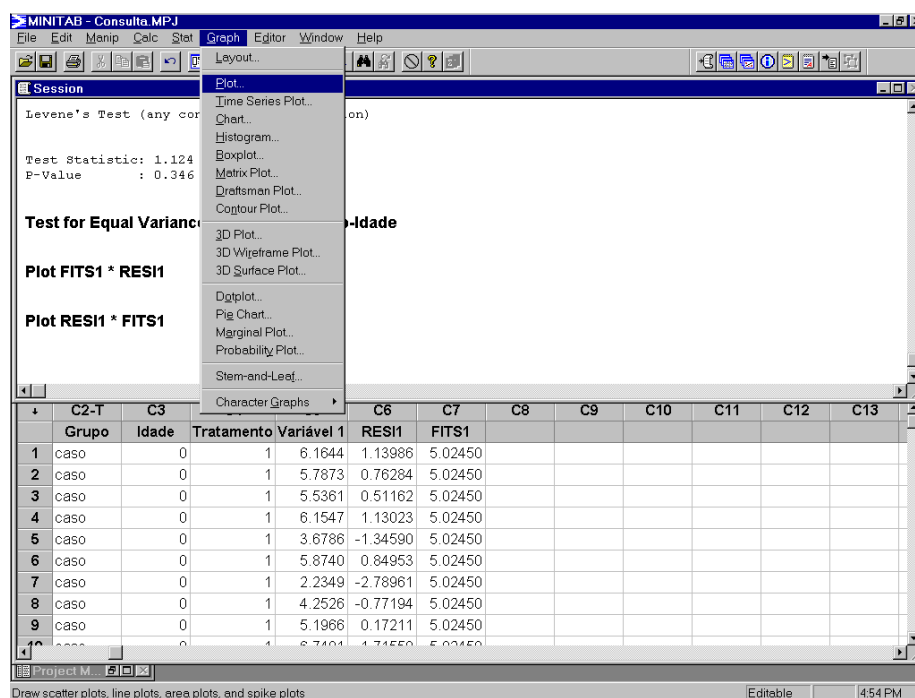
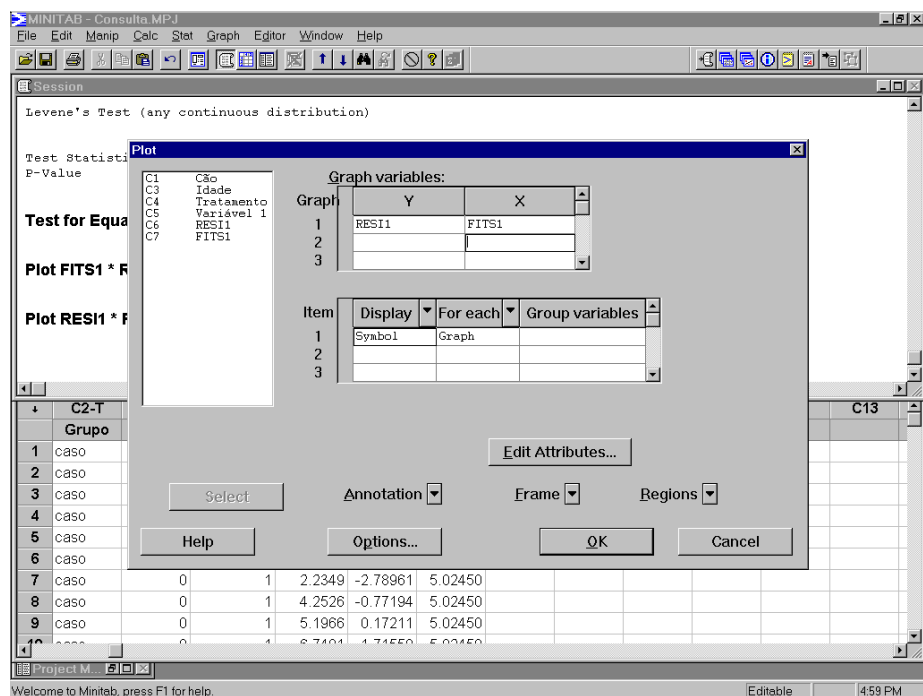


Figura A13. Seleção das Variáveis para Verificação da Aleatoriedade dos Resíduos.



Apêndice B

Saídas do Minitab

Tabela B1. Teste para Igualdade de Variâncias dos Tratamentos.

Test for Equal Variances

Response

RESI1

Factors

Grupo Idade

ConfLvl

95.0000

Bonferroni confidence intervals for standard deviations

Lower	Sigma	Upper	N	Factor	Levels
0.850483	1.25792	2.28257	15	caso	0
0.641473	0.94878	1.72162	15	caso	1
0.688070	0.97081	1.58987	20	controle	0
0.844432	1.19142	1.95117	20	controle	1

Bartlett's Test (normal distribution)

Test Statistic: 1.862

P-Value : 0.601

Levene's Test (any continuous distribution)

Test Statistic: 1.124

P-Value : 0.346

Tabela B2. Teste para Normalidade dos Resíduos.

Distribution Function Analysis	
Normal Dist. Parameter Estimates (ML)	
Variable: RESI1	
Mean	0.0000000
StDev	1.06659
Goodness of Fit	
Anderson-Darling (adjusted) = 0.511	

Apêndice C

Gráficos

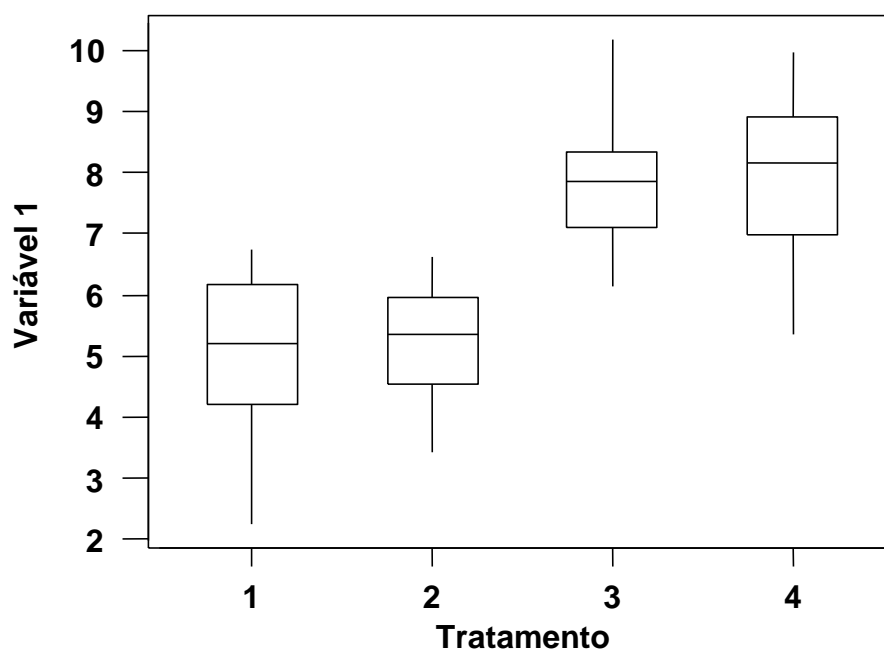
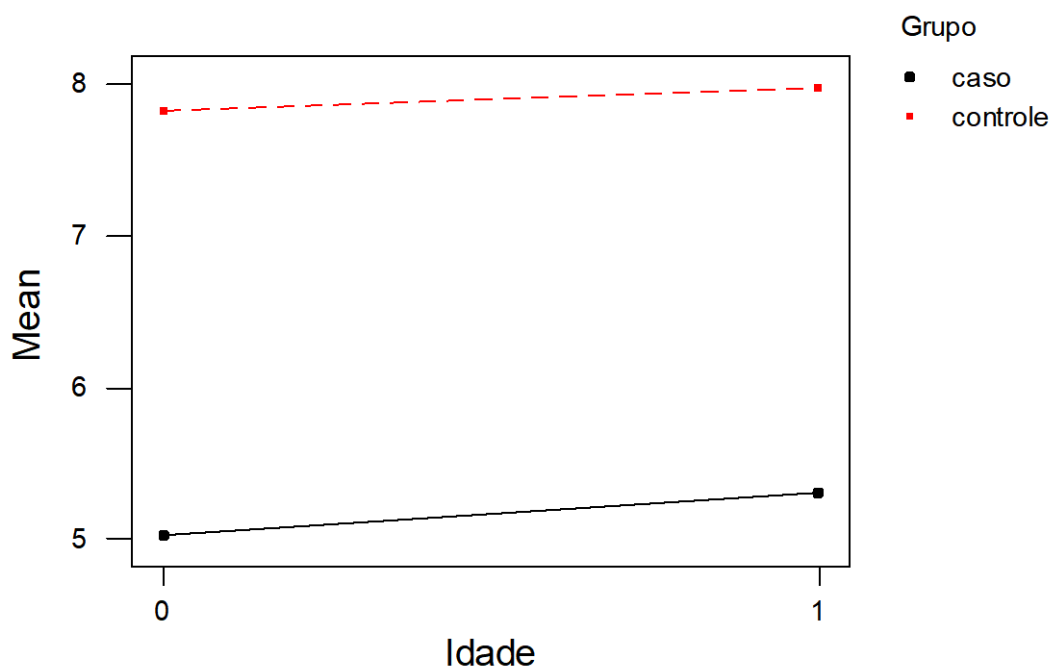
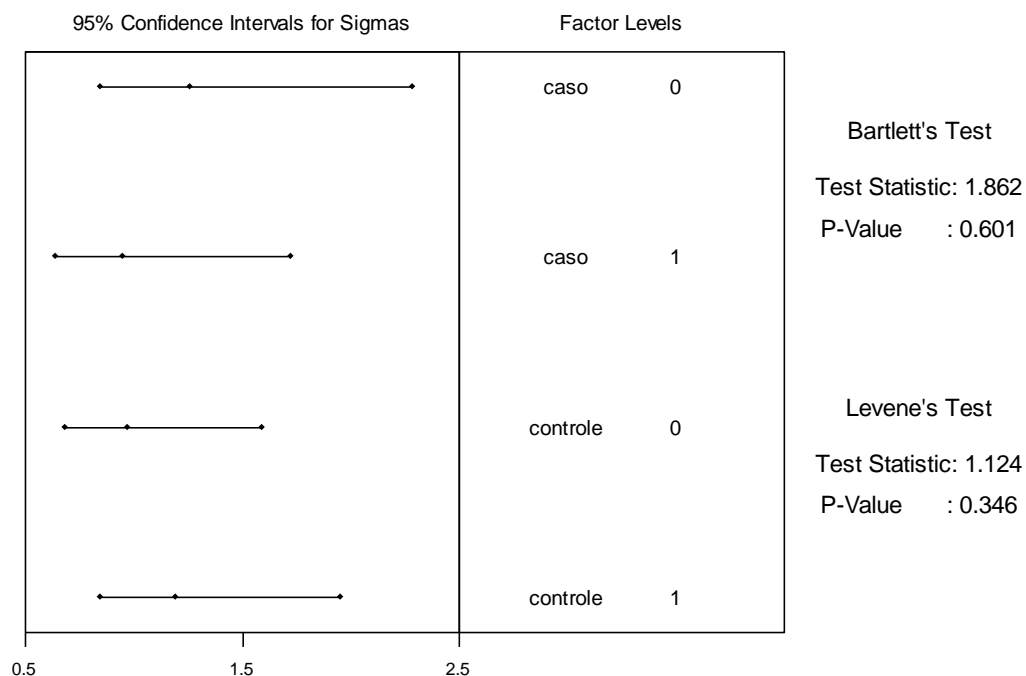
Gráfico C1. Boxplot da Variável 1 por Tratamento.**Gráfico C2.** Perfis de Médias.

Gráfico C3. Teste de Igualdade de Variância dos Tratamentos.**Gráfico C4.** Teste de Normalidade para os Resíduos.