

**Universidade de São Paulo
Instituto de Matemática e Estatística**

Centro de Estatística Aplicada

Relatório de Análise Estatística

RAE-CEA-21P04

RELATÓRIO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA SOBRE O PROJETO:

“Determinação do ciclo reprodutivo da jararaca do norte (*Bothrops atrox*) através de dosagens hormonais e imagens ultrassonográficas das gônadas “

Airlane Pereira Alencar

Hei Yin Kwok

Karine Tavares Cruz

Yugo Oyama

São Paulo, julho de 2021

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA - CEA – USP

TÍTULO: Relatório de Análise Estatística sobre o Projeto: “Determinação do ciclo reprodutivo da jararaca do norte (*Bothrops atrox*) através de dosagens hormonais e imagens ultrassonográficas das gônadas”.

PESQUISADORA: Samira Emanuela Maria Vieira

ORIENTADORES: Prof. Dra. Kathleen Fernandes Grego

Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira

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

FINALIDADE DO PROJETO: Programa de Pós graduação em Reprodução Animal

RESPONSÁVEIS PELA ANÁLISE: Airlane Pereira Alencar

Hei Yin Kwok

Karine Tavares Cruz

Yugo Oyama

REFERÊNCIA DESTE TRABALHO: ALENCAR, A.P.; KWOK, H.Y.; CRUZ, K.T.; OYAMA, Y. **Relatório de análise estatística sobre o projeto: “Determinação do ciclo reprodutivo da jararaca do norte (*Bothrops atrox*) através de dosagens hormonais e imagens ultrassonográficas das gônadas”.** São Paulo, IME-USP, 2021. (RAE-CEA–21P04)

FICHA TÉCNICA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALMEIDA-SANTOS, S.M. (2005). **Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes Viperidae)**. São Paulo Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP.

ANDERSEN, R. (2008). Influential Cases in Generalized Linear Models. In: Andersen, R. **Modern Method for Robust Regression**. Disponível em:

<https://us.sagepub.com/sites/default/files/upm-assets/17840_book_item_17840.pdf>

FOX, J. (2018). Regression Diagnostics for Linear, Generalized Linear and Mixed-Effects Models. In: Fox, J. **An R Companion to Applied Regression**. Disponível em:

<https://us.sagepub.com/sites/default/files/upm-assets/95589_book_item_95589.pdf>

HARTIG, F., 2019. **DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (multi-level/mixed) Regression Models. R Package. Version 0.2.4**. Disponível em:

<<https://cran.r-project.org/web/packages/DHARMA/vignettes/DHARMA.html>>

MOURA, V.M de. et. al. (2015) Acidentes ofídicos na região norte do Brasil e o uso de espécies vegetais como tratamento alternativo e complementar a soroterapia. **Scientia Amazonia**, 4, n.1 73-84.

MORETTIN, P.A.; SINGER, J.M. (2021). **Estatística e Ciência de Dados (versão parcial em elaboração)**. 36 p. Disponível em:

<<https://www.ime.usp.br/~jmsinger/MAE0217/cdados2021junho01.pdf>>

NARATIP, J.; HINDE, J. (2004). Linear mean-variance negative binomial models for analysis of orange tissue-culture data. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, 26. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/26473429_Linear_mean-variance_negative_binomial_models_for_analysis_of_orange_tissue-culture_data>

PAULA, G. A. (2013). **MODELOS DE REGRESSÃO com apoio computacional**. Disponível em: <<https://www.ime.usp.br/~giapaula/textoregressao.htm>>

SINGER, J.M., NOBRE, J.S. e ROCHA, F.M.M. (2018). **Análise de Dados Longitudinais** (versão parcial preliminar). Disponível em:

<<https://www.ime.usp.br/~jmsinger/MAE0610/Singer&Nobre&Rocha2018jun.pdf>>

WOOLDRIDGE, J.M. (2012). **Introductory Econometrics: A Modern Approach**. 5a ed. South-Western. 191 p.

PROGRAMAS COMPUTACIONAIS UTILIZADOS:

Microsoft Excel for Windows (versão 2016)

R for Windows, versão 4.0.4.

RStudio for Windows, versão 1.3.1093

TÉCNICAS ESTATÍSTICAS UTILIZADAS

Análise Descritiva Multidimensional (03:020)

Testes de Hipóteses Paramétricas (05:010)

Análise de Associação e Dependência de Dados Quantitativos (06:010)

Associação e Dependência de Dados Qualitativos (06:020)

Análise de Regressão Clássica (07:020)

Outros (07:990)

Análise de Variância com Modelos Mistos (08:030)

ÁREA DE APLICAÇÃO

Ciências do Ambiente e Ecologia (14:060)

Resumo

A Jararaca-do-Norte é uma serpente venenosa, carnívora e ectotérmica que habita principalmente no norte da América do Sul. As suas principais importâncias consistem na produção do veneno que é usado para a produção de soros antiofídicos e na promoção do avanço em pesquisas farmacológicas desde o último século. Antigamente, o Instituto Butantã recebia as serpentes através dos colaboradores rurais, porém com a diminuição das áreas naturais e a matança indiscriminada desses animais, a recepção dos ofídios tem diminuído significativamente nas últimas décadas. Portanto, é importante o próprio instituto tornar-se independente em manter o plantel de serpentes em número adequado, para atender à demanda de produção de venenos.

A fim de aprimorar as técnicas de reprodução das serpentes no cativeiro, foi proposto um estudo com 6 jararacas fêmeas, cujo objetivo é determinar os níveis dos hormônios progesterona (P4) e estradiol (E2) dessas serpentes ao longo do ano e associar os níveis dos hormônios sexuais ao ciclo ovariano, nas diferentes estações do ano. Na análise descritiva e a partir do ajuste de modelos lineares generalizados mistos, foi possível determinar o comportamento das dosagens hormonais em diferentes estações e estágios e também a resposta da quantidade de folículos ovarianos em função das estações e das dosagens hormonais.

Sumário

Resumo	6
1. Introdução	8
2. Objetivos	9
3. Descrição do estudo	9
4. Descrição das variáveis	9
5. Análise descritiva	10
5.1 Relação: Hormônio x Tempo	11
5.2 Relação: Folículos x Tempo	12
6. Análise Inferencial	12
6.1 Modelo de regressão para o número de folículos ovarianos em cada estágio.	12
6.1.1 Modelagem do estágio I	13
6.1.2 Modelagem do estágio II	14
6.1.3 Modelagem do estágio III	14
6.1.4 Modelagem do estágio IV	15
6.2 Modelo de regressão para os hormônios	15
6.2.1 Modelagem de P4	15
6.2.2 Modelagem de E2	16
7. Conclusões	16
APÊNDICE A	18
APÊNDICE B	23
ANEXO	35

1. Introdução

As serpentes são animais carnívoros e heterotérmicos, portanto necessitam do calor ambiente para manterem o funcionamento do metabolismo e outras atividades vitais como caça e reprodução. Entre elas existem as do gênero *Bothrops*, popularmente denominadas de jararacas, que são importantes causadoras de acidentes com animais peçonhentos no Brasil, apresentam características de dentição especializada para injetar veneno em suas presas e de comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, podendo ocasionar acidentes graves em outros animais e também em humanos. São cerca de 27 espécies encontradas na América Latina e entre elas há a jararaca-do-norte (*B. atrox*) que habita na Floresta Amazônica, região caracterizada pelas altas umidades e temperaturas ao longo do ano, favorecendo a disponibilidade de alimentos e condições para espermatogênese, vitelogênese e embriogênese (Almeida-Santos, 2005).

A vitelogênese em fêmeas de serpentes é o processo através do qual reservas são progressivamente armazenadas nos ovócitos de animais ovíparos originando o vitelo dos ovos maduros, a quantidade de vitelo acumulada determina seu estágio de desenvolvimento: quanto maior, melhor a condição de ser fecundado. Devido à dependência das circunstâncias climáticas ideais para o nascimento dos filhotes, e necessidade de acúmulo de gordura, as serpentes possuem ciclo reprodutivo sazonal (Almeida-Santos, 2005).

O hormônio estradiol participa do desenvolvimento do vitelo. Quando ocorre a fecundação, o nível de progesterona aumenta para auxiliar no desenvolvimento dos embriões e no sustento da gestação.

Nos últimos trinta anos, as pesquisas realizadas em animais de coleção biológica contribuíram para o conhecimento sobre o ciclo reprodutivo de serpentes brasileiras, associadas aos registros pontuais observados em campo e cativeiro (Almeida-Santos e Salomão, 2002; Pizzato et al. 2006). Porém, esse material apenas fornece características do animal no momento abatido, para o melhor entendimento do funcionamento do ciclo reprodutivo das serpentes, é preciso realizar o estudo de acompanhamento do grupo de serpentes ao longo das diferentes estações do ano, verificando as transformações morfológicas das gônadas e a variação dos níveis hormonais.

2. Objetivos

Sabe-se que existem diferenças significativas entre a Floresta Amazônica, onde a espécie habita, e a Mata Atlântica, onde habitam as 6 cobras em estudo. Enquanto a primeira é marcada por elevadas temperaturas e chuvas durante o ano todo, a segunda possui estações bem definidas pelas diferentes temperaturas e volume de chuvas.

Desse modo, os principais objetivos desse projeto são:

- Verificar a relação entre os níveis dos hormônios progesterona e estradiol e os estágios foliculares observados.
- Determinar os níveis dos hormônios progesterona e estrogênio ao longo do ano.
- Verificar a existência de associação entre os níveis dos hormônios sexuais e o ciclo ovariano das serpentes, nas diferentes estações do ano.

3. Descrição do estudo

De março de 2010 até novembro de 2011, foram coletadas amostras de sangue de 6 cobras fêmeas vivas do gênero *Bothrops* com aproximadamente 4 anos de vida e realizados exames de ultrassom e sangue - mostrados nas figuras do ANEXO - sempre nos mesmos dias em intervalos não regulares de tempo entre medições (tentou-se coletar uma vez por mês, mas houve meses em que não foi possível). As 6 cobras são provenientes de uma mesma gestação e mantidas sob iguais condições (mesma quantidade de alimento, cada uma em uma caixa de igual tamanho, ...) no Instituto Butantã. A temperatura do local é parcialmente controlada com o uso de aquecedores para evitar temperaturas muito baixas.

4. Descrição das variáveis

As variáveis coletadas no estudo são as seguintes:

- **Fêmea:** identificação de cada animal
 - Bax 0601-01
 - Bax 0601-06
 - Bax 0601-09
 - Bax 0601-10
 - Bax 0601-12
 - Bax 0601-20
- **Data :** dia, mês e ano em que a coleta foi realizada

- **P4:** Dosagem de progesterona (ng/mL)
- **E2:** Dosagem de estradiol (pg/mL)
- **Estágio I:** Quantidade de folículos ovarianos que se encontram no estágio I
- **Estágio II:** Quantidade de folículos ovarianos que se encontram no estágio II
- **Estágio III:** Quantidade de folículos ovarianos que se encontram no estágio III
- **Estágio IV:** Quantidade de folículos ovarianos que se encontram no estágio IV
- **Oviduto:** Quantidade de óvulos, que podem ou não estar fecundados, que se encontram no oviduto, que corresponde ao canal pelo qual o ovo passa dos ovários para fora do corpo da fêmea.

A partir desses dados, foram construídas variáveis auxiliares para realização da análise:

- **Estações:** Corresponde aos 4 períodos do ano:
 - Verão: dezembro, janeiro e fevereiro
 - Outono: março, abril e maio
 - Inverno: junho, julho e agosto
 - Primavera: setembro, outubro e novembro

As serpentes apresentam folículos em vários estágios ao mesmo tempo. Os folículos aumentam conforme os ovócitos recebem a gordura e desenvolvem o vitelo. São classificados em:

- não vitelogênicos da classe I (menores que 0,5 cm de diâmetro)
- não vitelogênicos da classe II (0,6 a 1,0 cm)
- vitelogênicos da classe III (1,1 a 2,0 cm)
- vitelogênicos da classe IV (2,1 a 3,0 cm)

5. Análise descritiva

Inicialmente, temos na Tabela A.1 as medidas-resumo das variáveis relacionadas a dosagens, quantidade de folículos e de óvulos. Percebemos que a maioria dos valores do hormônio estradiol (E2) são baixos e que alguns são bastante elevados. Com o hormônio progesterona (P4) isso também ocorre.

Percebemos também uma quantidade razoável de dados faltantes. Considerando as 6 cobras e as 14 datas, teríamos um total de 90 observações. Há variáveis que apresentam 17 valores faltantes.

Nos gráficos de dispersão da Figura B.1, vemos que, como constatado anteriormente, os dados de hormônios possuem muitos valores baixos e alguns valores muito elevados. Isso sugere uma transformação do tipo logaritmo neperiano nas variáveis P4 e E2 para melhor visualização.

Usando a transformação logarítmica sugerida, percebemos melhor o comportamento dos hormônios (Figura B.3).

Na Figura B.4, nota-se que as correlações de Pearson entre as variáveis são baixas; sendo a maior delas 0,4 (entre os dois hormônios, após a transformação logarítmica). Entre os estágios, a maior parte das correlações é negativa apesar de, em módulo, serem muito pequenas. Entre o estágio I e os hormônios a correlação é negativa, enquanto entre os outros estágios e os hormônios a correlação é positiva.

Os gráficos de densidade Figura B.2, mostram assimetria à direita dos dados. Percebe-se também que há uma certa semelhança entre os estágios II e III.

5.1 Relação: Hormônio x Tempo

Os perfis individuais e médios (Singer, Nobre e Rocha, 2018) do log P4 ao longo do tempo (Figura B.5), sugerem a existência de particularidades para algumas cobras. Como exemplo, em junho de 2010, apenas a Bax 0601-10 apresenta um pico local. Ainda, de forma geral, enquanto medidas elevadas parecem se concentrar do meio para o final do ano, medidas baixas parecem se concentrar no início do ano.

Os perfis individuais e médios do log E2 ao longo do tempo (Figura B.6), sugerem também a existência de particularidades entre as cobras. Como exemplo, a Bax 0601-06 parece se comportar de modo diferente das demais, no período de agosto de 2020 a janeiro de 2021. Ainda, de forma geral, vemos dois picos: um em maio de 2010 e outro em junho de 2011.

Dividindo o tempo nas 4 estações do ano, obtemos as Figuras B.7 e B.8, onde as barras representam o erro padrão. Vemos os menores valores no outono, para o log P4 e, no verão, para o log E2, e os maiores valores na primavera, para log P4, e, no inverno, para log E2.

5.2 Relação: Folículos x Tempo

Na Figura B.9, temos o gráfico de colunas empilhadas dos estágios por data. O estágio I é predominante, apresentando maiores valores nos meses de janeiro, fevereiro e abril de 2011.

Dividindo o tempo pelas estações, Figura B.10, vemos mais claramente os altos níveis do estágio I no verão e no outono. No inverno e na primavera, os estágios III e IV aparecem com maior relevância, comparando-se com as outras estações.

Pelos gráficos das Figuras B.11 e B.12, a quantidade de folículos ao longo do tempo no estágio IV é sempre bem baixa.

Pelos perfis médios da quantidade de folículos nos vários estágios ao longo das estações (Figura B.13), o comportamento das médias dos estágios III e IV é bastante semelhante mudando somente a escala, já que o estágio IV apresenta valores bem menores. A média do estágio I decresce de modo uniforme do verão até a primavera. Já a média do estágio II varia pouco ao longo das estações.

Usando análise de correspondência, foi construído o mapa simétrico (Figura B.14) e a partir dele verificamos que os estágios III e IV estão mais associados à primavera e ao inverno, estágio I ao verão e estágio II ao outono, o que está de acordo com as maiores contagens de cada estágio em cada estação conforme a Tabela A.2.

6. Análise inferencial

Como os dados apresentam medidas repetidas para as mesmas fêmeas e as mesmas estações do ano, decidiu-se usar modelos mistos generalizados, que consideram o efeito aleatório das fêmeas.

6.1 Modelo de regressão para o número de folículos ovarianos em cada estágio.

Para a modelagem do número de folículos ovarianos em cada estágio, foi considerada a distribuição binomial negativa, com média dependendo das estações do ano e dos logaritmos neperianos dos hormônios, e considerando o efeito aleatório de cada fêmea. Como duas observações de estradiol são iguais a zero, foi usado o logaritmo de $E2+1$, $\log(E2+1)$. Desconsideramos as observações faltantes tanto em hormônios quanto em estágios, obtendo assim 70 observações.

Os pacotes lme4 e glmmTMB, do software R, foram usados para ajustar os modelos propostos. Segundo Wooldridge(2016), a saída do modelo log-log deve apresentar exponenciação dos coeficientes relacionados às variáveis sem transformação logarítmica e o valor original dos coeficientes relacionados às variáveis em log. Os resultados das tabelas estão desta forma.

6.1.1 Modelagem do estágio I

O número médio de folículos ovarianos no estágio I foi modelado, com os efeitos fixos de estações, $\log(E2+1)$ e a interação entre eles. Aplicando o teste de razão de verossimilhanças para comparar os modelos com e sem interação entre $\log(E2+1)$ e as estações, encontrou-se um valor $p = 0,191$. Assim, não há evidências para rejeitar a hipótese de que não existe interação.

Pela Tabela A.3, o número médio de folículos ovarianos no estágio I, no verão, considerando $\log(E2 + 1)$ igual a 0, está entre 27,334 e 57,321 com 95% de confiança. Fixado o valor de $\log(E2+1)$, o número médio de folículos na primavera é 33,4% do valor médio no verão (valor- $p < 0,001$); o número médio de folículos no outono é 55,7% do valor médio no verão (valor- $p = 0,002$); o número médio de folículos no inverno é 39,2% do valor médio no verão (valor- $p < 0,001$).

Pela Tabela A.4, o número médio de folículos ovarianos no estágio I, no outono, considerando $\log(E2 + 1)$ igual a 0, está entre 15,293 e 31,819 com 95% de confiança. Fixado o valor de $\log(E2+1)$, o número médio de folículos na primavera é 59,9% do valor médio no outono (valor- $p = 0,030$); o número médio de folículos no inverno não difere do número médio no outono (valor- $p = 0,068$).

Pela Tabela A.5, o número médio de folículos ovarianos no estágio I, no inverno, considerando $\log(E2 + 1)$ igual a 0, está entre 9,744 e 24,762 com 95% de confiança. O número médio de folículos na primavera não difere do número médio no inverno (valor- $p = 0,531$).

Pela Tabela A.6, o número médio de folículos ovarianos no estágio I, na primavera, considerando $\log(E2 + 1)$ igual a 0, está entre 8,349 e 20,908 com 95% de confiança.

Esses resultados mostram que o número médio de folículos é maior no verão do que nas demais estações, como mostra a Figura B.13.

A análise de resíduos feita com o pacote DHARMA (Hartig, 2019), na Figura B.15, mostra que o modelo está bem ajustado aos dados.

6.1.2 Modelagem do estágio II

O número médio de folículos ovarianos no estágio II foi modelado, com os efeitos fixos de estações, $\log(E2+1)$ e a interação entre eles. Como a análise descritiva já sugeria que o número médio de folículos não parecia variar muito ao longo das estações, foi aplicado o teste de razão de verossimilhanças para comparar o modelo completo com o modelo sem nenhum efeito, encontrando-se um valor $p = 0,836$. Assim, não há evidências para rejeitar o modelo sem nenhum efeito, ou seja, a média do número de folículos no estágio II não varia conforme as estações do ano e não muda de acordo com E2.

A análise de resíduos feita com o pacote DHARMA (Hartig, 2019), na Figura B.16, mostra que o modelo apenas com o intercepto está bem ajustado aos dados.

6.1.3 Modelagem do estágio III

Primeiro, considera-se o modelo completo, onde as variáveis explicativas são as estações, $\log(E2+1)$, $\log P4$ e a interação entre $\log(E2+1)$ e as estações. Aplicando o teste de razão de verossimilhanças para comparar os modelos com e sem interação entre $\log(E2+1)$ e as estações, encontrou-se um valor $p = 0,028$. Assim, há evidências para rejeitar a hipótese de que não existe interação.

Foi proposto então um modelo reduzido, agrupando as estações de acordo com a análise descritiva, realizando um teste de razão de verossimilhanças para a hipótese de que as médias no estágio III são iguais no outono e no verão e iguais na primavera e no inverno, que não foi rejeitada (valor $p = 0,066$). Pela Tabela A.7, concluímos que a diferença entre a média no outono/verão e a média no inverno/primavera é significativa (valor $p = 0,001$), aumentando quando passamos do verão/outono para o inverno/primavera (Figura B.13).

A variável $\log P4$ e a interação entre estações e a $\log(E2+1)$ não se mostram significativos (valor $p = 0,415$ e valor $p = 0,060$, respectivamente), mas foram mantidos já que parte do objetivo do estudo é identificar como esses hormônios influenciam os estágios.

Notamos também, que o número médio de folículos no estágio III aumenta com o aumento de E2.

A análise de resíduos feita com o pacote DHARMA (Hartig, 2019), na Figura B.17, mostra que o modelo reduzido está bem ajustado aos dados.

6.1.4 Modelagem do estágio IV

No processo de modelagem do número de folículos no estágio IV, percebeu-se que 80% das observações são nulas, principalmente no verão e outono, aumentando muito pouco nas estações seguintes. Isso trouxe um viés ao modelo, com estimativas que não tinham significados práticos. Como o estudo não tem objetivo de predição, optou-se por analisar o comportamento dessa variável somente pela análise descritiva.

6.2 Modelo de regressão para os hormônios

Devido ao comportamento dos hormônios, ambos serão modelados com a distribuição Normal Inversa, com ligação logarítmica para a média, em função das estações do ano como efeito fixo, e considerando o efeito aleatório de fêmea. Desconsideramos as observações faltantes, assim 83 observações foram utilizadas no modelo.

Para comparar as estações e simplificar o modelo, procuramos nos gráficos de perfis médios, estações com comportamentos semelhantes, as agrupamos e realizamos o teste de razão de verossimilhança a fim de validar o agrupamento.

Para que as estimativas sejam interpretáveis, calculamos o exponencial de cada estimativa obtida e o exponencial dos limites inferior e superior dos intervalos de confiança.

O pacote lme4 do software R foi usado para a estimação dos parâmetros. Todas as tabelas mostram os resultados da saída da análise já exponencializados.

6.2.1 Modelagem de P4

Ao analisar o modelo para P4 (Tabela A.8) com verão como casela de referência, percebe-se que outono é a única estação que mostra uma queda significativa na média (valor $p < 0,001$). Como a análise descritiva também sugeriu essa relação, foi proposto um modelo reduzido, que busca testar a diferença de outono com as demais estações.

O teste de razão de verossimilhanças foi realizado e concluímos que a média de P4 é a mesma nas estações verão, inverno e primavera (valor $p=0,244$). Pela Tabela A.9,

a média de progesterona no outono é 13,8% do valor médio do verão/inverno/primavera (valor $p < 0,001$), como mostra a Figura B.7.

A análise de resíduos feita com o pacote DHARMA (Hartig, 2019), na Figura B.18, mostra que o modelo está bem ajustado aos dados

6.2.2 Modelagem de E2

Queremos entender como a média do hormônio E2 se comporta ao longo das estações.

Como E2 apresentava duas medidas com valores iguais a zero, a modelagem foi feita com E2+1, e o intercepto foi calculado como a exponencial da estimativa, menos uma unidade.

Ao analisar o modelo para E2 (Tabela A.10), com verão como casela de referência, percebe-se que inverno é a única estação que mostra um aumento significativo na média (valor $p < 0,022$). Como a análise descritiva sugeriu essa relação, foi proposto um modelo reduzido, que busca testar a diferença de inverno com as demais estações.

Foi realizado um teste de razão de verossimilhanças e conclui-se que não há diferença significativa entre as médias de E2 nas estações outono e verão (valor $p = 0,309$). Concluímos então, pela Tabela A.11, que a média de E2 no inverno é maior do que a média no outono, verão ou primavera (valor $p < 0,001$), como mostra a Figura B.8.

A Figura B.19, mostra que o modelo para o estradiol não está tão bem ajustado (pacote DHARMA – Hartig, 2019) como o hormônio anterior, mas como na análise descritiva observamos alguns valores muito discrepantes, é esperado dificuldades em encontrar um modelo que se ajuste bem aos dados.

7. Conclusões

As mudanças de estações são os acontecimentos que mais influenciam nos valores das médias dos hormônios e dos folículos ovarianos.

Para o hormônio progesterona, a média no outono é menor do que nas demais estações. Para estradiol, o inverno é a estação com maiores valores da média.

A média de folículos no estágio I cresce quando se muda da primavera para o verão, e volta a valores menores quando chega o outono. A média dos folículos no estágio II não se altera ao longo do ano. Já os estágios III e IV se comportam de forma parecida

ao longo do ano, sendo as médias de folículos mais baixas no verão e no outono, aumentando no inverno e na primavera. O hormônio estradiol influencia na média do número de folículos do estágio III. Não existem evidências de que o hormônio progesterona exerça o efeito no valor da média do número de folículos ovarianos dos estágios III e IV.

APÊNDICE A

Tabelas

Tabela A.1: Medidas resumos dos dados (n=90)

	Média	DP	Mín	Q1	Mediana	Q3	Máx	NA's
E2	86,32	199,26	0,00	4,89	12,13	86,46	1222,40	7
P4	3,09	7,05	0,10	0,44	0,72	1,76	49,00	7
Estágio I	20,00	14,42	1,00	10,00	15,00	29,00	62,00	17
Estágio II	5,37	6,26	0,00	0,00	2,00	10,00	20,00	17
Estágio III	5,63	6,98	0,00	0,00	1,00	12,00	26,00	17
Estágio IV	1,08	2,97	0,00	0,00	0,00	0,00	17,00	14
Oviduto	1,97	6,11	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00	12

Tabela A.2: Valores das quantidades de folículos ovarianos, em cada estágio, ao longo das estações

	Estágio I	Estágio II	Estágio III	Estágio IV	Total
Inverno	303	116	236	48	703
Outono	466	153	46	2	667
Primavera	121	35	95	23	274
Verão	570	88	34	9	701
Total	1460	392	411	82	2345

Tabela A.3 : Estimativas, intervalo com 95% de confiança e valor-p, para a modelagem de estágio I, tendo o verão como casela de referência.

Efeitos	Estimativa	Intervalo 95%	Valor p
Intercepto	39,583	27,334 – 57,321	<0,001
verão	Referência		
primavera	0,334	0,206 – 0,541	<0,001
outono	0,557	0,384 – 0,808	0,002
inverno	0,392	0,258 – 0,597	<0,001
log E2+1	-0,050	0,863 – 1,048	0,313
Efeito Aleatório			
σ^2	0,011		

desvio padrão 1,028

Tabela A.4 : Estimativas, intervalo com 95% de confiança e valor-p, para a modelagem de estágio I, tendo outono como casela de referência.

Efeitos	Estimativa	Intervalo 95%	Valor p
Intercepto	22,059	15,293 – 31,819	<0,001
outono	Referência		
inverno	0,704	0,483 – 1,027	0,068
verão	1,794	1,238 – 2,602	0,002
primavera	0,599	0,377 – 0,950	0,030
log E2+1	-0,050	0,863 – 1,048	0,313
Efeito Aleatório			
σ^2	0,011		
desvio padrão	1,028		

Tabela A.5: Estimativas, intervalo com 95% de confiança e valor-p, para a modelagem de estágio I, tendo o inverno como casela de referência.

Efeitos	Estimativa	Intervalo 95%	Valor p
Intercepto	15,533	9,744 – 24,762	<0,001
inverno	Referência		
verão	2,548	1,674 – 3,879	<0,001
primavera	0,851	0,512 – 1,412	0,531
outono	1,420	0,974 – 2,070	0,068
log E2+1	-0,050	0,863 – 1,048	0,313
Efeito Aleatório			
σ^2	0,011		
desvio padrão	1,028		

Tabela A.6: Estimativas, intervalo com 95% de confiança e valor-p, para a modelagem de estágio I, tendo a primavera como casela de referência.

Efeitos	Estimativa	Intervalo 95%	Valor p
Intercepto	13,213	8,349 – 20,908	<0,001

primavera	Referência		
outono	1,970	1,052 – 2,649	0,030
inverno	1,176	0,708 – 1,951	0,531
verão	2,996	1,849 – 4,854	<0,001
log E2+1	-0,050	0,863 – 1,048	0,313
Efeito Aleatório			
σ^2	0,011		
desvio padrão	1,028		

Tabela A.7: Estimativas, intervalo com 95% de confiança e valor-p para modelagem de estágio III, tendo verão ou outono como casela de referência.

Efeitos	Estimativa	Intervalo 95%	Valor p
Intercepto	0,531	0,135 - 2,085	0,364
inverno_primavera	15,903	3,749 - 67,461	<0,001
inverno_primavera:log E2+1	0,711	0,498 - 1,015	0,06
log E2+1	0,397	1,072 - 2,064	0,018
log P4	0,102	0,866 - 1,416	0,415
Efeito Aleatório			
σ^2	1.388×10^{-9}		
desvio padrão	3.726×10^{-5}		

Tabela A.8: Estimativas, intervalo com 95% de confiança e valor-p, para o modelo completo de progesterona, tendo verão como casela de referência.

Efeitos	Estimativa	Intervalo 95%	Valor p
Intercepto	2,139	1,107 – 4,134	0,024
verão	Referência		
primavera	2,893	0,809 – 10,344	0,102
outono	0,266	0,129 – 0,546	<0,001
inverno	1,838	0,648 – 5,212	0,252
Efeito Aleatório			
σ^2	0,000		

desvio padrão 0,000

Tabela A.9: Estimativas, intervalo com 95% de confiança e valor-p, para o modelo reduzido de progesterona - inverno, primavera ou verão como referência.

Efeitos	Estimativa	Intervalo 95%	Valor p
Intercepto	4,113	2,462 – 6,870	<0,001
Outono	0,138	0,076 – 0,250	<0,001
Efeito Aleatório			
σ^2	0,000		
desvio padrão	0,000		

Tabela A.10: Estimativas, intervalo com 95% de confiança e valor-p, para o modelo completo de estradiol, verão como casela de referência.

Efeitos	Estimativa	Intervalo 95%	Valor p
Intercepto	23,079	3.203 – 144,278	<0,001
verão	Referência		
primavera	1,425	0,247 – 8,228	0,692
outono	2,257	0,801 – 6,361	0,124
inverno	15,228	1,487 – 155,907	0,022
Efeito Aleatório			
σ^2	0,353		
desvio padrão	0,594		

Tabela A.11: Estimativas, intervalo com 95% de confiança e valor-p, para o modelo reduzido de estradiol - primavera, verão ou outono como referência.

Preditores	Estimativa	Intervalo 95%	Valor p
Intercepto	35,606	35,557 – 35,656	0,266
Inverno	9,450	9,437 – 9,4637	<0,001
Efeito Aleatório			

σ^2	0,413
desvio padrão	0,642

APÊNDICE B

Figuras

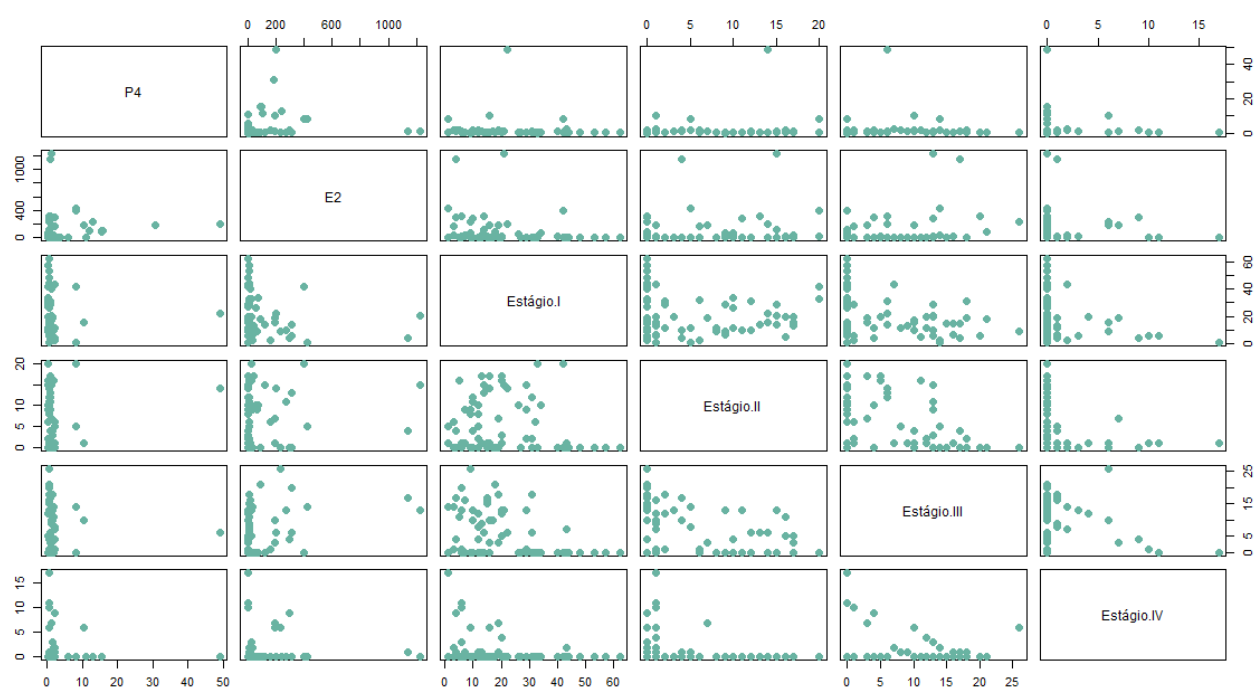


Figura B.1 Matriz de dispersão entre as dosagens de hormônios e quantidades de folículos.

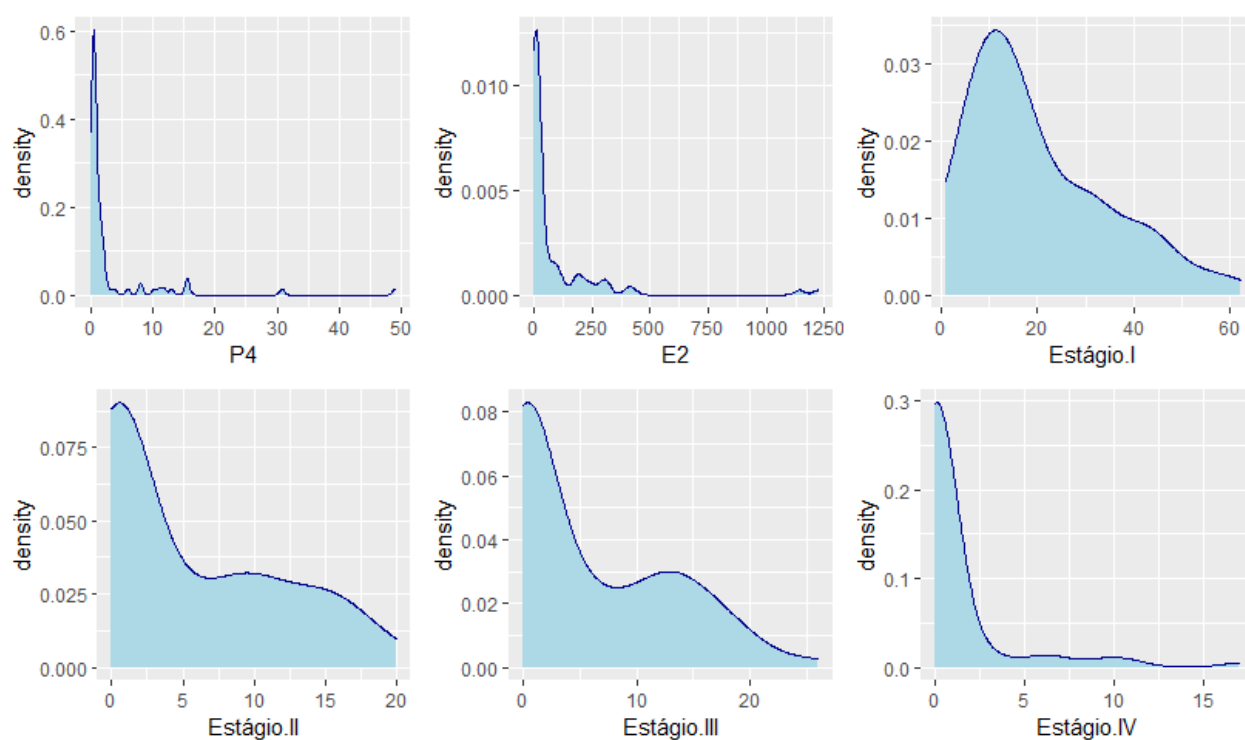


Figura B.2 Densidade das dosagens de hormônios e quantidades de folículos.

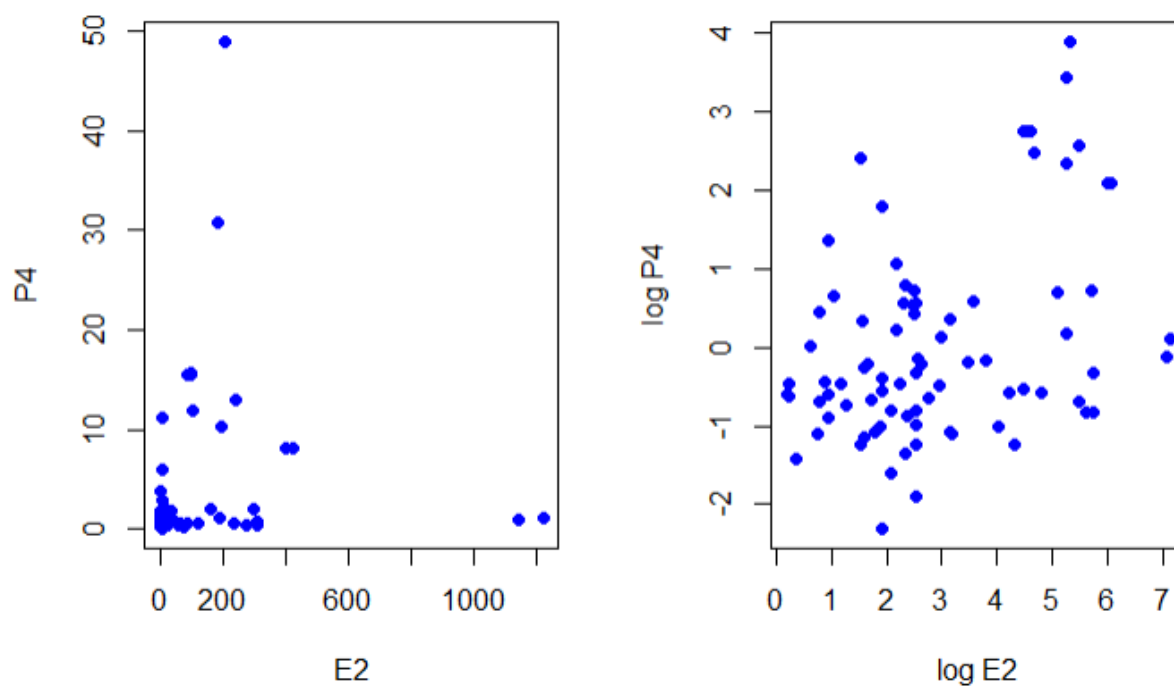


Figura B.3 Diagrama de dispersão entre P4 e E2 e entre log P4 e log E2.

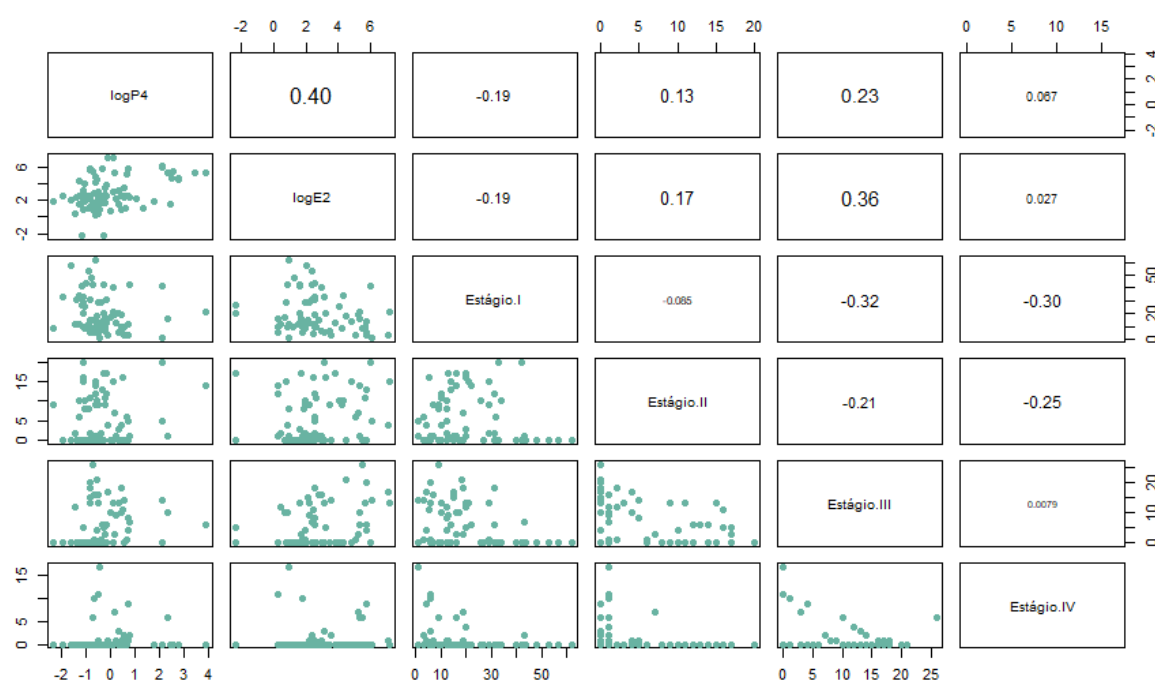


Figura B.4 Matriz de dispersão e coeficientes de correlação de pearson entre o logaritmo das dosagens de hormônios e as quantidades de folículos.

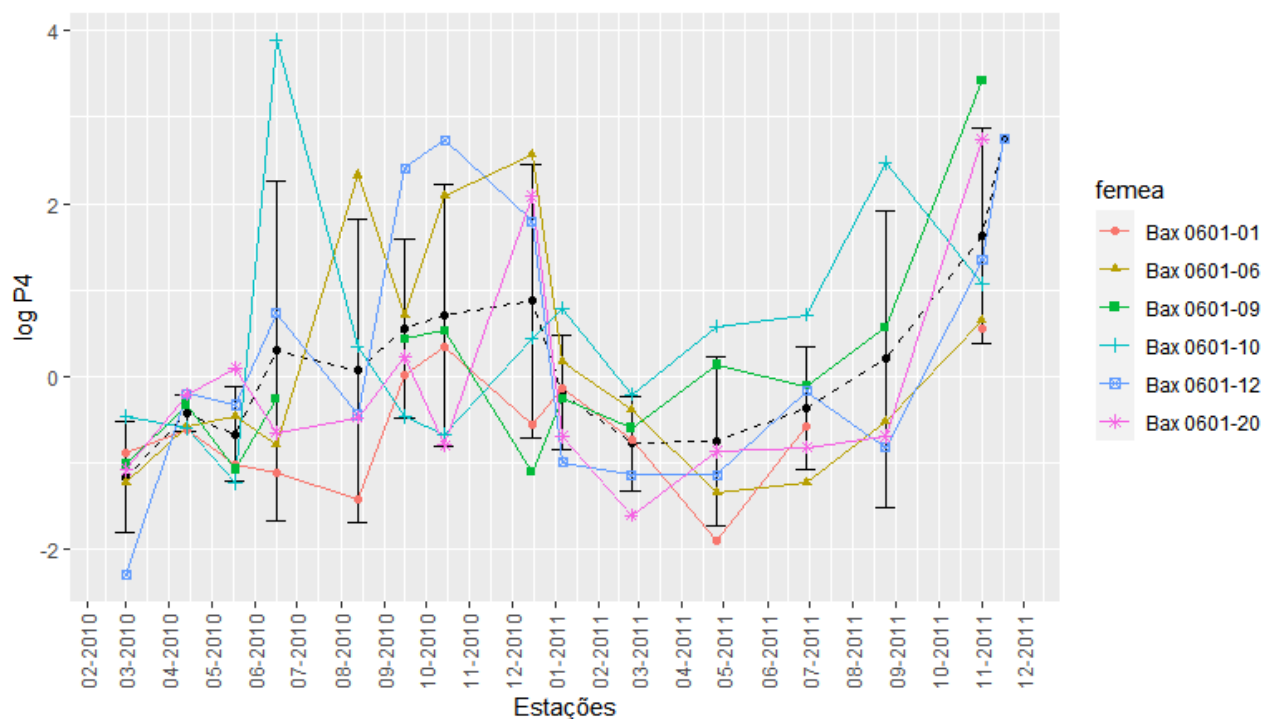


Figura B.5 Perfis individuais e perfil médio (linha preta pontilhada) com barra de erro padrão do logaritmo de P4

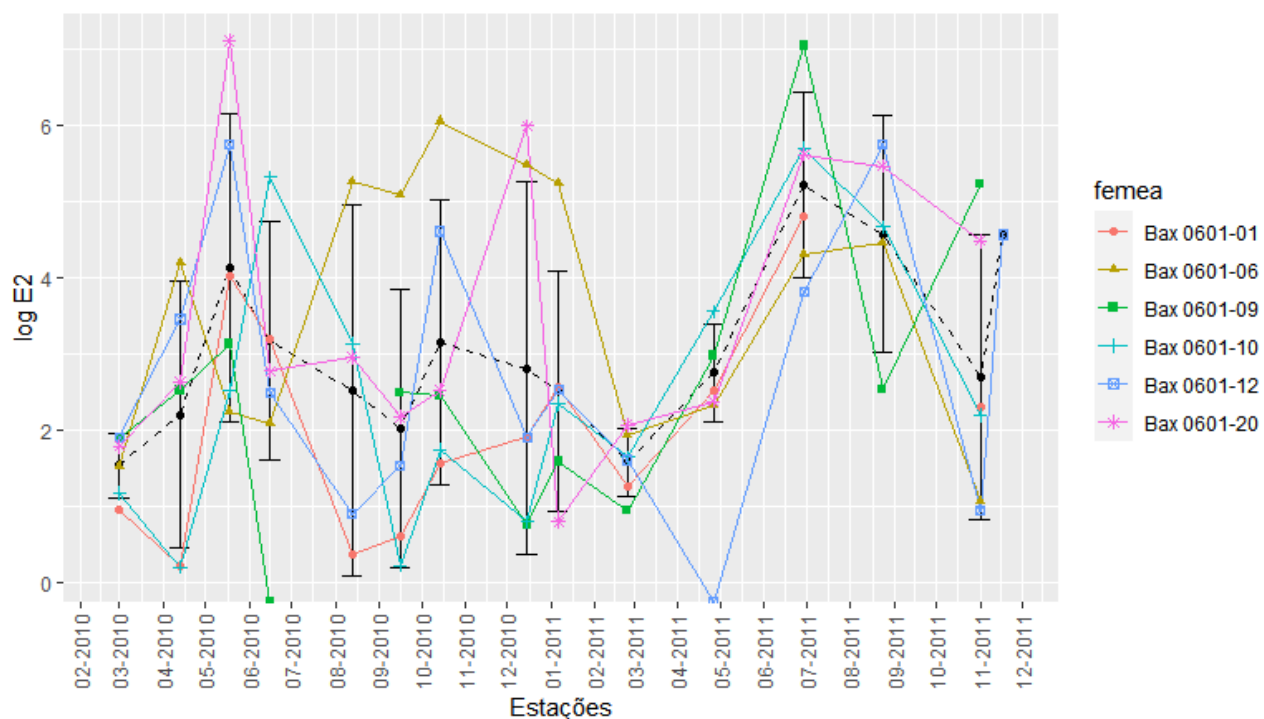


Figura B.6 Perfis individuais e perfil médio (linha preta pontilhada) com barra de erro padrão do logaritmo de E2.

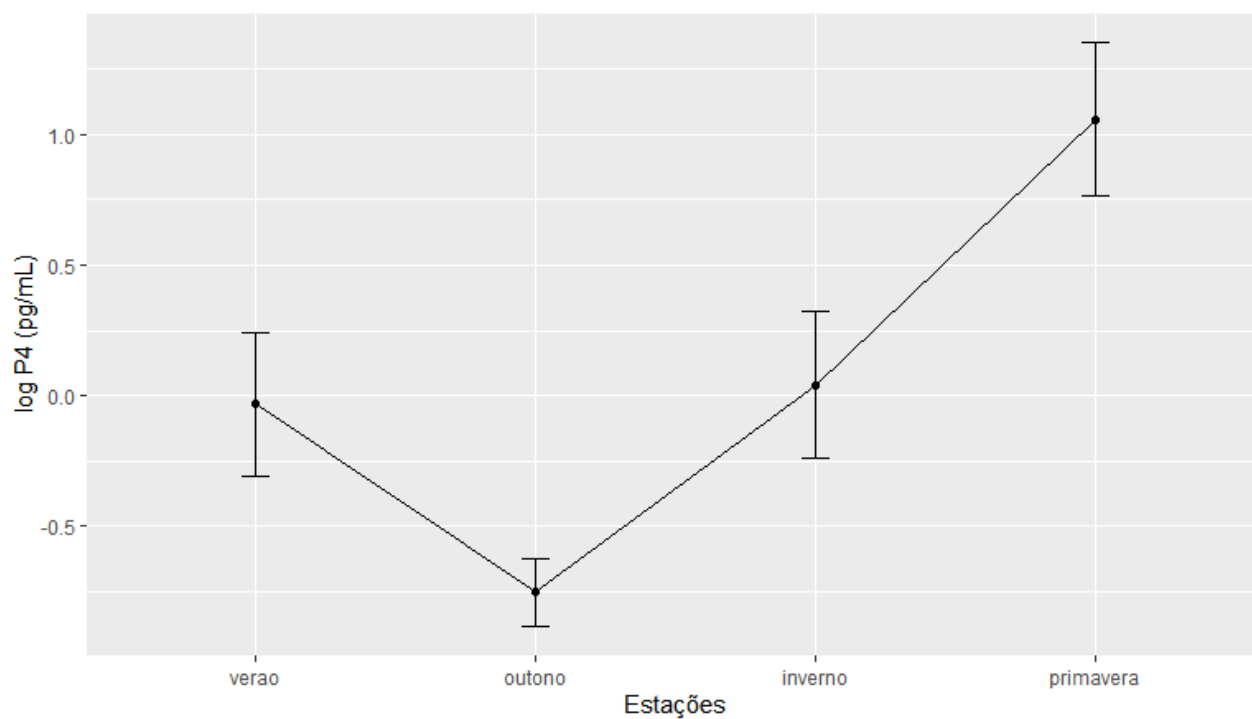


Figura B.7 Perfil médio com barra de erro padrão do logaritmo de P4, ao longo das estações.

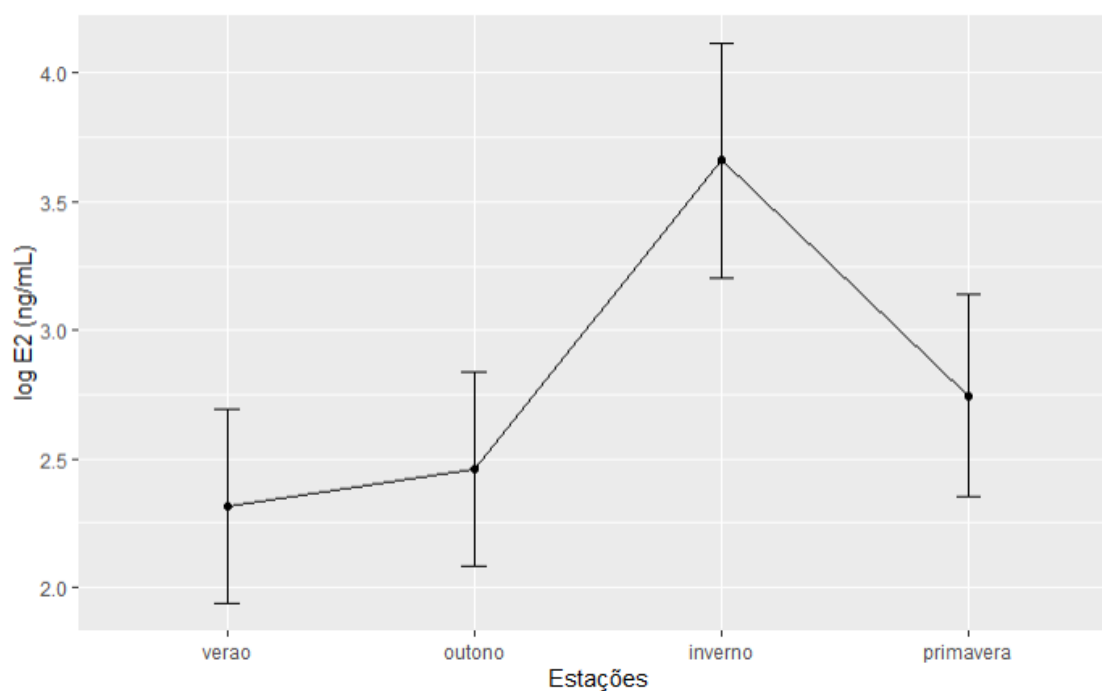


Figura B.8 Perfil médio com barra de erro padrão do logaritmo de E2, ao longo das estações.

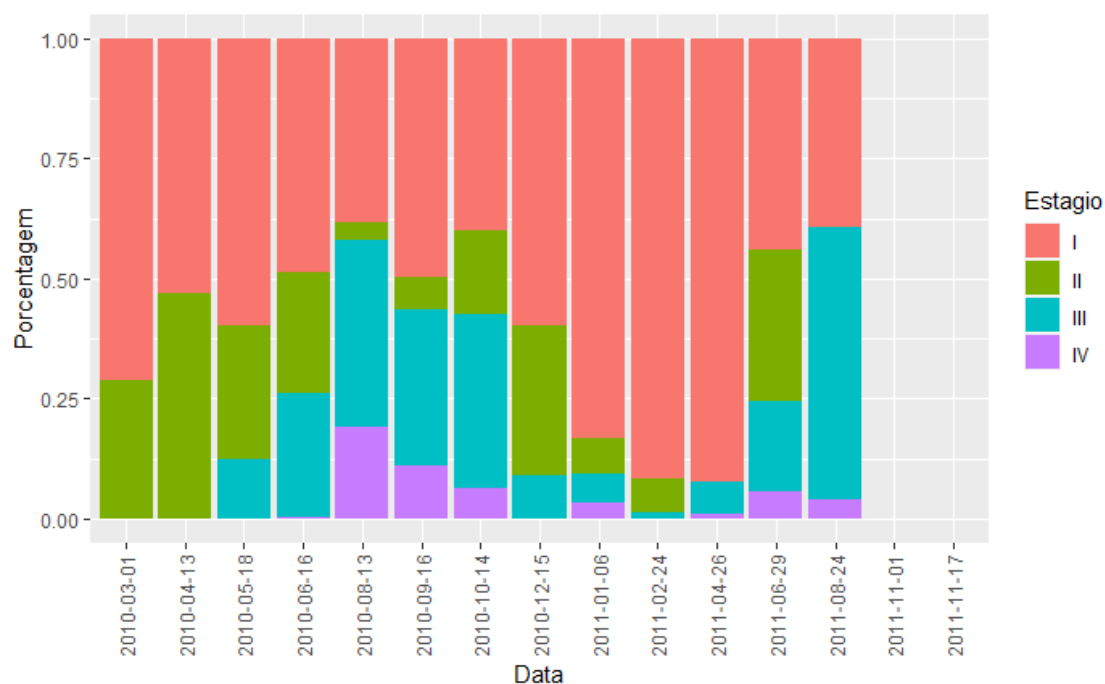


Figura B.9 Gráfico de colunas empilhadas, mostrando a porcentagem de folículos em cada estágio, ao longo das datas de coletas.

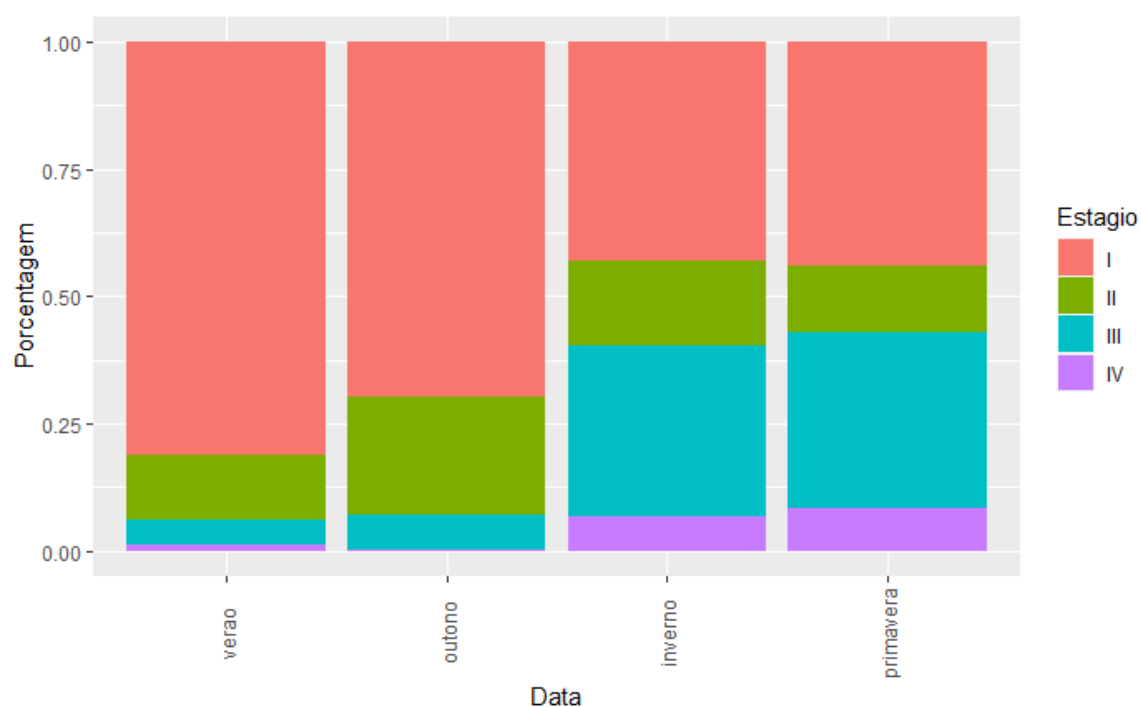


Figura B.10 Gráfico de colunas empilhadas, mostrando a porcentagem de folículos em cada estágio, ao longo das estações.

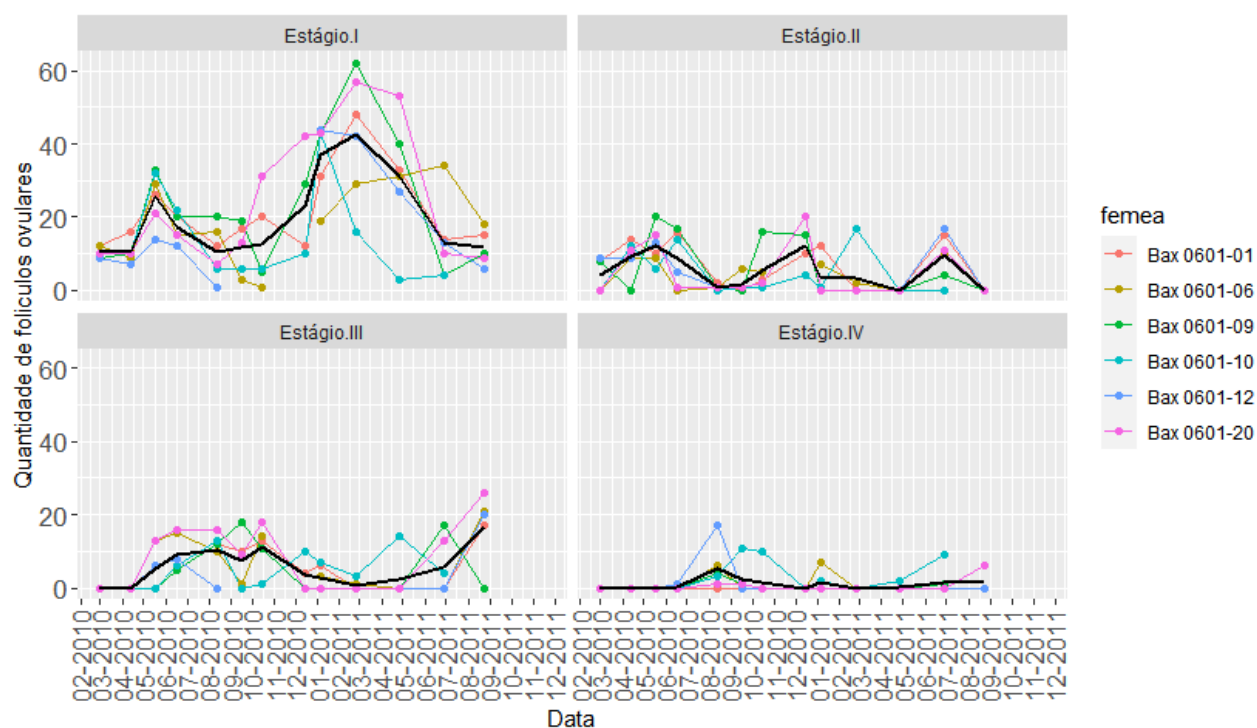


Figura B.11 Gráfico de perfis individuais e de perfil médio (linha preta) da quantidade de folículos ovarianos em cada estágio, ao longo das datas de coleta.

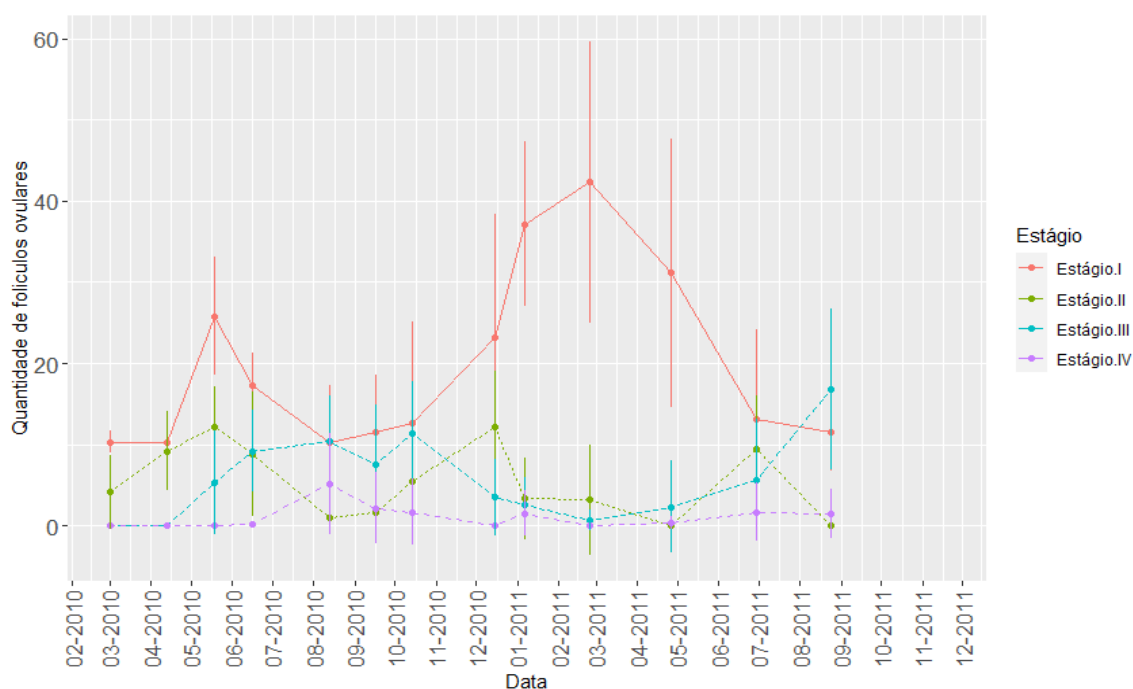


Figura B.12 Gráfico de perfis médios com barra de erro padrão, dos folículos ovarianos em cada estágio, ao longo das datas de coleta.

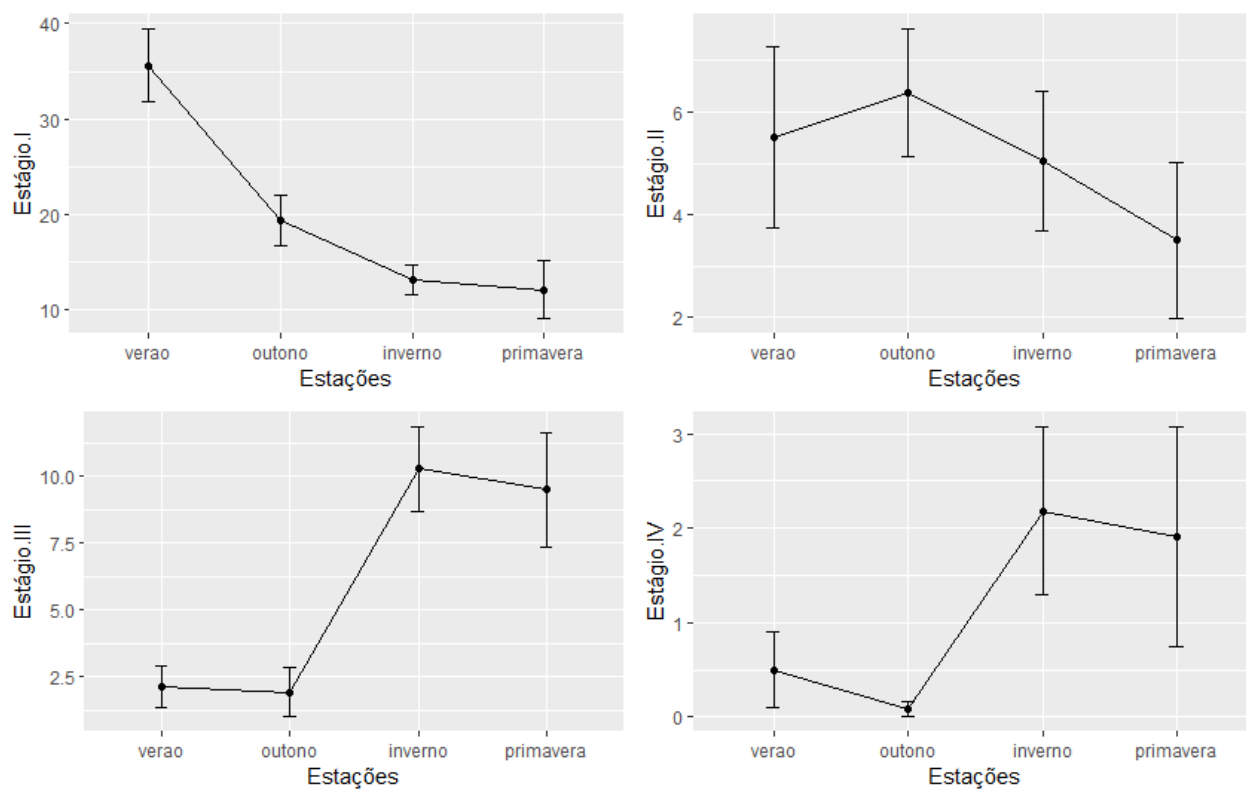


Figura B.13 Gráfico de perfis médios com barra de erro padrão, dos folículos em cada estágio, ao longo das estações.

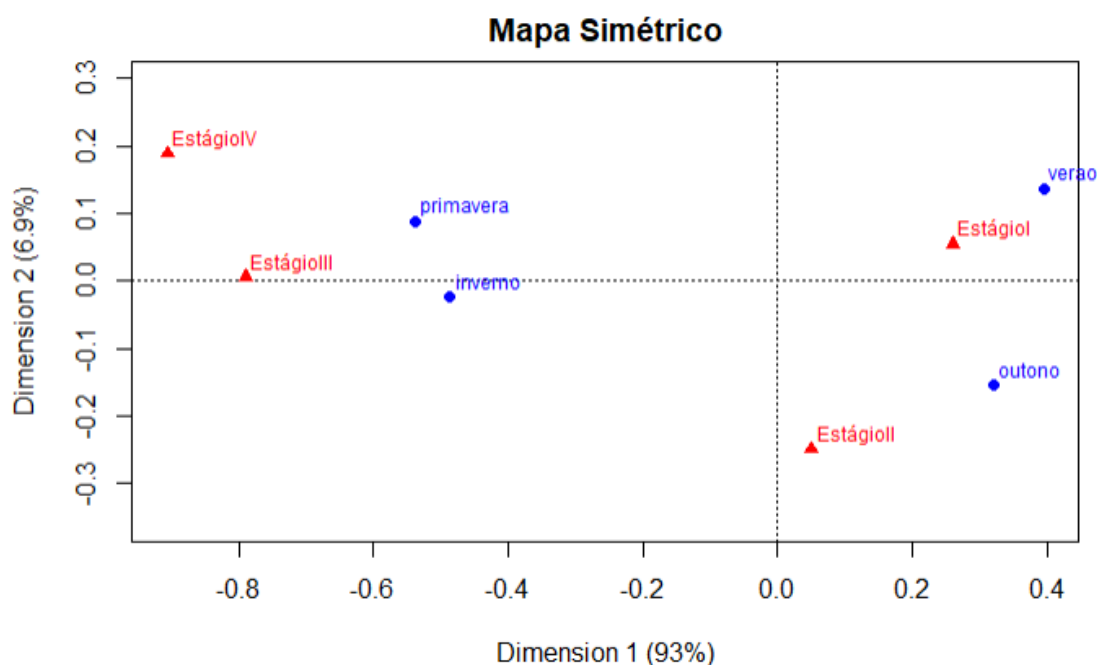


Figura B.14 Mapa simétrico da análise de correspondência.

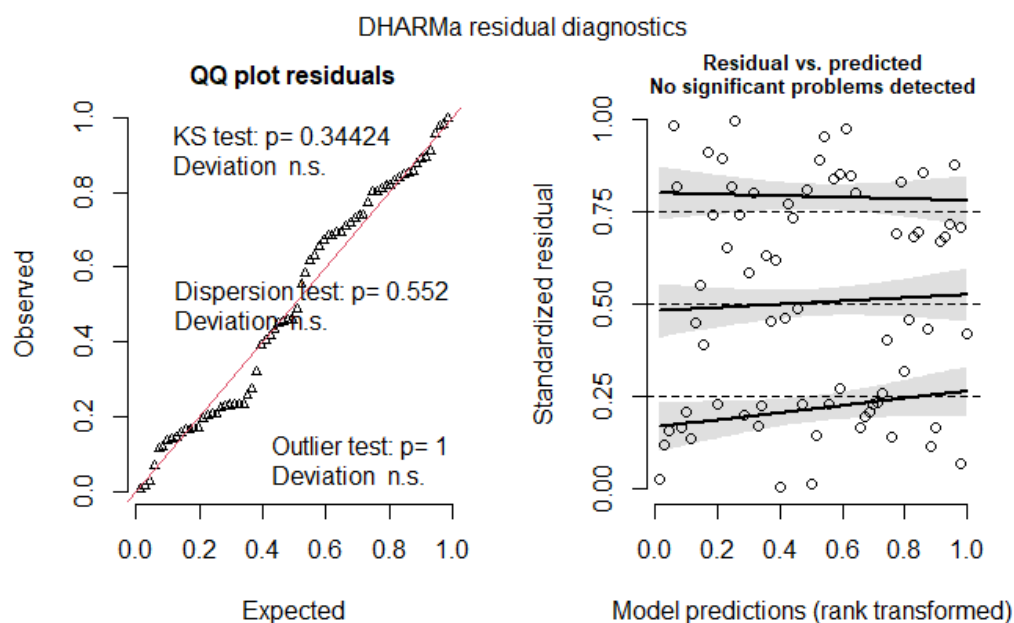


Figura B.15: Saída DHARMA para a modelagem de estágio I

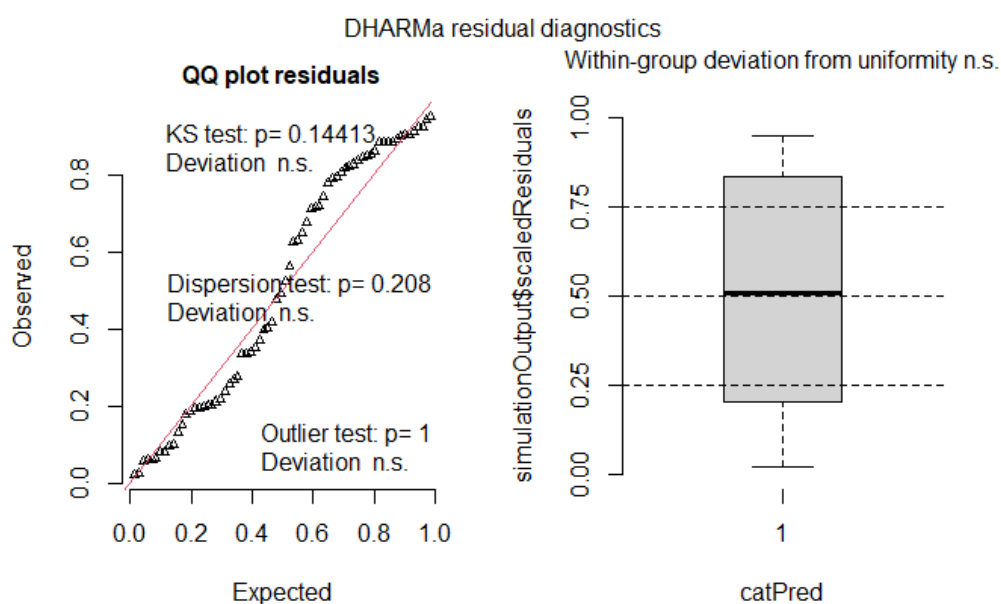


Figura B.16: Saída DHARMA para a modelagem de estágio II

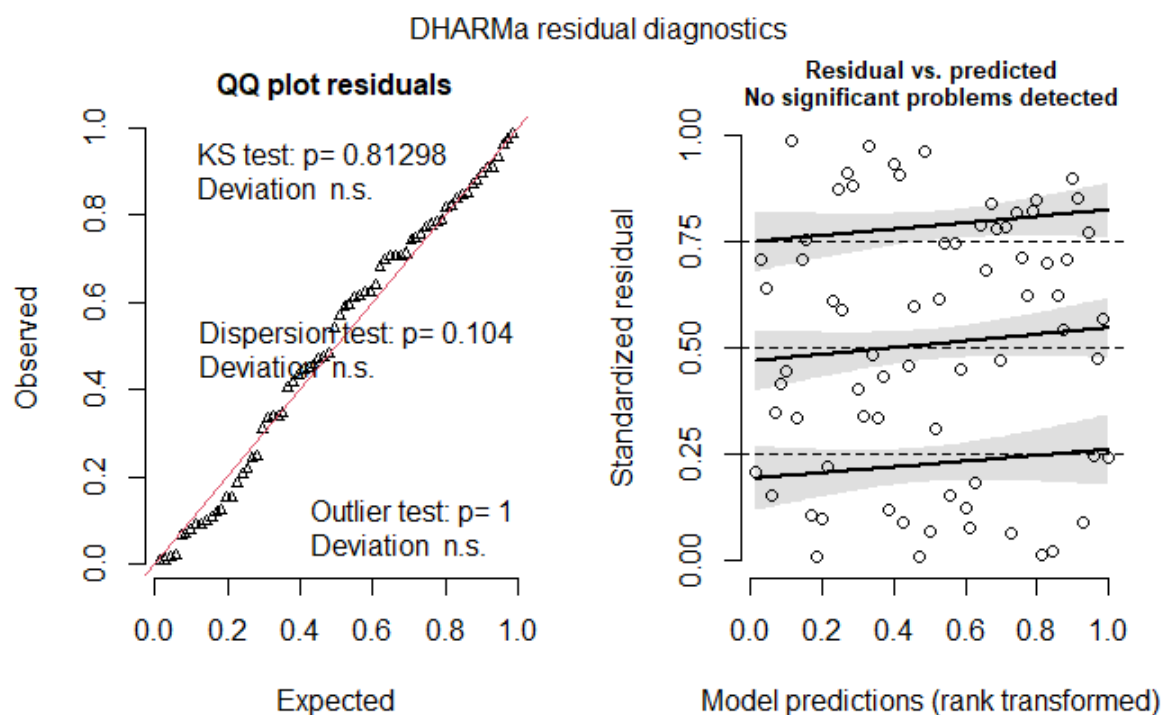


Figura B.17: Saída DHARMA para a modelagem de estágio III

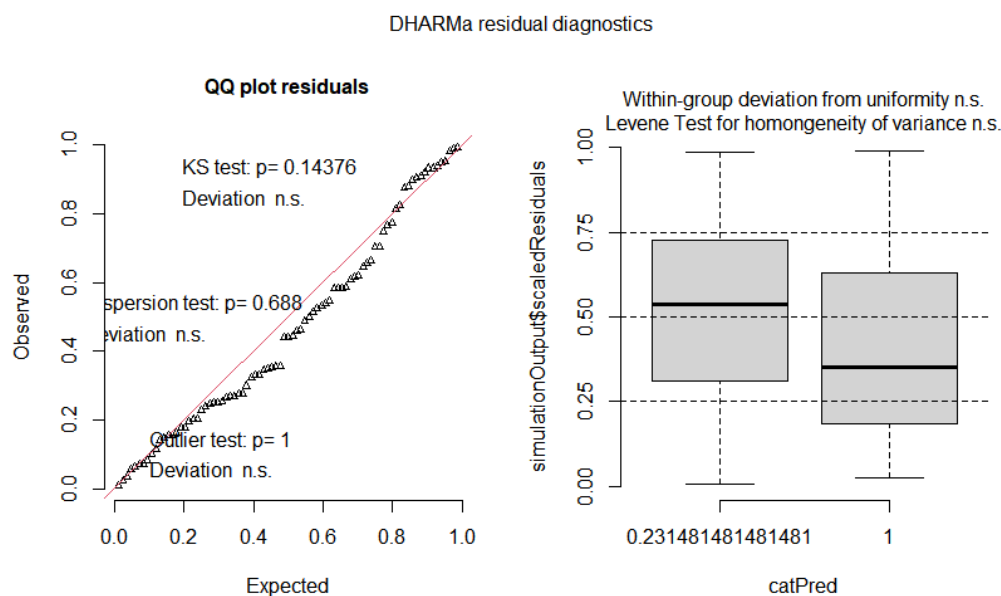


Figura B.18: Saída DHARMA para a modelagem de Progesterona

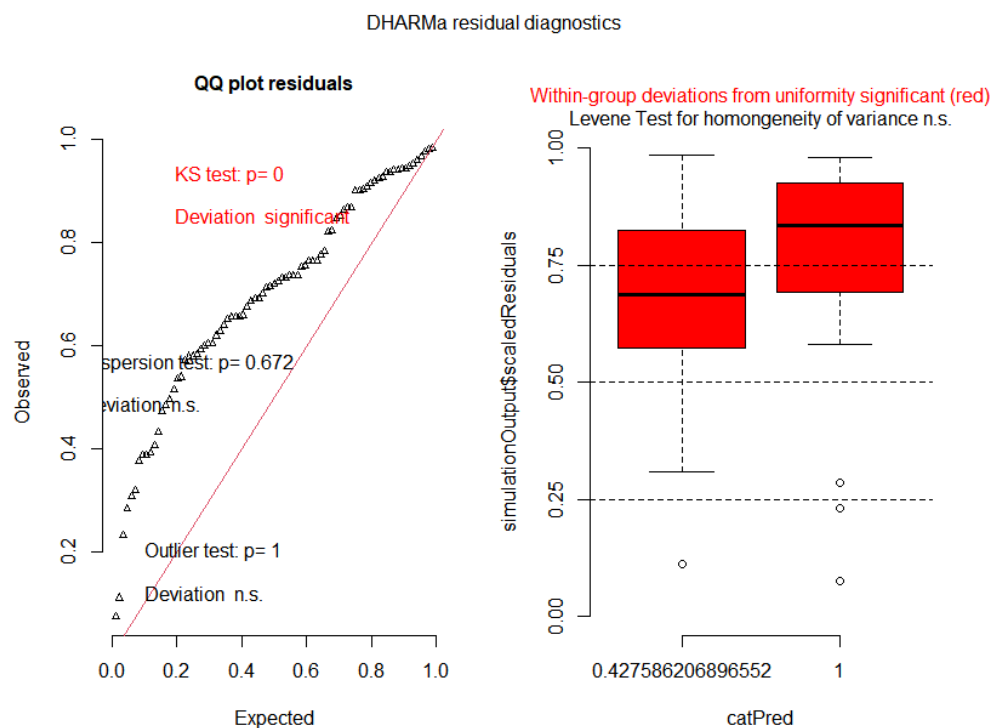


Figura B.19: Saída DHARMA para a modelagem de Estradiol

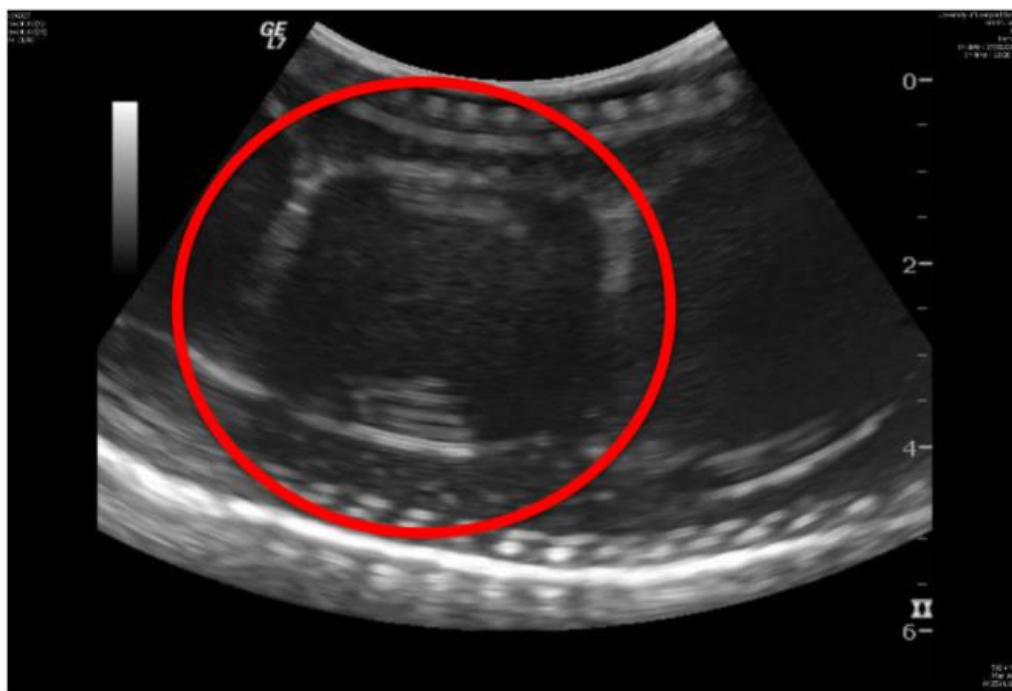
ANEXO



Aparelho reprodutor da Jararaca. (i) infundíbulo, onde fica estocado o esperma, (fo) folículo ovariano, cujos estágios são estudados neste trabalho, (ua) útero anterior, (up) útero posterior e (v) vagina. (Almeida-Santos, 2005)



Exame ultrassonográfico: parte do corpo da serpente é contido dentro de um tubo plástico transparente (lado esquerdo). a parte livre fica imersa em água aquecida, dentro de uma caixa plástica.



Folículo estágio I: a falta de vitelo demonstra o interior escuro



Folículo estágio IV: o vitelo aparece acinzentado.



Coleta de sangue pela veia caudal