

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP
RELATÓRIO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA

TÍTULO: Relatório de análise sobre o projeto: “Alopurinol como anti-oxidante na insuficiência renal aguda em ratos: resposta funcional é tempo dependente?”.

PESQUISADORA: Cassiane Dezoti

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Fernandes Vattimo

INSTITUIÇÃO: Escola de Enfermagem da USP - EEUSP

FINALIDADE: Publicação / Iniciação científica

RESPONSÁVEIS PELA ANÁLISE: Prof^a. Dr^a. Denise A. Botter
Paulo do C. Hubert Jr.

REFERÊNCIA DESTE TRABALHO: BOTTER, D. A. e HUBERT, P. C. **Relatório de análise estatística sobre o projeto: “Alopurinol como anti-oxidante na insuficiência renal aguda em ratos: resposta funcional é tempo dependente?”.** São Paulo, IME-USP, 2004. (RAE – CEA - 04P09)

FICHA TÉCNICA

REFERÊNCIAS:

BUSSAB, W. O. e MORETTIN, P. A. (2002). **Estatística básica**. 5. ed. São Paulo: Saraiva. 526p.

MCCULLAGH, P. and NELDER, J. A. (1989). **Generalized Linear Models**. London: Chapman and Hall. 511p.

PAULA, G. A. (2004). **Modelos de Regressão com Apoio Computacional**. São Paulo: disponível em <http://www.ime.usp.br/~giapaula/livro.pdf> (não publicado)

BOTTER, D. A.; FERRARI, S. L. P. e OSHIRO, C. H. (2001). **Relatório de Análise Estatística sobre o projeto: “Influência dos isômeros *trans* na atividade das enzimas antioxidantes em ratos portadores do tumor de Walker-256”**. São Paulo: IME-USP. (RAE-CEA-01P17)

PROGRAMAS COMPUTACIONAIS UTILIZADOS:

Microsof Excel (versão XP)
MINITAB (versão 13)
R Statistical Package (versão 1.8.1)

TÉCNICAS ESTATÍSTICAS UTILIZADAS

Análise descritiva unidimensional (03:010)
Modelos Lineares Generalizados (07:990)

ÁREA DE APLICAÇÃO:

Bioestatística (14:030)

RESUMO

Este estudo refere-se à análise dos efeitos da droga Alopurinol em ratos com Insuficiência Renal Aguda do tipo Isquêmica, bem como às variações do efeito da droga ao longo do tempo.

Os ratos, inicialmente saudáveis, foram submetidos a uma técnica cirúrgica (clampeamento), com o fim de induzir a Insuficiência – sendo portanto necessária igualmente a verificação da eficácia dessa técnica na indução da deficiência. Os ratos foram divididos em oito grupos: controle saudável (sem clampeamento), controle saudável tratado (sem clampeamento, tratado com Alopurinol), e mais seis grupos doentes, três tratados e três não tratados, dois em cada nível de tempo pós-operatório (24, 48 e 72 horas). As variáveis de interesse são o Volume urinário, a Clearance de Creatinina e a Fração de Excreção de Sódio.

Para comparar os grupos controle saudável contra doente não tratado 24 horas, e controle saudável contra controle saudável tratado, foram aplicados testes t homocedásticos ou modelos Gama (dependendo da aceitação da hipótese de normalidade), encontrando diferença significativa apenas entre o controle saudável e o doente não tratado 24 horas na variável Clearance – donde concluímos que o procedimento de clampeamento não foi capaz de produzir alterações nas variáveis Volume e Fração de Excreção de Sódio, e que o tratamento com Alopurinol não deve produzir efeito em indivíduos saudáveis.

Para as análises dos efeitos de Tempo e Alopurinol, foram utilizados modelos lineares generalizados, com distribuição gama e ligação logarítmica para as variáveis Volume e Clearance de Creatinina, e um modelo de quase-verossimilhança para a variável Fração de Excreção de Sódio.

Constatamos que para a variável Fração de Excreção de Sódio apenas o efeito de tempo foi considerado significativo, enquanto que na variável Clearance de Creatinina obtivemos significância em todos os efeitos (incluindo a interação entre tratamento e tempo).

Para a variável Volume, não houve nenhum efeito significativo – nem da droga nem do tempo.

ÍNDICE

<u>1. Introdução</u>	5
<u>2. Descrição do Estudo</u>	5
<u>3. Descrição das Variáveis</u>	10
<u>4. Análise descritiva</u>	10
<u>5. Análise Inferencial</u>	14
<u>5.1 – Comparações entre controles (Sham, Sham + Alopurinol e Isquemia)</u>	14
<u>5.3 – Fração de Excreção de Sódio</u>	17
<u>5.4 – Clearance de Creatinina</u>	19
<u>6. Conclusão</u>	22
<u>Apêndice A - Boxplots</u>	23
<u>Apêndice B - Gráficos de médias</u>	26
<u>Apêndice C- Gráficos de dispersão</u>	32
<u>Apêndice D - Testes para grupos Sham X Isquemia e Sham X Sham + Alo</u>	39
<u>Apêndice E - Diagnósticos</u>	50
<u>Apêndice F - Resultados dos ajustes – modelos finais selecionados</u>	61

1. Introdução

A Insuficiência Renal Aguda (IRA) tem se mantido nos últimos trinta anos com taxa de mortalidade constante, em torno de 50%. Sua incidência, no entanto, é alta: cerca de 5% dos pacientes internados em hospitais terciários desenvolvem a doença.

A IRA caracteriza-se por uma súbita redução da função renal e pode ser classificada em três grupos, de acordo com o mecanismo básico que levou à disfunção: pré-renal, renal e pós-renal.

A IRA pré-renal ocorre quando o rim está funcionalmente íntegro, mas a perfusão sanguínea que a ele chega está reduzida (essa redução recebe o nome de isquemia). A manutenção desse quadro pré-renal leva a uma lesão permanente no rim – nesse caso caracteriza-se a IRA renal. Já a IRA pós-renal é causada basicamente pela obstrução das vias urinárias.

Na presença de isquemia, há a formação de radicais livres (oxidação), que são moléculas com um ou mais elétrons desparelhados que têm efeito bastante tóxico para as células.

No Laboratório Experimental de Modelos Animais (LEMA) da EEUSP já foram testados o Alopurinol, a N-acetilcisteína e a Melatonina como anti-oxidantes, sendo que o Alopurinol foi a droga com resultados mais promissores.

Sendo assim, esse estudo foi construído com o objetivo de verificar esse efeito anti-oxidante do Alopurinol na IRA pré-renal e também sua relação com o tempo transcorrido desde a lesão.

No entanto, as dosagens de radicais livres são procedimentos caros e não puderam ser utilizadas nesse trabalho. Por isso, a análise terá como objetivo responder se o Alopurinol causa melhora na função renal do paciente vítima de IRA pré-renal (sendo essa melhora refletida nas mensurações de volume excretado, fração de excreção de sódio e clearance de creatinina), e se essa melhora depende do tempo.

2. Descrição do Estudo

Foram utilizados no estudo 76 ratos machos, da raça Wister, pesando entre 250 e 300g.

Os ratos participantes do estudo estão, num primeiro momento, saudáveis. Por isso, primeiramente a IRA pré-renal deve ser induzida – isso é feito através de um procedimento cirúrgico conhecido como clampeamento. O clampeamento consiste no bloqueio temporário dos pedículos renais do rato, causando a isquemia e, por consequência, a IRA.

Devemos, portanto, além de analisar os efeitos do tratamento com Alopurinol e do tempo, estudar o efeito do clampeamento como método de indução de IRA.

Com isso em mente, teremos grupos saudáveis (que não sofrem o clampeamento, somente a cirurgia que por si só é inócua) com e sem tratamento por alopurinol, e grupos doentes (que sofrem o clampeamento), com e sem Alopurinol, com três tempos de pós-operatório distintos (24, 48 e 72 horas). Cada rato participa apenas uma vez do estudo – por isso, podemos admitir independência entre as amostras.

Os grupos, oito no total, são os seguintes:

Grupo Sham (controle saudável, não tratado): são submetidos à cirurgia, sem o clampeamento – ou seja, a IRA não é induzida nesses ratos. Não recebem nenhum tratamento, e passam por um período pós-operatório de 24 horas.

Grupo Sham + Alo (controle saudável tratado): são submetidos à cirurgia, sem clampeamento – ou seja, a IRA não é induzida nesses ratos. Recebem tratamento com Alopurinol, previamente à cirurgia, e passam por um período pós-operatório de 24 horas.

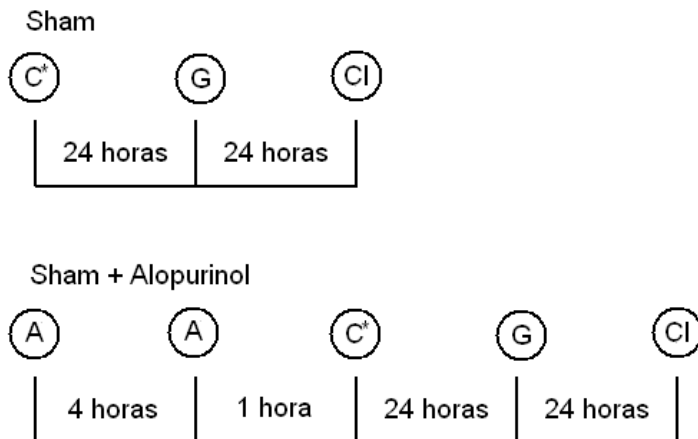
Grupo Isquemia: são submetidos à cirurgia, com o clampeamento do pedículo renal. Não recebem qualquer tratamento, e passam por um período pós-operatório de 24 horas.

Grupos Isquemia 48 e 72 horas (Isq 48 e Isq 72): idênticos ao anterior, exceto pela fase pós-operatória que passa a ser de 48 e 72 horas, respectivamente.

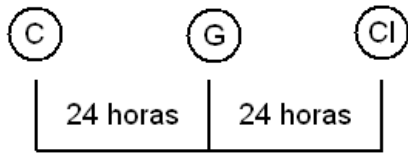
Grupo Isquemia + Alopurinol (Isq + Alo): são submetidos à cirurgia, com o clampeamento do pedículo renal. Recebem tratamento com Alopurinol, previamente à cirurgia, e passam por um período pós-operatório de 24 horas.

Grupos Isquemia + Alopurinol 48 e 72 horas (Isq + Alo 48 e Isq + Alo 72): idênticos ao anterior, exceto pela fase pós-operatória que passa a ser de 48 e 72 horas, respectivamente.

Podemos ver com mais clareza a estrutura do experimento para cada grupo nos esquemas abaixo:



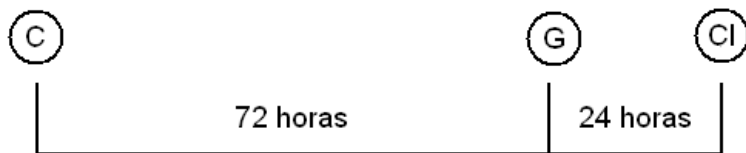
Isquemia



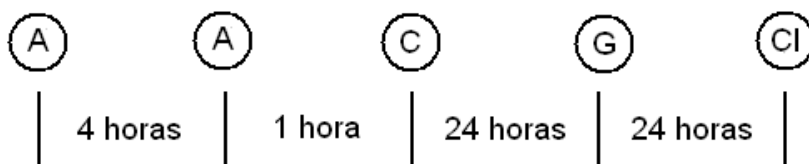
Isquemia 48 horas



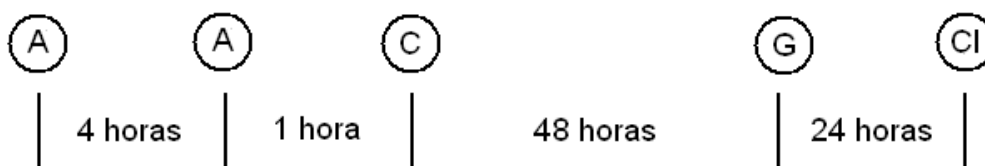
Isquemia 72 horas



Isquemia + Alopurinol



Isquemia + Alopurinol 48 horas



Isquemia + Alopurinol 72 horas



Nos esquemas, **A** representa a administração do Alopurinol, **C** é o momento da cirurgia (sendo que **C*** representa cirurgia sem clampeamento – grupos Sham), **G** representa o retorno à gaiola após o pós-operatório, e **Cl** a tomada das medidas.

É importante notar duas características comuns a todos os grupos:

- a cirurgia é aplicada a todos os ratos, mesmo nos do grupo saudável. A diferença é que os ratos dos grupos saudáveis (Sham e Sham + Alopurinol) não são submetidos ao clampeamento (ou seja, a cirurgia consiste apenas em abrir o rato, e depois tornar a fechá-lo, sem interferir no funcionamento do seu organismo);

- após a fase pós-operatória (que pode durar 24, 48 ou 72 horas – é o fator tempo que varia entre os grupos) os ratos retornam, independentemente do grupo, a uma gaiola metabólica, onde passarão 24 horas até que as medidas de interesse sejam coletadas.

São então colhidas amostras de urina e sangue de cada rato, para que as variáveis de interesse possam ser obtidas.

3. Descrição das Variáveis

As variáveis de interesse envolvidas no estudo são:

- Volume, em ml por minuto: volume de urina excretada pelo rato, por minuto;
- Clearance de Creatinina, em ml por minuto, por 100g. – calculado através de C.U. – Creatinina na Urina (em mg por dl), C.P. – Creatinina no Plasma (em mg por dl) e Volume (em ml por minuto). Refere-se à quantidade de Creatinina excretada na urina, proporcional à quantidade da mesma substância presente no plasma sanguíneo. O valor obtido é normalizado com base no peso do rato, para ml por minuto por 100g;
- Fração de Excreção de Sódio (em porcentagem) –indica a proporção de sódio presente na urina, ponderada pela proporção de sódio no plasma sanguíneo.

As variáveis explicativas são:

- Tratamento: em dois níveis, com e sem Alopurinol;
- Tempo: o tempo de pós-operatório (entre a cirurgia e o retorno à gaiola), pode ser de 24, 48 ou 72 horas.

O efeito do clampeamento não será incluído como variável explicativa, pois será estudado apenas na comparação entre grupos Isquemia e Sham (nesse caso, será a única diferença entre os grupos).

4. Análise descritiva

Para avaliar o comportamento das diferentes variáveis nos vários grupos, foram construídos alguns gráficos e tabelas de medidas resumo.

Em primeiro lugar, foi construída uma tabela (Tabela 4.1) com algumas medidas resumo para os grupos:

Tabela 4.1 – Medidas resumo

Grupo	Volume (ml/min)			Clearance Creatinina (CICr/100g)			Fração excreção Na (%)		
	N	Média	Desvio Padrão	N	Média	Desvio Padrão	N	Média	Desvio Padrão
Sham	12	0,0130	0,0056	12	0,5448	0,0738	7	0,1890	0,2880
Sham + Alo	9	0,0182	0,0102	9	0,4844	0,1718	5	0,1180	0,0952
Isquemia	13	0,0116	0,0080	14	0,2080	0,0612	8	0,1888	0,1683
Isquemia 48	8	0,0111	0,0120	8	0,3575	0,1364	8	0,0404	0,0855
Isquemia 72	8	0,0099	0,0037	8	0,4088	0,0541	8	0,3750	0,1476
Isquemia + Alo	9	0,0134	0,0037	9	0,3004	0,0782	6	0,1400	0,1119
Isquemia + Alo 48	7	0,0132	0,0095	7	0,3429	0,1154	6	0,0583	0,0637
Isquemia + Alo 72	8	0,0147	0,0046	8	0,3838	0,0754	7	0,1683	0,1732

O tamanho dos grupos difere para cada variável porque eventualmente não houve volume de plasma ou urina suficiente para computar as três medidas em todos os ratos.

Vemos da Tabela 4.1 que as variáveis Volume e Fração de Excreção de Sódio têm alta variabilidade. Sendo assim, diferenças nas médias dos grupos deverão ser muito grandes para que apresentem significância.

Além disso, notamos evidências de heterocedasticidade entre os grupos – o que nos levará a executar testes para essa característica na análise inferencial.

Em seguida, apesar do tamanho reduzido dos grupos, construímos gráficos “boxplot” com o intuito de identificar possíveis valores discrepantes (Apêndice A).

Os outliers que então apareceram foram identificados e isolados. Para avaliar seu impacto, a média dos grupos foi calculada com e sem a presença desses valores. O resultado aparece na Tabela 4.2:

Tabela 4.2 – Observações discrepantes

Grupo	Variável discrepante	Valor (u.a.)	Média total do grupo	Média do grupo sem o outlier
Isq	Volume (ml/min)	0,24020 (1)	0,02820	0,01055
Isq + Alo	ClCr/100g	0,49590 (1)	0,30040	0,27593
Isq 48	FENa	0,76000 (7)	0,12030	0,04038
Isq 72	FENa	0,07000 (2)	0,37500	0,41857
Isq + Alo 48	ClCr/100g	0,59000 (5)	0,34290	0,30167
Isq + Alo 72	Volume (ml/min)	0,02300 (7)	0,01473	0,01354

Para descrição dos grupos, ver seção 2.

O valor discrepante mais influente é o do grupo Isquemia 48, que apresentou uma fração de excreção de sódio de 0.76 – a média do grupo com e sem ele variou em cerca de 300%. Para as outras variáveis, porém, o animal apresentou medidas aceitáveis.

Devido a essa influência, e à baixa incidência de animais com esse nível de fração de excreção de sódio, a pesquisadora decidiu retirar esse rato da amostra, mantendo no entanto os outros, que não apresentaram valores tão discrepantes. Assim, as análises subseqüentes excluem esse indivíduo particular.

Um fator importante do estudo é a eficácia do clampeamento em induzir isquemia e IRA. Assim, a primeira comparação que faremos será entre os grupos Sham e

Isquemia, que diferem apenas pelo clampeamento. Com isso, esperamos detectar se o clampeamento foi capaz de induzir alterações significativas nas variáveis de interesse.

Dos gráficos de médias (Gráficos B1, B2 e B3 do Apêndice B), vemos que, ao contrário do esperado, não parece haver diferenças importantes entre as médias de Volume e Fração de Excreção de Sódio entre os grupos.

Isso pode ter acontecido pelos seguintes motivos:

- tanto o Volume quanto a Fração de Excreção de Sódio são medidas pouco sensíveis – apenas uma lesão agressiva poderia causar alterações importantes nessas variáveis. Podemos, então, pensar que o clampeamento induz uma IRA mais branda;
- os pacientes vítimas de IRA podem apresentar dois quadros distintos: aumento ou diminuição do Volume excretado. Por isso, não se pode afirmar com segurança que tipo de alteração deve ser esperada quando o indivíduo adoece;
- a Fração de Excreção de Sódio só apresenta alteração quando há lesão na alça de Hens. A lesão causada pelo clampeamento pode não ter atingido essa estrutura específica, e assim não foi capaz de causar alterações significativas nessa medida.

A variável Clearance de Creatinina foi a única que parece apresentar diferença entre esses dois grupos – é a variável que apresenta maior sensibilidade a mudanças na função renal.

Em seguida, outra comparação de interesse é entre os grupos Sham (controle saudável) e Sham + Alopurinol (controle saudável tratado). Através dessa comparação, pode-se verificar se há efeito do Alopurinol em indivíduos saudáveis.

Novamente através dos gráficos de médias (Gráficos B4, B5 e B6 do Apêndice B) podemos perceber que as médias das três variáveis estão próximas, de modo que parece não haver diferenças entre os grupos. Esse comportamento era o esperado pela pesquisadora.

Por fim, foram construídos gráficos de médias para as três variáveis, comparando os grupos Isquemia e Isquemia + Alopurinol ao longo do tempo (Gráficos B7, B8 e B9 do Apêndice B).

Desses gráficos, concluímos:

- parece haver presença de interação entre o fator Alopurinol e o fator tempo, dada a falta de paralelismo das curvas;
- pode-se ver que o comportamento do efeito do medicamento ao longo do tempo é diferente para cada variável;
- para cada variável, em apenas um momento os grupos parecem apresentar diferenças entre as médias (em 24 horas para a Clearance de Creatinina, e em 72 horas para as outras variáveis).

Sendo assim, vamos considerar a possibilidade de comparar os grupos com relação à variável Clearance de Creatinina (pois o clampeamento mostrou ser eficaz em causar alterações nessa variável), utilizando o Volume e/ou a Fração de Excreção de Sódio como covariáveis.

Para verificar essa possibilidade, foram feitos gráficos de dispersão para Clearance de Creatinina contra Volume e Clearance de Creatinina contra Fração de Excreção de Sódio. Os gráficos foram construídos separadamente para os casos doente não tratado – grupos Isquemia, Isquemia 48 e Isquemia 72 (Gráficos C1 e C2 do Apêndice C) e doente tratado – grupos Isquemia + Alopurinol, Isquemia + Alopurinol 48 e Isquemia + Alopurinol 72 (Gráficos C3 e C4 do Apêndice C).

Vemos nesses gráficos que não há relação linear forte entre as variáveis em nenhum caso – mesmo quando estudamos essa relação ignorando os grupos (Gráficos C5 e C6 do Apêndice C). Isso nos induz a descartar a possibilidade de incluir Volume e Fração de Excreção de Sódio como covariáveis.

5. Análise Inferencial

5.1 – Comparações entre controles (*Sham, Sham + Alopurinol e Isquemia*)

Dos resultados da análise descritiva, não parece haver diferenças significativas entre os grupos Isquemia e Sham – exceto para a variável Clearance de Creatinina – e nem entre os grupos Sham e Sham + Alopurinol (nesse caso em todas as variáveis).

A análise inferencial sobre as médias das variáveis de interesse desses grupos começou com a aplicação de um teste de igualdade de variâncias para os grupos Sham e Isquemia, e outro entre os grupos Sham e Sham + Alopurinol. Ambos os testes resultaram na não rejeição da hipótese nula para todas as variáveis, assumindo-se nível de significância 5% (os resultados detalhados encontram-se no Apêndice D – Gráficos D1 a D6).

Sendo assim, podemos comparar as médias através de um teste t homocedástico. É importante observar que para a aplicação do teste t, é necessária a suposição de normalidade das variáveis de interesse. Aplicamos, então, apesar dos reduzidos tamanhos de amostra, testes de Kolmogorov-Smirnoff para normalidade. Novamente adotando um nível de significância de 5%, os resultados desses testes indicaram a não rejeição da hipótese de normalidade para todas as variáveis em todos os grupos, exceto para a variável Clearance de Creatinina no grupo Sham + Alopurinol (os resultados aparecem no Apêndice D – Gráficos D7 a D15). Portanto, a única comparação que não será feita através de um teste t homocedástico será entre os grupos Sham e Sham + Alopurinol, para a variável Clearance de Creatinina.

Para essa comparação em particular, dada a impossibilidade de assumirmos normalidade, utilizamos um modelo linear generalizado com um fator fixo (Alopurinol) assumindo distribuição Gama e ligação logaritmica.

O modelo apresentou um bom ajuste, e indicou como resultado que, com valor P aproximadamente igual a 0.3, o Alopurinol não apresentou efeito significativo nessa variável entre os grupos Sham e Sham + Alopurinol. Houve um valor influente (um rato com a Clearance de Creatinina de cerca de 0.85 – o maior valor da amostra) na análise de diagnóstico do modelo, que alterou os resultados da inferência quando retirado. Porém, a pesquisadora não considerou essa observação como discrepante – seu efeito sobre os resultados é devido ao tamanho reduzido do grupo, bem como à baixa variabilidade associada a essa variável. Sendo assim, decidimos mantê-la na amostra, e, por conseguinte, concluir pela não rejeição da igualdade de médias de Clearance de Creatinina entre os grupos Sham e Sham + Alopurinol.

Os testes t homocedásticos aplicados aos outros casos apresentaram os seguintes resultados:

- não foi possível rejeitar a hipótese de igualdade de médias para Volume e Fração de Excreção de Sódio entre os Grupos Sham e Sham + Alopurinol. Portanto, juntando esses resultados ao modelo Gama para a variável Clearance de Creatinina, pode-se concluir que não há evidências na amostra de que o Alopurinol cause efeitos significativos em indivíduos saudáveis.
- nas comparações de médias entre os grupos Isquemia e Sham, apenas a média da variável Clearance de Creatinina foi considerada significativamente diferente entre os grupos (assumindo nível de 5% de significância). Daí, podemos observar que o procedimento de clampeamento não foi capaz de produzir efeitos significativos no Volume e na Fração de Excreção de Sódio para a amostra em questão.

Os resultados detalhados dos testes aparecem no Apêndice D, tabelas D16 a D21.

5.2 – Variável Volume

Para analisar os efeitos de Alopurinol e Tempo nos grupos doentes (Isquemia e Isquemia + Alopurinol nos tempos 24, 48 e 72 horas), vamos estudar cada variável separadamente, através de modelos não balanceados de casela de referência (onde as caselas de referência serão sem Alopurinol e 24 horas).

Começando pelo Volume, tentamos inicialmente ajustar um modelo de análise de variância gaussiano não balanceado. Na análise de diagnóstico, porém, foram encontrados problemas com a distribuição Normal (presença de assimetria e evidências de heterocedasticidade). Os gráficos de envelope e diagnóstico para a análise, que evidenciam esses problemas, se encontram no Apêndice E, Gráficos E1 e E2.

Tendo em vista as características desse diagnóstico, e uma vez que os dados para Volume são todos positivos, optamos pelo ajuste de um modelo gama, com ligação log-linear para facilitar a interpretação dos coeficientes (uma vez que se trata de um modelo onde as variáveis explicativas são fatores, a escolha da ligação não tem influência nos resultados). O modelo inicialmente incluiu a interação entre os fatores.

O diagnóstico do modelo não indicou desvios em relação às hipóteses de distribuição e relação funcional, e o desvio observado não apresentou média significativamente diferente de 0 no teste de qualidade do ajuste – todos esses diagnósticos aparecem no Apêndice E.

Mesmo as observações que aparecem como influentes não causaram mudanças nos resultados da inferência sobre o modelo quando retiradas, e, portanto, podemos aceitar que o modelo proposto se adequou bem aos dados.

Como resultado, podemos passar à inferência. Assim, notamos ausência de significância em todos os efeitos, mostrando que a variável Volume não foi significativamente modificada por nenhum dos fatores em estudo.

Portanto, o modelo final para essa variável será o modelo log-linear com distribuição gama, contendo como preditor linear apenas o intercepto.

Os resultados detalhados do ajuste encontram-se no Apêndice F, Gráfico F1. O diagnóstico do modelo final aparece no Apêndice E.

A tabela abaixo apresenta as estimativas (intervalo de confiança de 95%) para a média da variável Volume, obtida do modelo final selecionado.

Tabela 5.2.1 – Estimativas para o Volume (ml/min) sob o modelo selecionado

Média	Intervalo 95%	
	Lim. Inferior	Lim. Superior
0.012253	0.012249	0.012257

5.3 – Fração de Excreção de Sódio

Analisando a variável Fração de Excreção de Sódio, temos que levar em conta que essa variável, sendo uma fração, toma valores continuamente entre 0 e 1. Portanto, não seria razoável supor distribuições do tipo Normal ou Gama.

Sendo assim, seguindo indicações de PAULA (2004), ajustamos um modelo de quase-verossimilhança com ligação logito e função de variância igual a $\mu \cdot (1 - \mu)$. Novamente o modelo inicial contém a interação entre os fatores.

Fazendo o diagnóstico, seguimos novamente as indicações de PAULA (2004), e estudamos os valores da distância de Cook e dos resíduos de Pearson contra os

valores ajustados. Encontramos dois pontos influentes e aberrantes, mas novamente o ajuste do modelo sem os mesmos não apresentou mudanças nos resultados inferenciais, e nem alterações desproporcionais nas estimativas dos coeficientes. O gráfico dos resíduos de Pearson exibe um perfil de variabilidade similar entre os diferentes valores ajustados indicando adequação da função de variância escolhida (para diagnósticos detalhados, ver Apêndice E).

Aceitando então a adequação do modelo, passamos à inferência sobre o mesmo – utilizaremos o nível de significância de 5% como guia, por ser este o mais comum em análises estatísticas. No caso, o efeito de interação e de Alopurinol não foram considerados significativos.

Retiramos então, inicialmente, apenas o efeito de interação, mas novamente o efeito de Alopurinol não foi considerado significativo a 5%. O efeito de Tempo, por sua vez, foi considerado significativo apenas em seu nível 48 horas – portanto, não podemos afirmar que em média a Fração de Excreção de Sódio seja diferente para os grupos 24 e 72 horas.

Investigando uma última vez, ajustamos o modelo sem interação, mas desta vez modificando o fator Tempo para ter apenas dois níveis – 24/72 e 48 horas. Novamente, não pudemos afirmar com significância de 5% que houve efeito de Alopurinol.

Portanto, excluímos o fator Alopurinol do modelo. Fazendo novamente o ajuste, descobrimos que o efeito Tempo apresentou significância apenas para o nível 48 horas.

Com base em procedimento descrito em PAULA (2004), aplicamos um teste de Wald para testar se o efeito do Tempo em 48 horas era diferente do efeito Tempo em 24/72 horas. Rejeitamos a hipótese de igualdade de médias para 5% de nível de significância (Valor P da ordem de 10^{-6}), o que nos deixou com a seguinte ordenação para os valores da Fração de Excreção de Sódio nos vários níveis de tempo:

$$\text{Fração}_{48} < (\text{Fração}_{24} = \text{Fração}_{72})$$

que foi a relação que inicialmente observamos na análise descritiva.

Sendo assim, nosso modelo final para a variável Fração de Excreção de Sódio foi o modelo de quase-verossimilhança com ligação logito e função de variância $\mu \cdot (1 - \mu)$,

tendo como variáveis explicativas apenas o intercepto e o fator Tempo em dois níveis, 48 horas e 24/72 horas.

A conclusão, dessa forma, é a de que apenas o fator Tempo influenciou de maneira significativa a Fração de Excreção de Sódio, segundo o ordenamento acima.

Os resultados do ajuste do modelo final encontram-se no Apêndice F, e seus diagnósticos no Apêndice E.

Na Tabela 5.3.1 aparecem as estimativas para a média de Fração de Excreção de Sódio nos níveis 48 horas e 24/72 horas. O intervalo é o de +/- um erro padrão do parâmetro (já que o modelo de quase-verossimilhança não permite intervalos de confiança).

Tabela 5.3.1 – Estimativas para as médias de Fração de Excreção de Sódio

	Estimativa	Lim. Inferior	Lim. Superior
Tempo 24 ou 72	0,2251	0,1958	0,2573
Tempo 48	0,0481	0,0290	0,0787

5.4 – Clearance de Creatinina

Por fim, para analisar a variável Clearance de Creatinina, ajustamos inicialmente um modelo de análise de variância (parametrização de casela de referência) gaussiano.

No entanto, novamente a análise de diagnóstico indicou que a distribuição normal não leva a um bom ajuste, revelando indícios de heterocedasticidade e assimetria. No Apêndice E pode-se ver o gráfico de envelope referente ao ajuste do modelo Normal que levou a essas conclusões.

Sendo assim, vamos adotar o modelo linear generalizado (parametrização de casela de referência) com distribuição Gama e ligação logaritmica, levando em conta as características da distribuição e o fato de que a variável só toma valores positivos.

Começamos por ajustar o modelo completo, com os fatores Tempo e Alopurinol e mais o efeito de interação entre eles. A análise de diagnóstico sobre esse modelo indica um bom ajuste.

Considerando dessa forma o modelo como bem ajustado, analisamos os resultados da inferência sobre os fatores, concluindo que, sob o nível de 5%, todos os efeitos foram considerados significativos (tempo, alopurinol e interação).

No entanto, o diagnóstico revelou alguns valores que se destacaram como pontos influentes, e ao retirarmos um desses pontos em especial da amostra (rato do grupo Isquemia + Alo, com valor de clearance de 0.46 aproximadamente) os coeficientes referentes ao efeito de interação deixam de ser estatisticamente diferentes de 0 – o que causa uma grande alteração na escolha do modelo final para a variável.

Por conta dessa diferença, a pesquisadora foi consultada, e foi decidido que a observação deveria permanecer na amostra. Na seção 5.1 acima, também foi identificado um valor influente para essa variável na comparação entre os grupos Sham e Sham + Alopurinol, o que demonstra que observações dessa magnitude ocorrem com frequência (principalmente devido à baixa variabilidade das medidas de Clearance). Outro argumento a favor da manutenção desses pontos é o fato de que os mesmos não apareceram na análise descritiva como outliers.

Em seguida, executamos um teste de razão de verossimilhanças para comparar as médias de Clearance entre os tempos 48 e 72 (a rigor, um teste cuja hipótese nula era a de que o coeficiente do tempo 48 fosse igual ao do tempo 72). Do teste, decidimos pela não rejeição da hipótese nula (o valor P do teste foi de 0.47), o que significa que podemos considerar o fator tempo como tendo apenas dois níveis – 24 horas e mais de 24 horas.

Ajustamos então um novo modelo, com o fator Alopurinol, o novo fator Tempo (agora com dois níveis) e o efeito de interação.

Novamente, todos os testes sobre os coeficientes indicaram rejeição da hipótese de ausência de efeito – portanto as conclusões se mantêm. Além disso, o diagnóstico foi favorável – até mesmo o ponto influente que causou mudanças na análise anterior dessa vez foi bem absorvido pelo modelo e não mais causou alterações importantes.

Sendo assim, o modelo final selecionado para a variável Clearance de Creatinina foi o modelo Gama, com ligação logarítmica, tendo como fatores principais o Alopurinol (em dois níveis) e o Tempo alterado (em dois níveis – 24 horas e Mais de 24 horas), além da interação entre esse dois fatores.

Logo, podemos concluir que o Alopurinol, tanto quanto o Tempo, apresentam efeitos significativos na variável Clearance de Creatinina – em particular, o tempo apresenta diferença apenas em seu nível 24 horas, sendo que não foi possível aceitar a diferença entre os efeitos de 48 e 72 horas como significativa. Além disso, a presença do efeito de interação mostra que os efeitos de um fator dependem dos níveis do outro.

Nos Apêndices F e E temos o resultado do ajuste final do modelo e seu diagnóstico, respectivamente.

Para podermos apresentar as estimativas do efeito de cada fator sobre a Clearance, é importante observarmos dois pontos:

- como o modelo é log-linear, apresentaremos estimativas de efeitos multiplicativos. Ou seja, vamos dizer quanto em proporção a variável muda quando trocamos de nível de fator;
- como o modelo inclui a interação, temos que estudar o efeito de cada fator dentro de cada nível do outro. Por exemplo, estudamos o efeito do tempo na presença de Alopurinol e depois na ausência deste.

Isso posto, temos abaixo a tabela com os intervalos de confiança de nível 95% para os efeitos de cada fator:

Tabela 5.4.1 – Estimativas para os efeitos sobre a variável Clearance de Creatinina

Efeito	Estimativa	Intervalo 95%	
		Limite inferior	Limite superior
Alopurinol para 24 horas	44,38%	30,88%	59,27%
Alopurinol para mais de 24 horas	-4,82%	-12,36%	3,37%
Tempo sem Alopurinol	84,16%	69,31%	100,32%
Tempo com Alopurinol	21,41%	10,20%	33,76%

Esses valores devem ser interpretados da seguinte forma: por exemplo, a estimativa de 44,38% para o efeito de Alopurinol para 24 horas significa que, para aqueles pacientes com tempo de pós-operatório de 24 horas, os que receberam

Alopurinol apresentaram em média uma Clearance 44,38% maior do que aqueles que não receberam o remédio.

Cabe observar que o intervalo de 95% para o efeito de Alopurinol em pacientes com mais de 24 horas inclui o valor 0 – portanto, o efeito do medicamento em indivíduos com pós-operatório de mais de 24 horas não foi considerado significativo.

6. Conclusão

A análise descritiva havia indicado que o procedimento de Clampeamento causara alterações significativas apenas nos valores da Clearance de Creatinina, e que o Alopurinol não apresentava efeitos em indivíduos saudáveis.

As comparações entre as médias os grupos Isquemia e Sham e Sham + Alopurinol corroboraram essas indicações – foi possível concluir inferencialmente que o Clampeamento de fato só alterou significativamente a Clearance, e que o Alopurinol não evidenciou diferenças entre os grupos saudáveis.

Para analisar os efeitos de Tempo e Alopurinol (bem como do efeito de interação entre esses fatores, que fazia parte do propósito inicial do projeto) nos grupos doentes (Isquemia), foram utilizadas técnicas de modelos lineares generalizados.

As variáveis Volume e Clearance de Creatinina foram estudadas a partir de modelos Gama com ligação logarítmica, e a Fração de Excreção de Sódio, por ser uma fração, foi analisada através de um modelo de Quase-verossimilhança.

As conclusões finais indicaram a não significância de efeitos de Tempo, de Alopurinol e da interação entre esses fatores para a variável Volume. Para a Fração de Excreção de Sódio, apenas o fator Tempo apresentou alterações significativas (mas com os grupos 24 e 72 horas unidos, sem que fosse possível aceitar a diferença entre eles como significativa).

A Clearance foi a única variável em que pudemos aceitar os efeitos tanto de Tempo quanto de Alopurinol como significativos, tendo inclusive incluído a interação entre os mesmos no modelo final – embora novamente o fator Tempo tenha sido reparametrizado para apenas dois níveis – 24 horas e mais de 24 horas.

Apêndice A - Boxplots

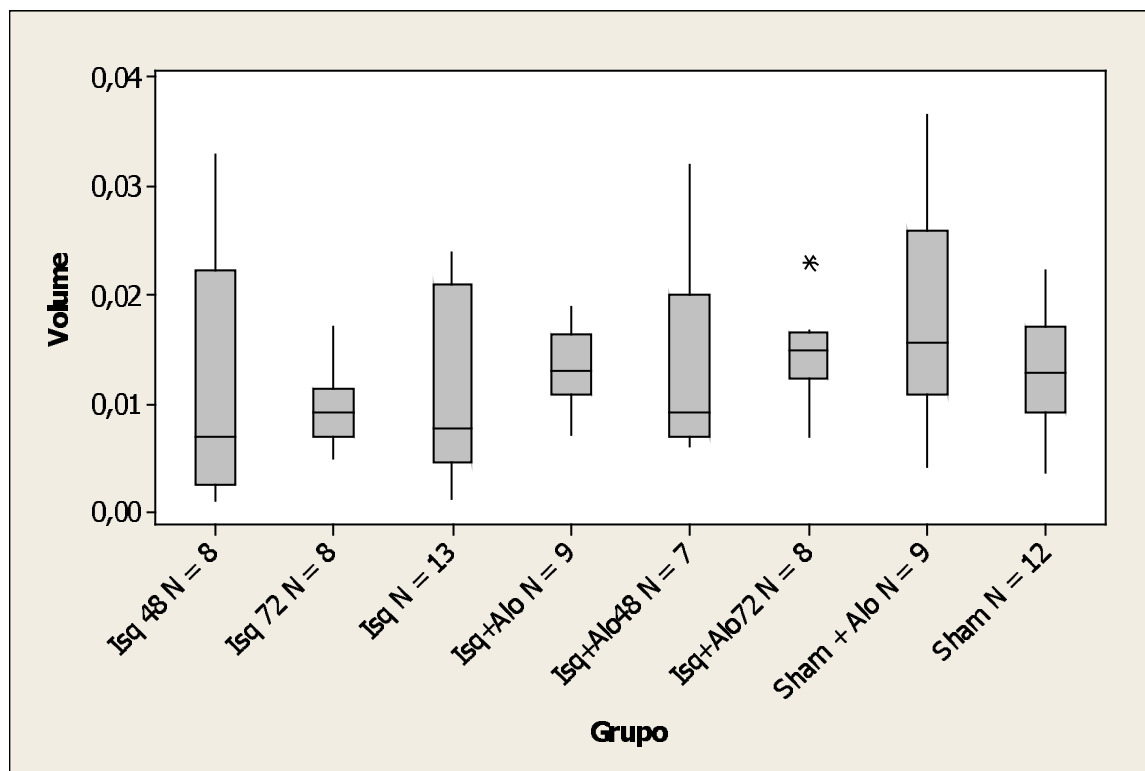
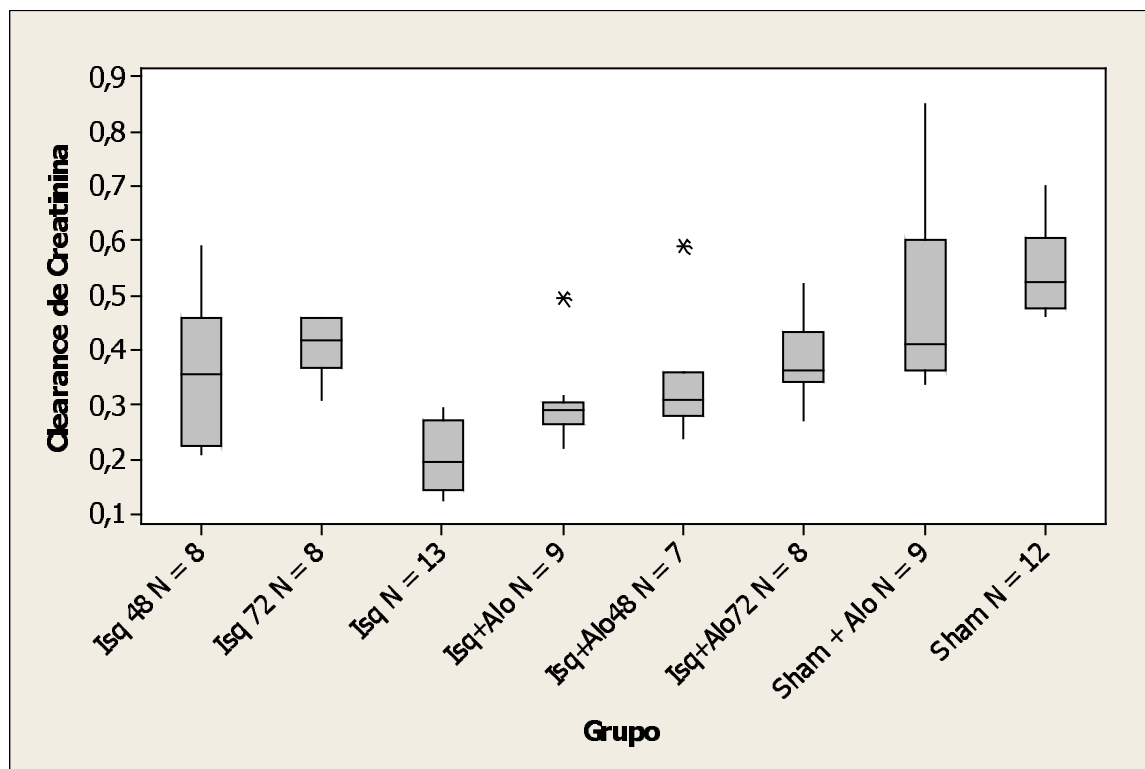
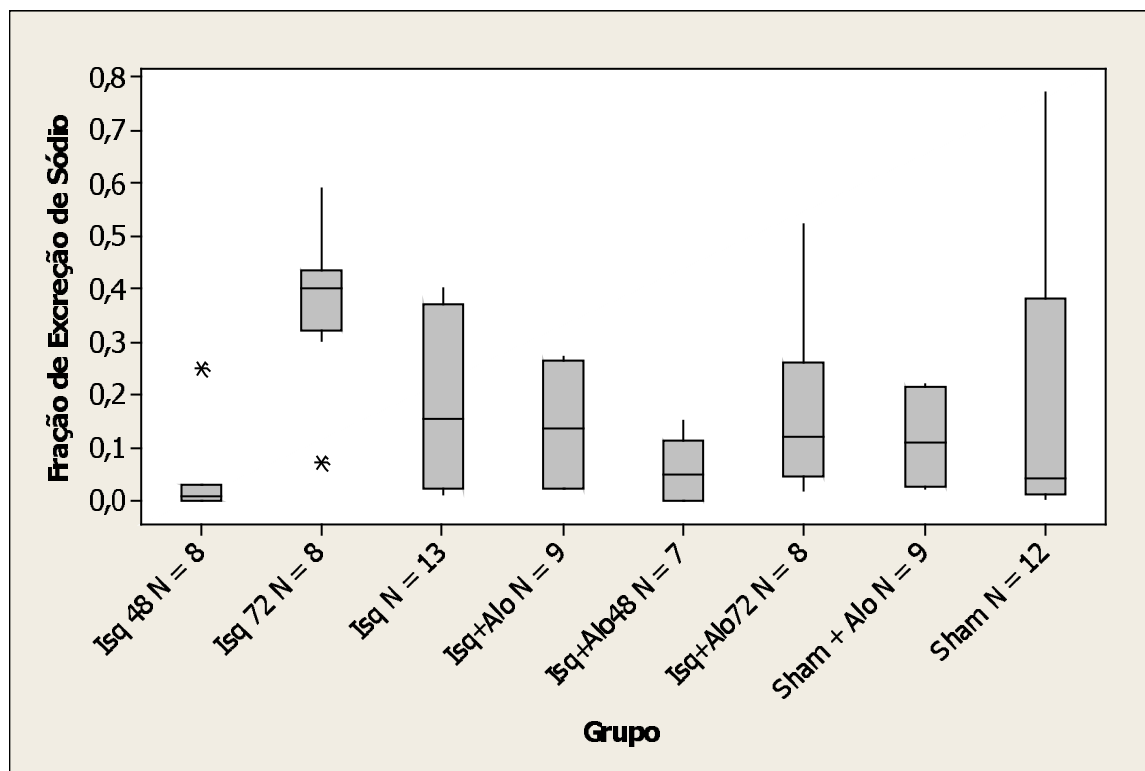
Gráfico A1: Boxplots de Volume (ml/min) por grupo**Gráfico A2: Boxplots de Clearance de Creatinina (ClCr/100g) por grupo**

Gráfico A3: Boxplots de Fração de Excreção de Sódio por grupo

Apêndice B - Gráficos de médias

Gráfico B1: Gráfico de Médias (com +/- um erro padrão) para a variável Volume (ml/min) nos grupos Isquemia e Sham

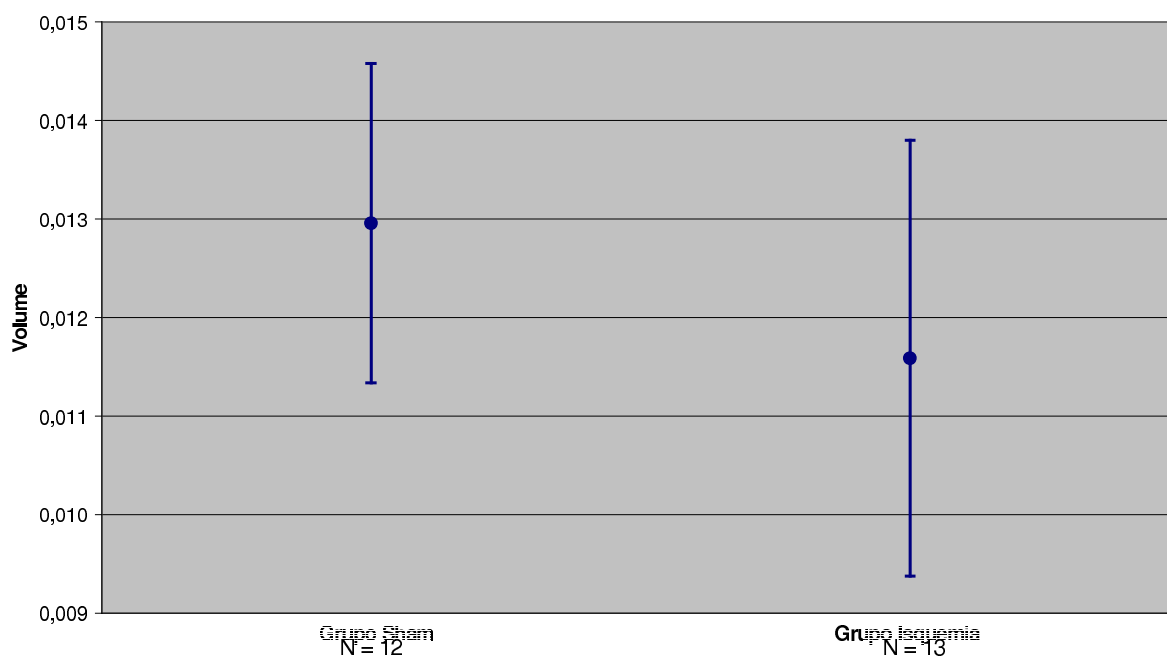


Gráfico B2: Gráfico de Médias (com +/- um erro padrão) para a variável Clearance de Creatinina (ClCr/100g) nos grupos Isquemia e Sham

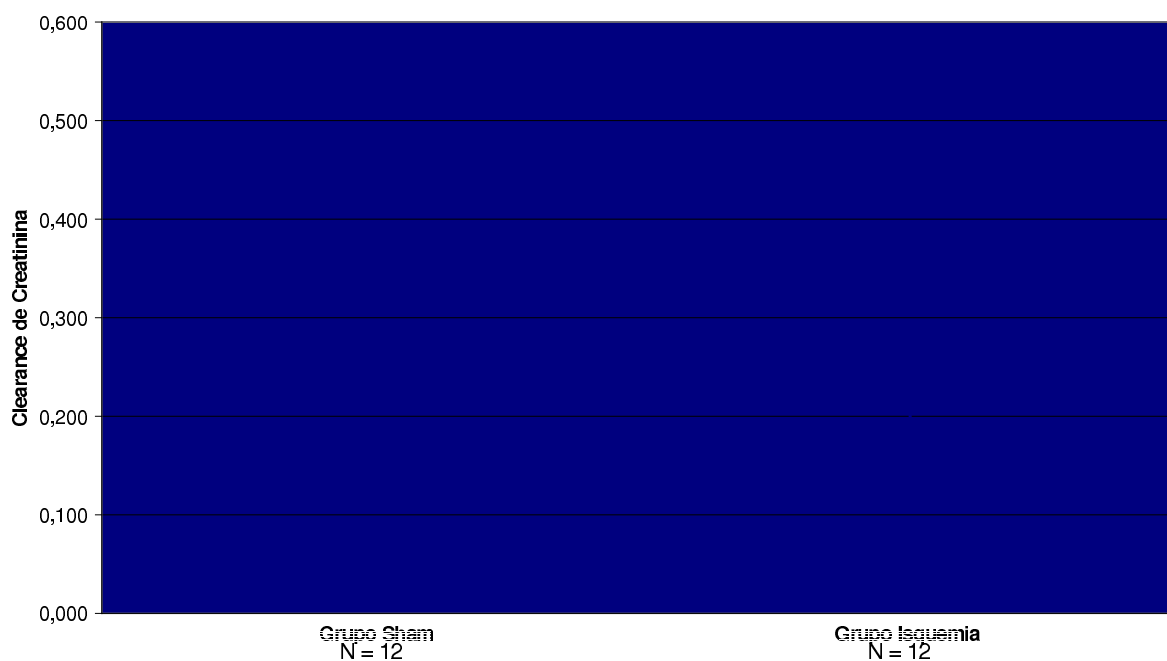


Gráfico B3: Gráfico de Médias (com +/- um erro padrão) para a variável Fração de Excreção de Sódio nos grupos Isquemia e Sham

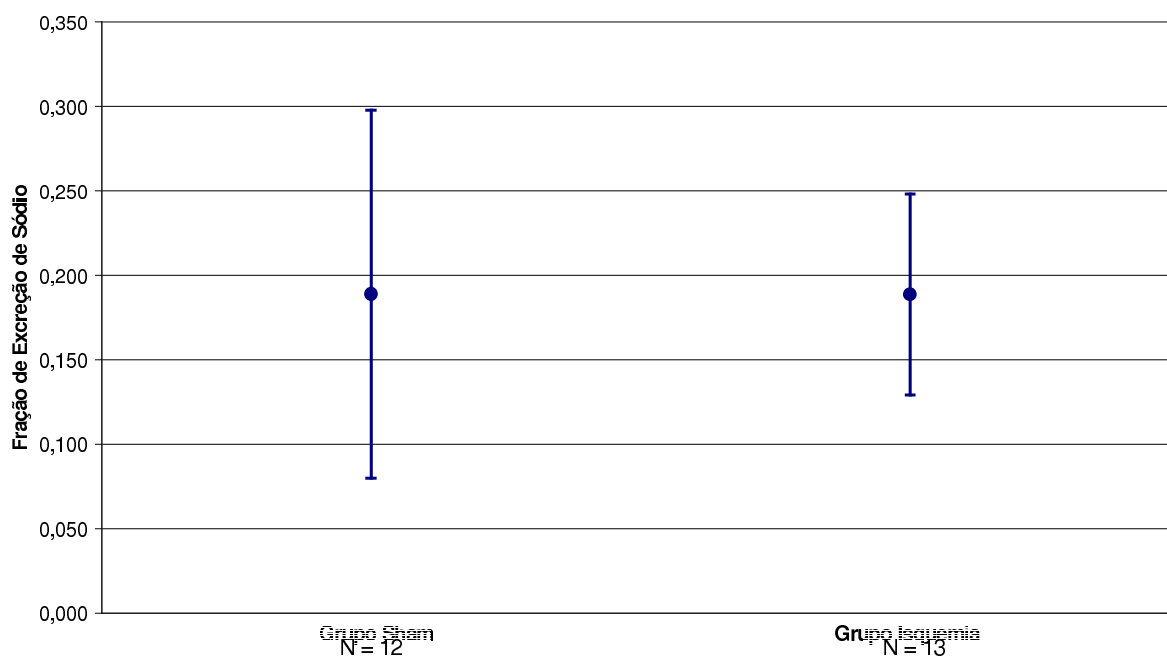


Gráfico B4: Perfis Gráfico de Médias (com +/- um erro padrão) para a variável Volume (ml/min) nos grupos Sham e Sham + Alopurinol

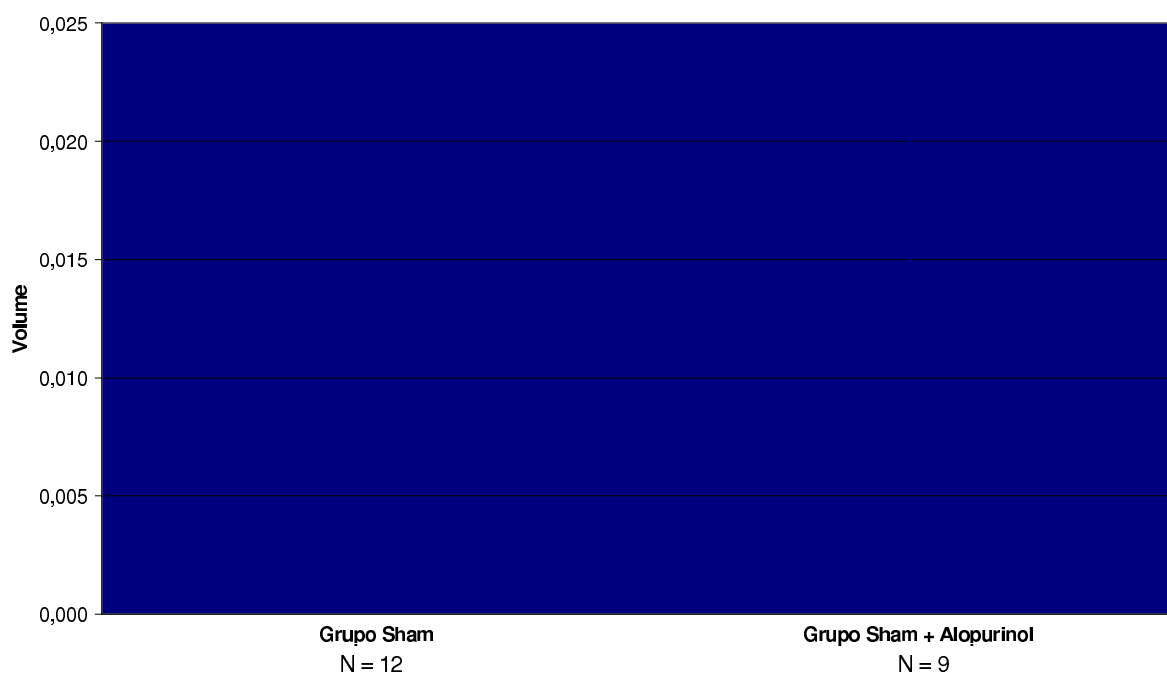


Gráfico B5: Gráfico de Médias (com +/- um erro padrão) para a variável Clearance de Creatinina (CICr/100g) nos grupos Sham e Sham + Alopurinol

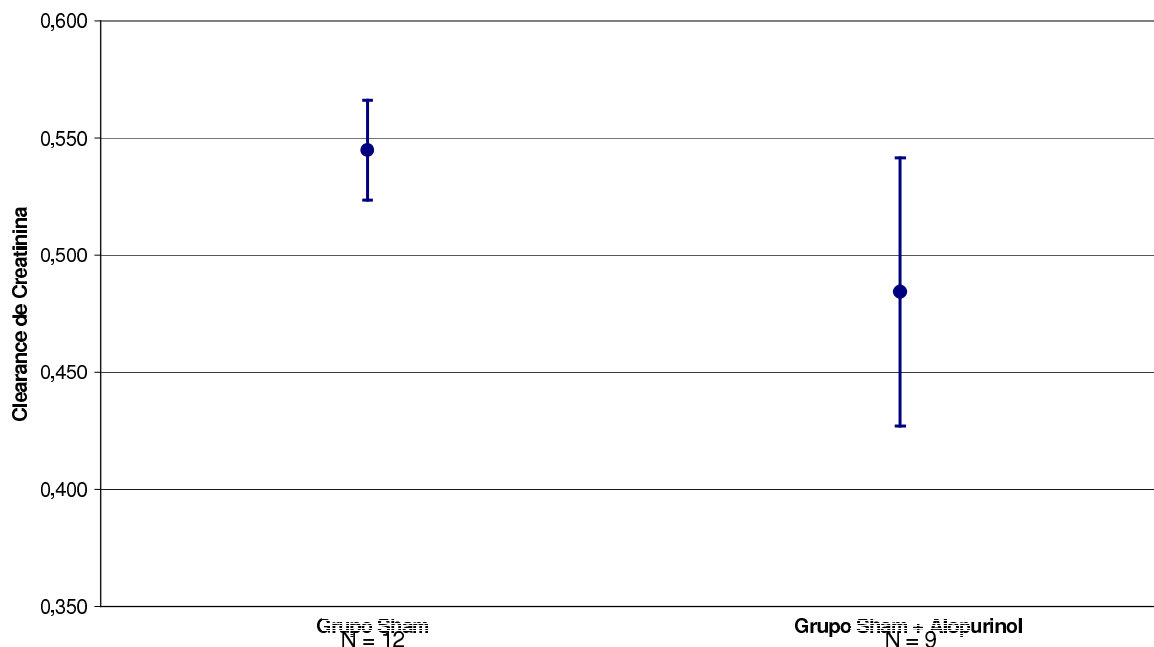


Gráfico B6: Gráfico de Médias (com +/- um erro padrão) para a variável Fração de Excreção de Sódio nos grupos Sham e Sham + Alopurinol

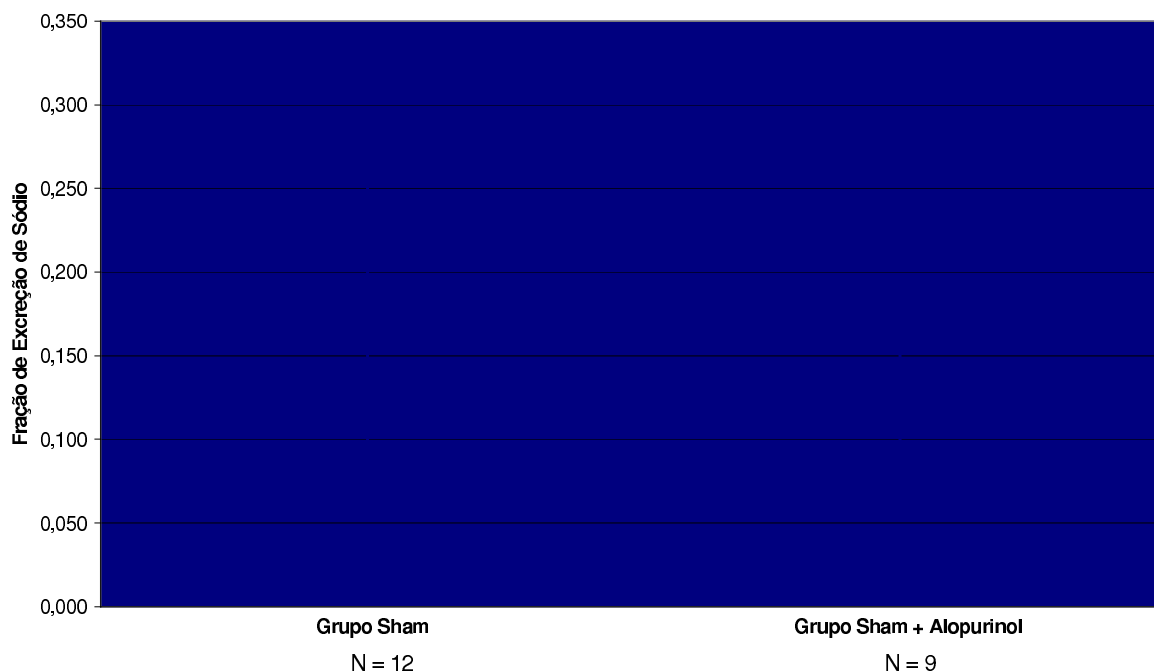


Gráfico B7: Gráfico de Perfis de Médias (com +/- um erro padrão) para a variável Volume (ml/min) nos grupos Isquemia e Isquemia + Alopurinol ao longo do tempo

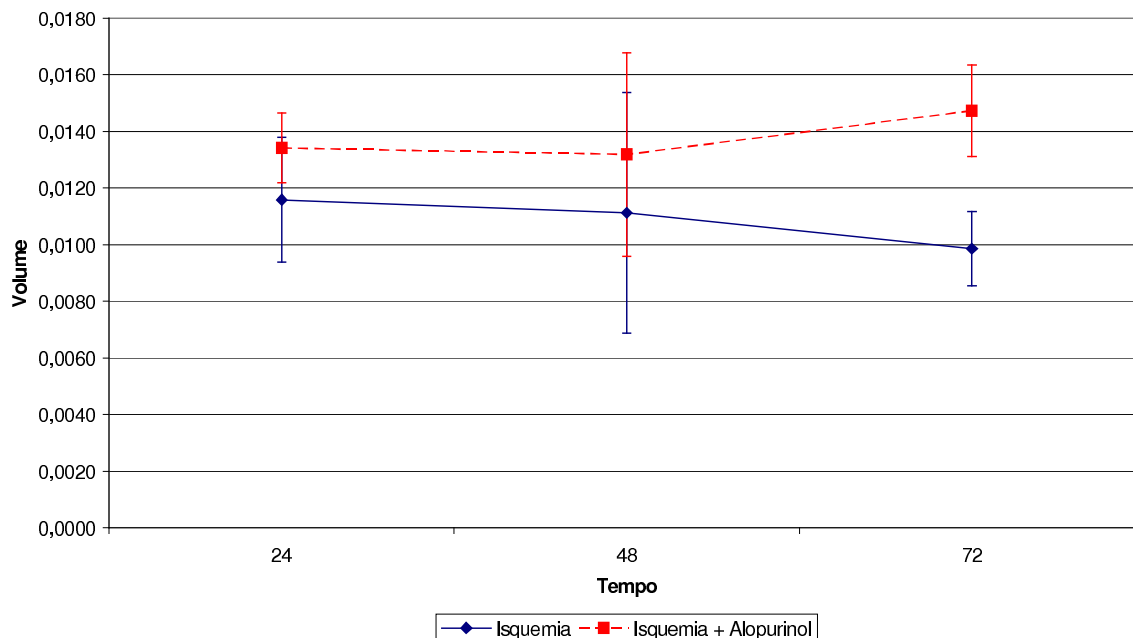


Gráfico B8: Gráfico de Perfis de Médias (com +/- um erro padrão) para a variável Clearance de Creatinina (ClCr/100g) nos grupos Isquemia e Isquemia + Alopurinol ao longo do tempo

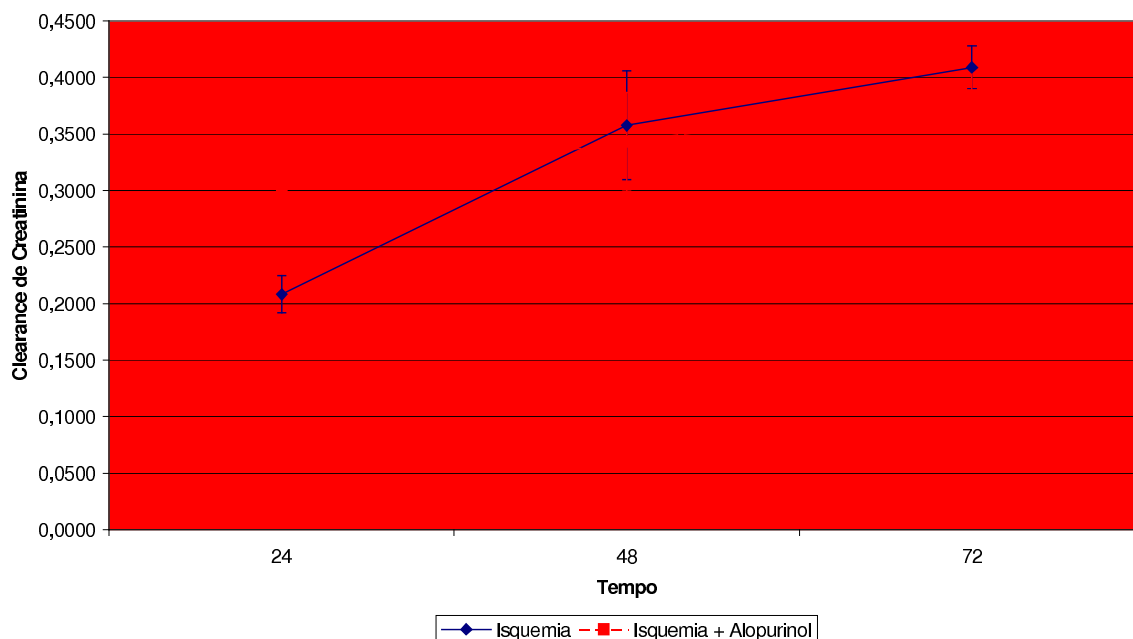
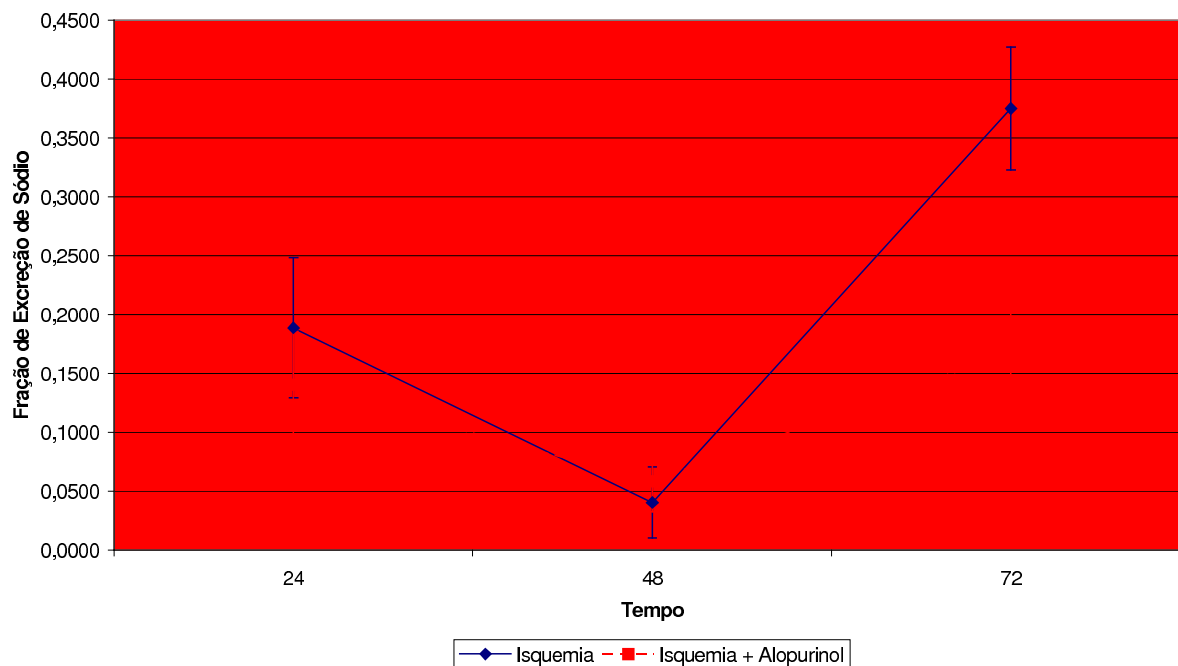


Gráfico B9: Gráfico de Perfis de Médias (com +/- um erro padrão) para a variável Fração de Excreção de Sódio nos grupos Isquemia e Isquemia + Alopurinol ao longo do tempo



Apêndice C- Gráficos de dispersão

**Gráfico C1 – Dispersão Volume (ml/min) X Clearance de Creatinina (ClCr/100g),
união dos grupos Isquemia, Isquemia 48 e Isquemia 72**

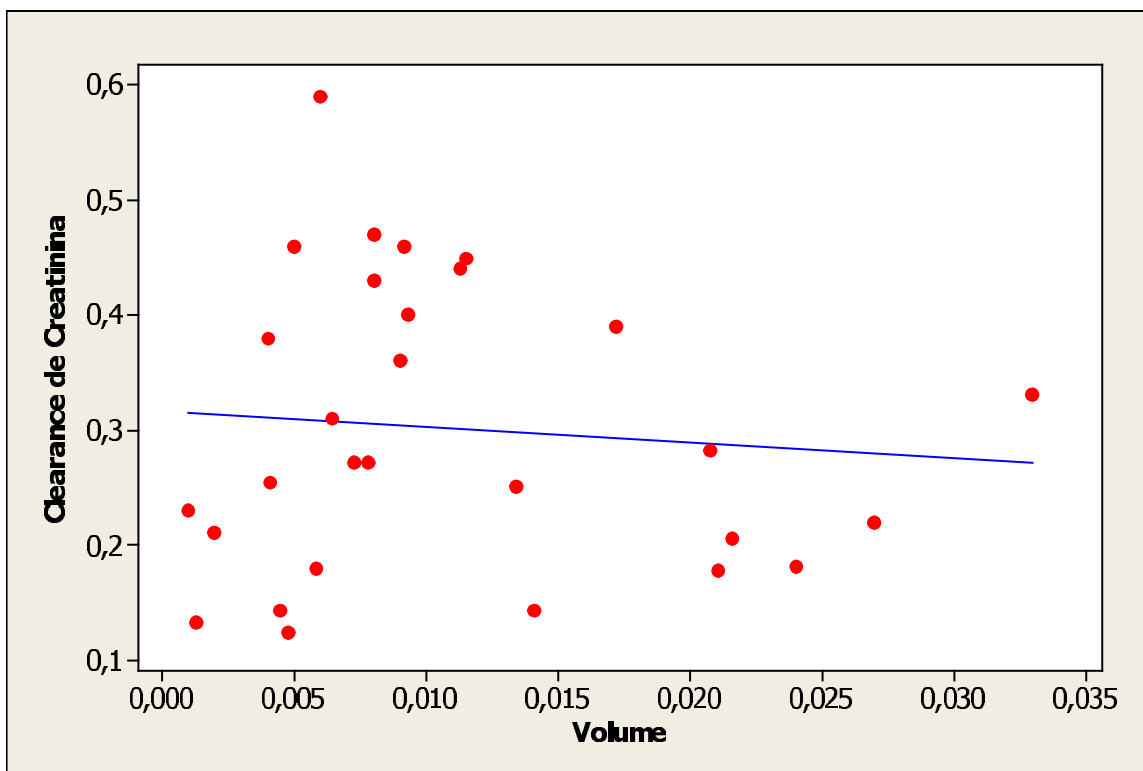


Gráfico C2 – Dispersão Fração de Excreção de Sódio X Clearance de Creatinina (CICr/100g), união dos grupos Isquemia, Isquemia 48 e Isquemia 72

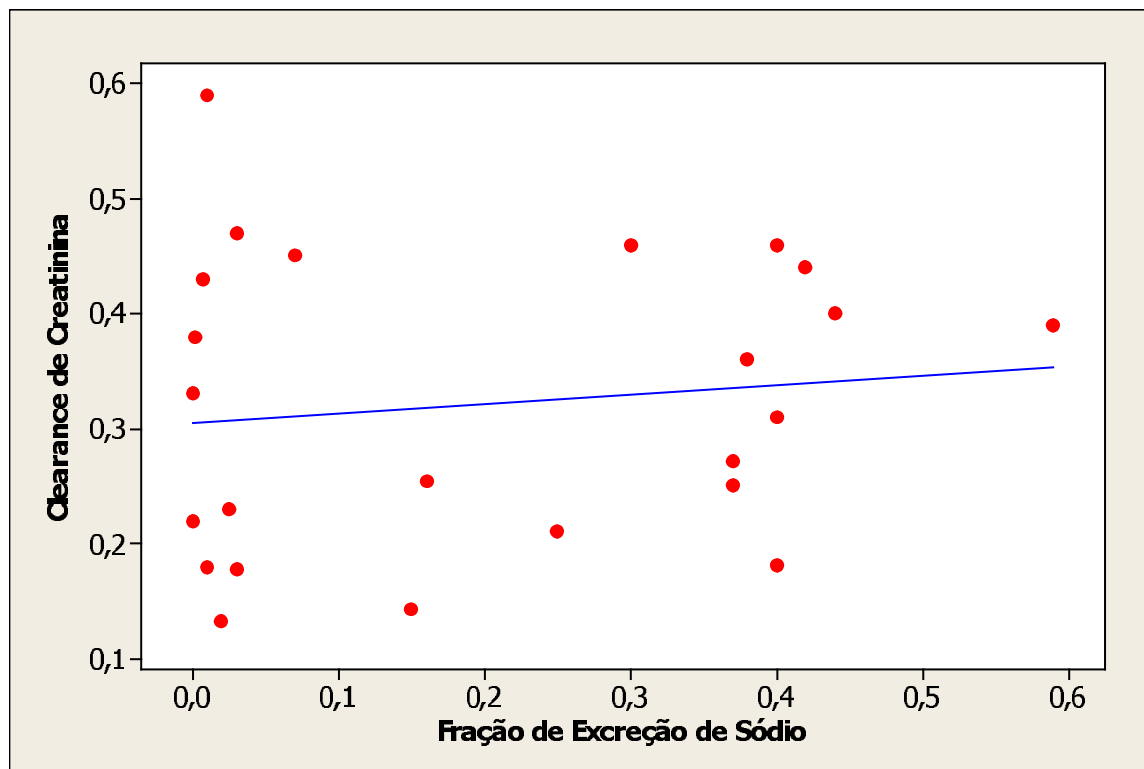


Gráfico C3 – Dispersão Volume (ml/min) X Clearance de Creatinina (ClCr/100g), união dos grupos Isquemia + Alopurinol, Isquemia + Alopurinol 48 e Isquemia + Alopurinol 72 horas

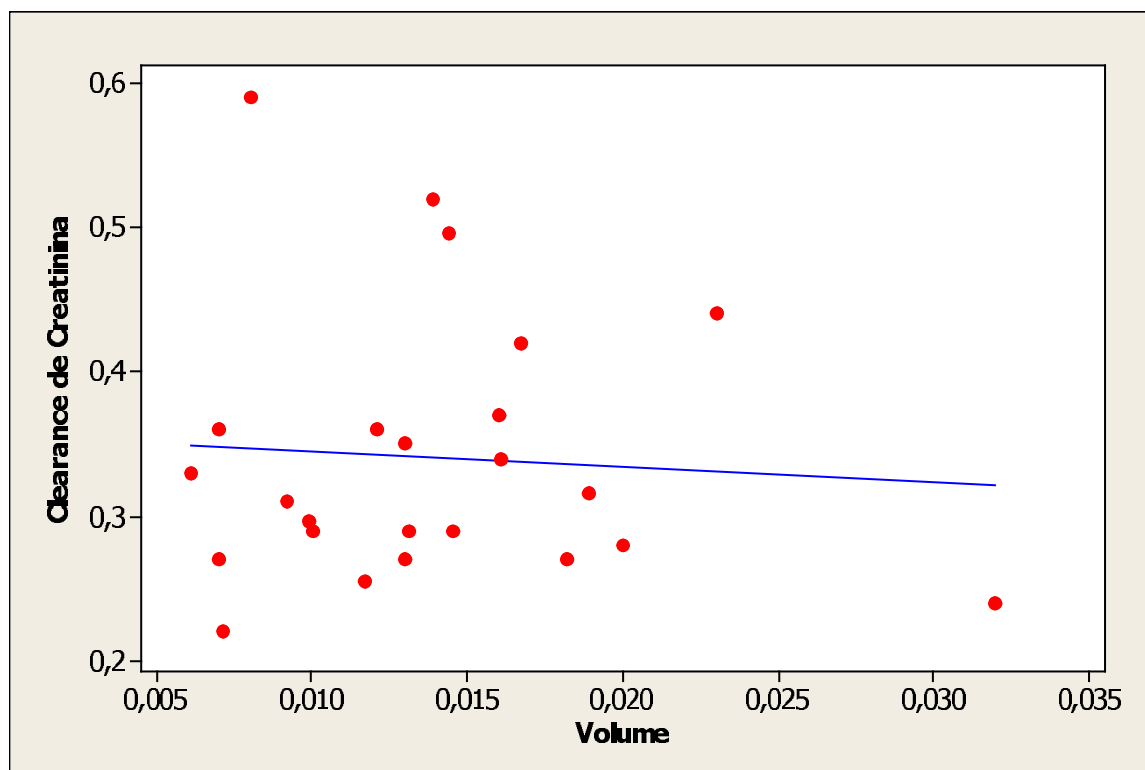


Gráfico C4 – Dispersão Fração de Excreção de Sódio X Clearance de Creatinina (ClCr/100g), união dos grupos Isquemia + Alopurinol, Isquemia + Alopurinol 48 e Isquemia + Alopurinol 72 horas

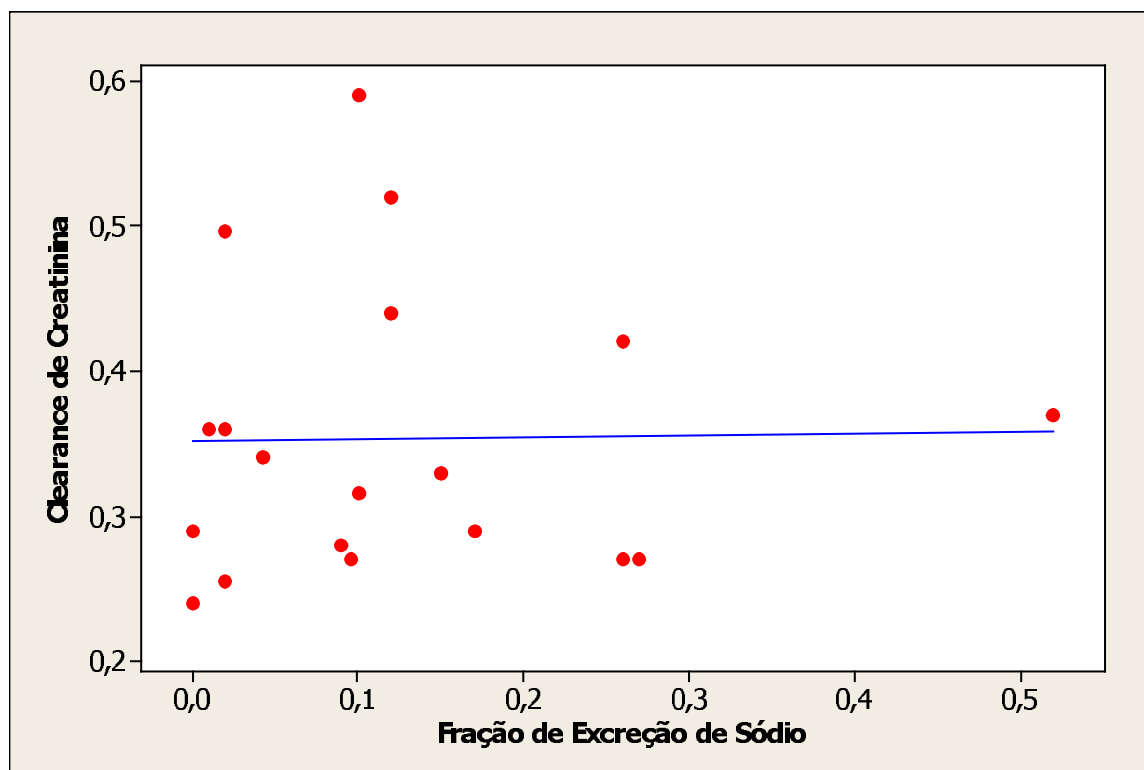


Gráfico C5 – Dispersão de Volume (ml/min) X Clearance de Creatinina para todas as observações

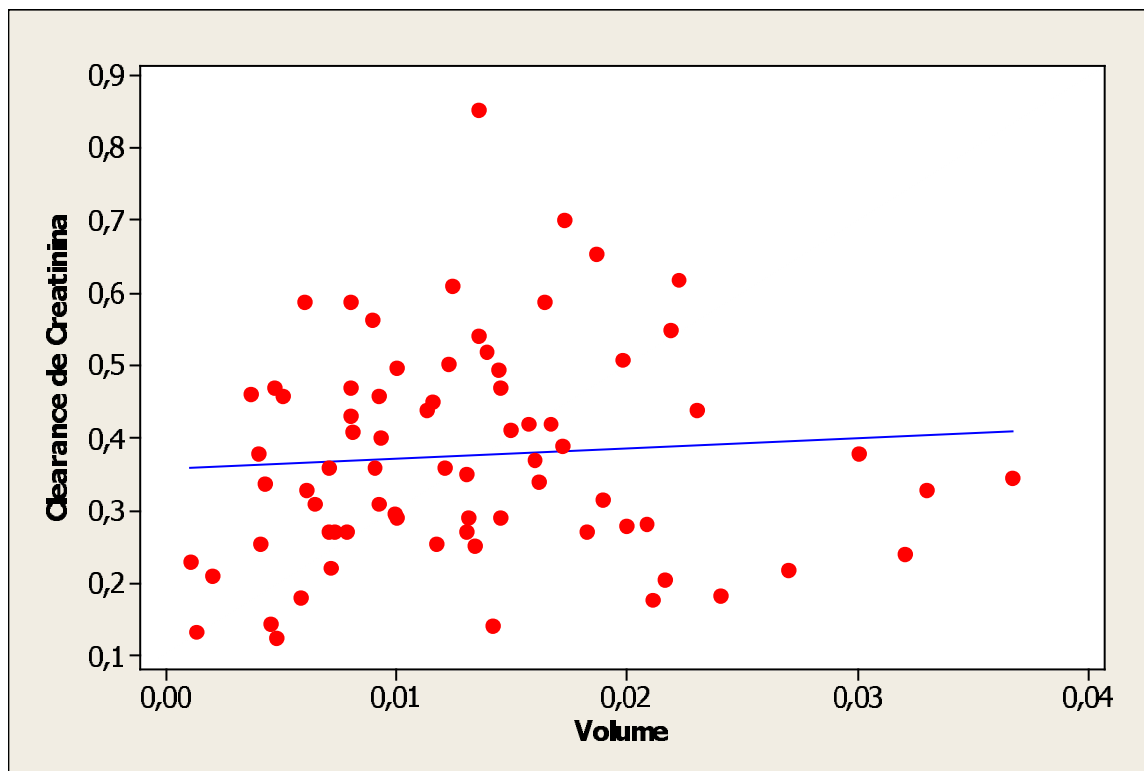
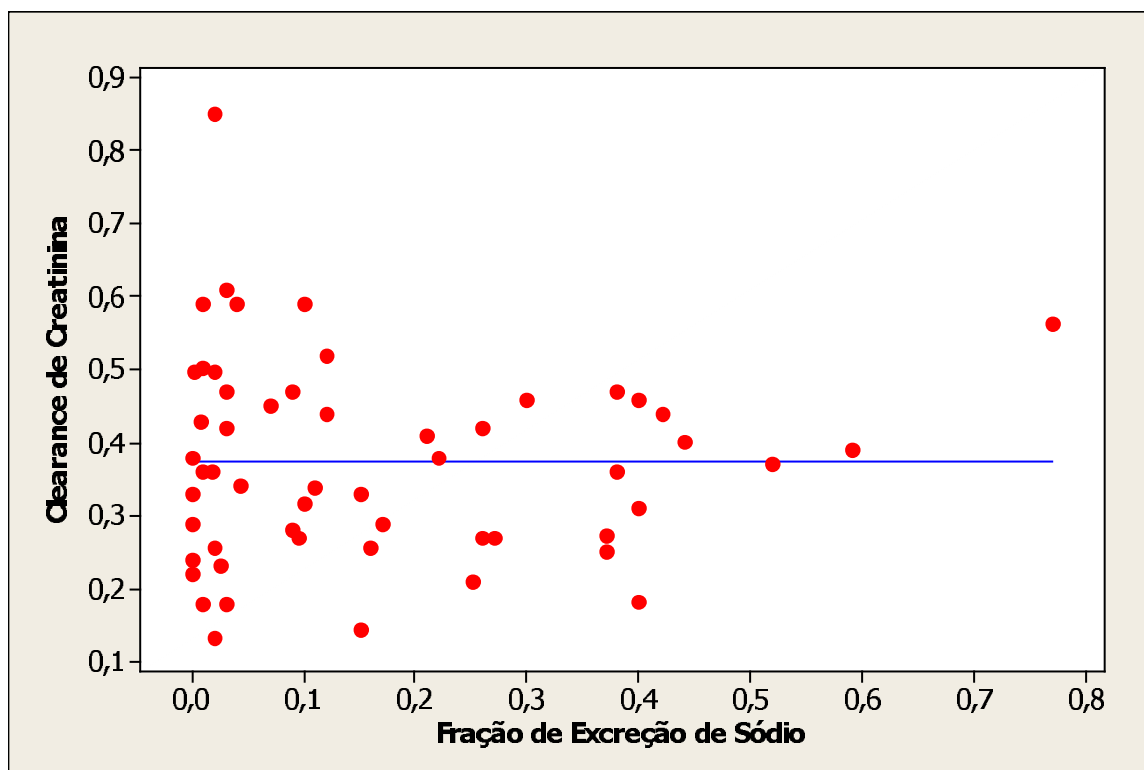


Gráfico C6 – Dispersão Fração de Excreção de Sódio X Clearance de Creatinina para todas as observações



Apêndice D - Testes para grupos Sham X Isquemia e Sham X Sham + Alo

Gráfico D1 – Teste de Levene de igualdade de variância para grupos Sham X Isquemia - Variável Volume

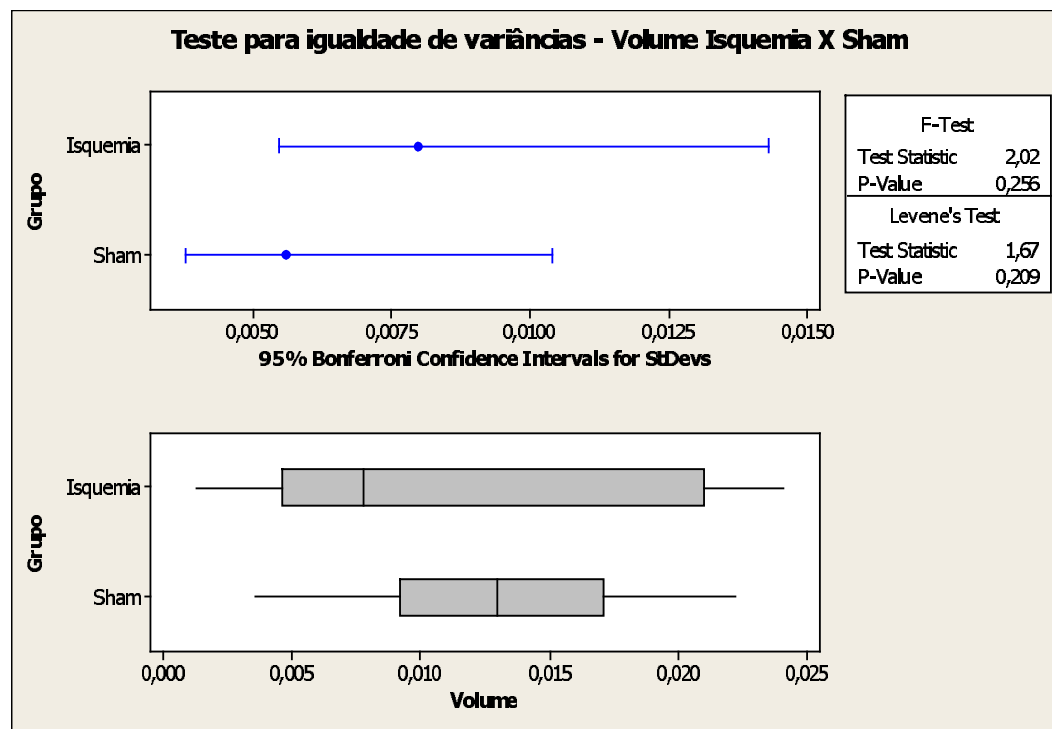


Gráfico D2 – Teste de Levene de igualdade de variância para grupos Sham X Isquemia - Variável Clearance de Creatinina

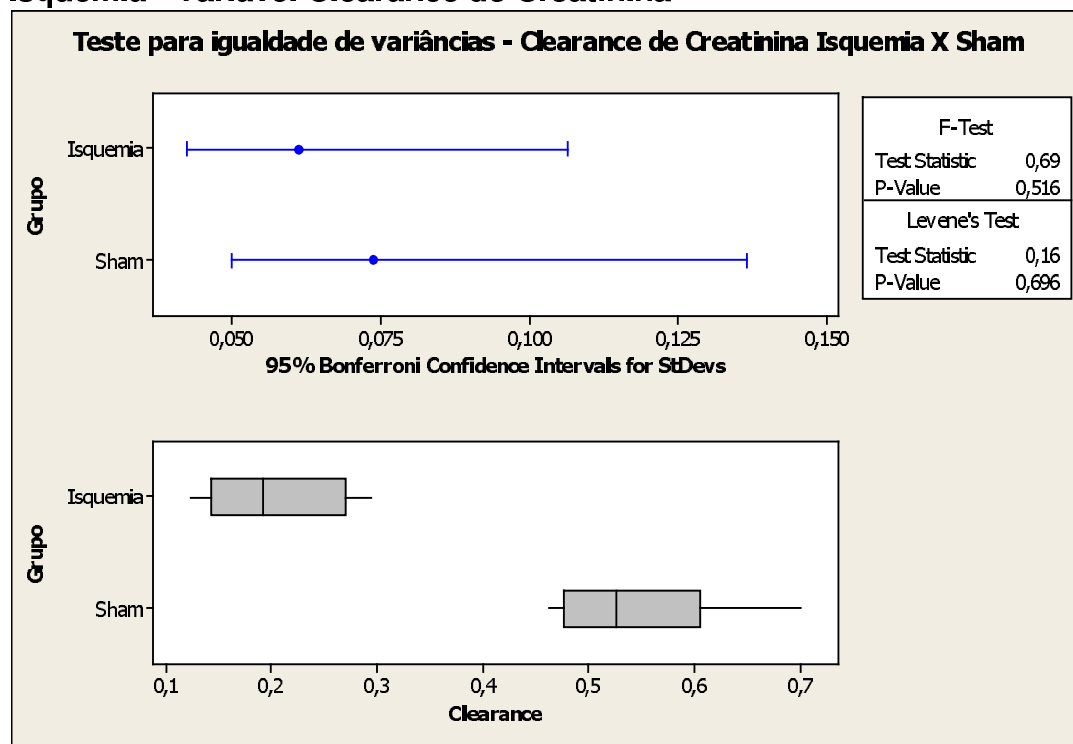


Gráfico D3 – Teste de Levene de igualdade de variância para grupos Sham X Isquemia - Variável Fração de Excreção de Sódio

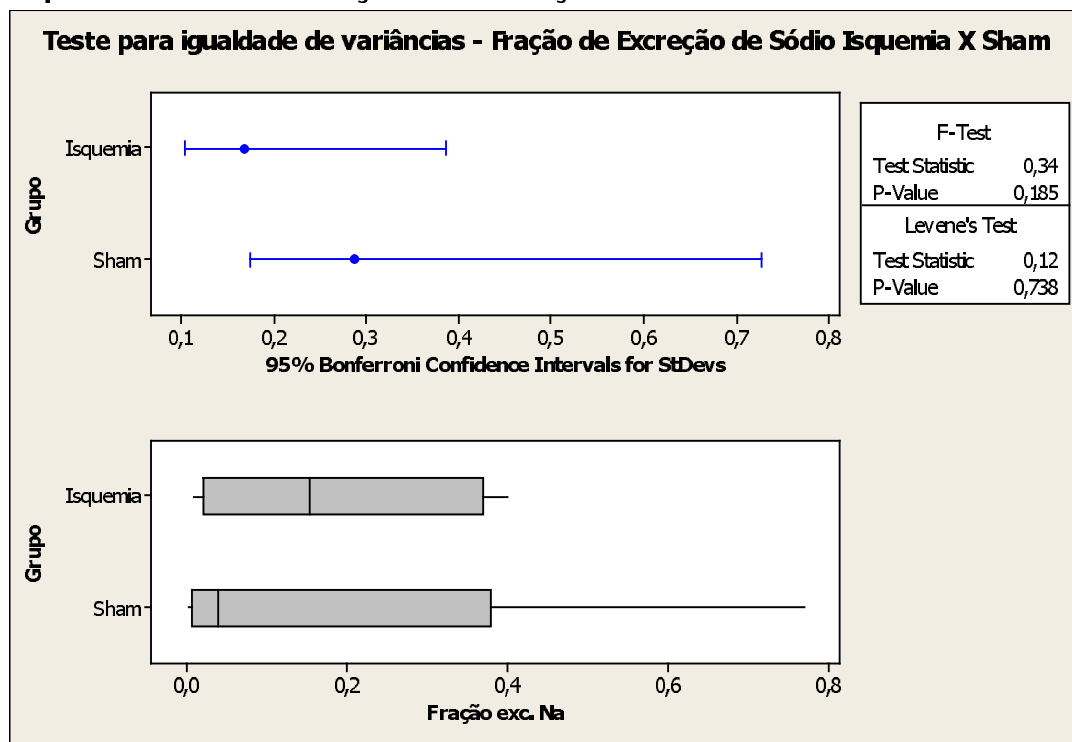


Gráfico D4 – Teste de Levene de igualdade de variância para grupos Sham X Sham + Alopurinol - Variável Volume

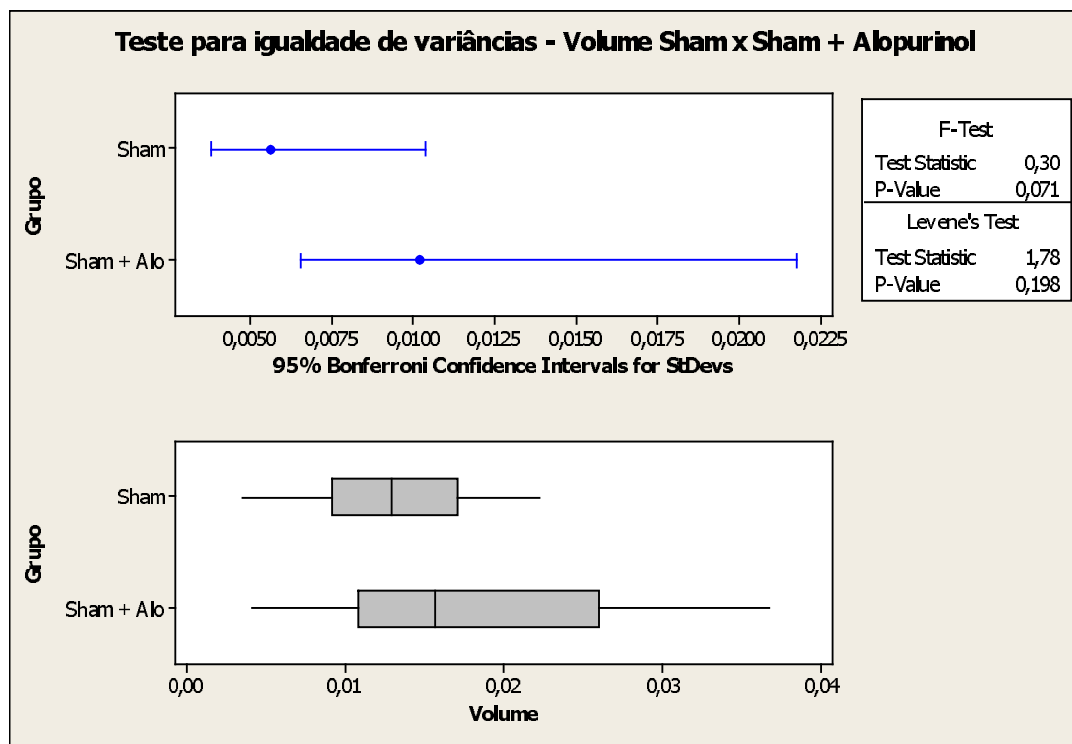


Gráfico D5 – Teste de Levene de igualdade de variância para grupos Sham X Sham + Alopurinol - Variável Clearance de Creatinina

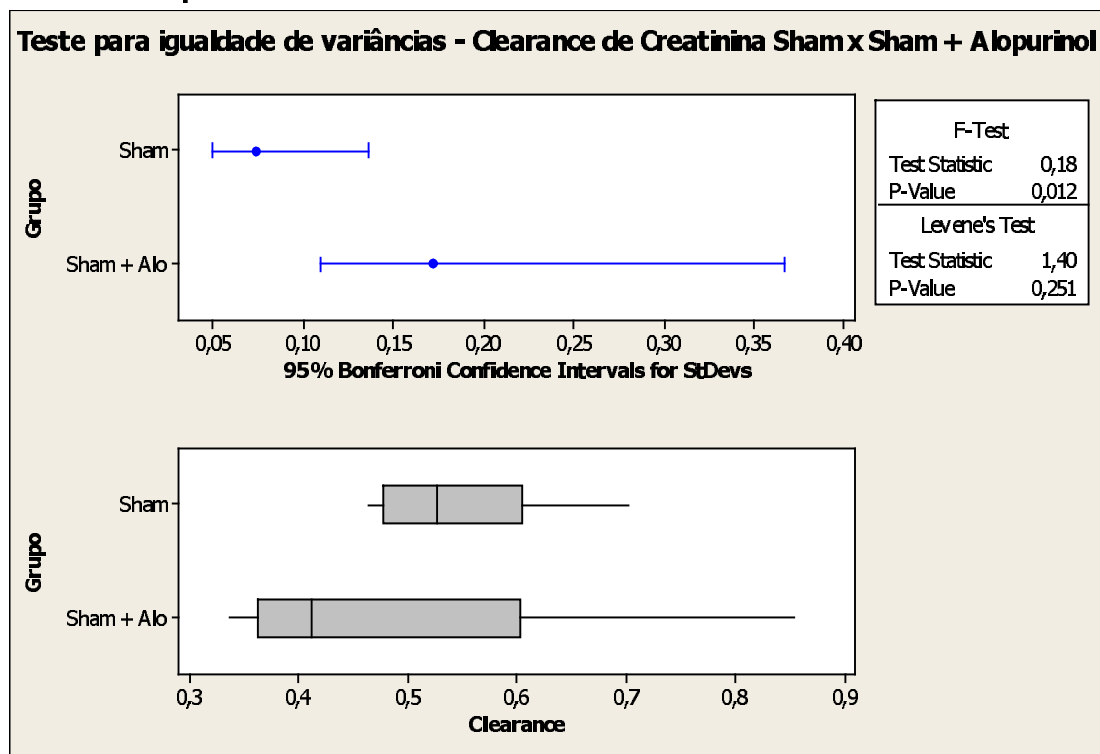


Gráfico D6 – Teste de Levene de igualdade de variância para grupos Sham X Sham + Alopurinol - Variável Fração de Excreção de Sódio

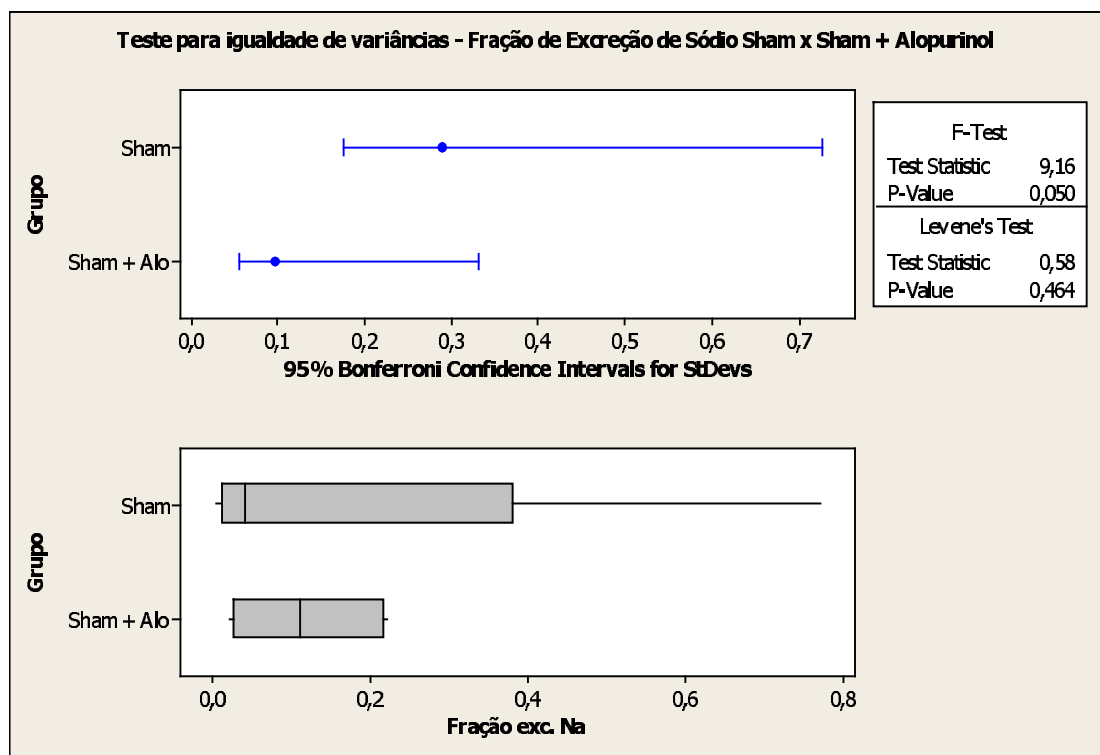


Gráfico D7 – Teste de Kolmogorov-Smirnoff para Normalidade – Grupo Sham – Variável Volume

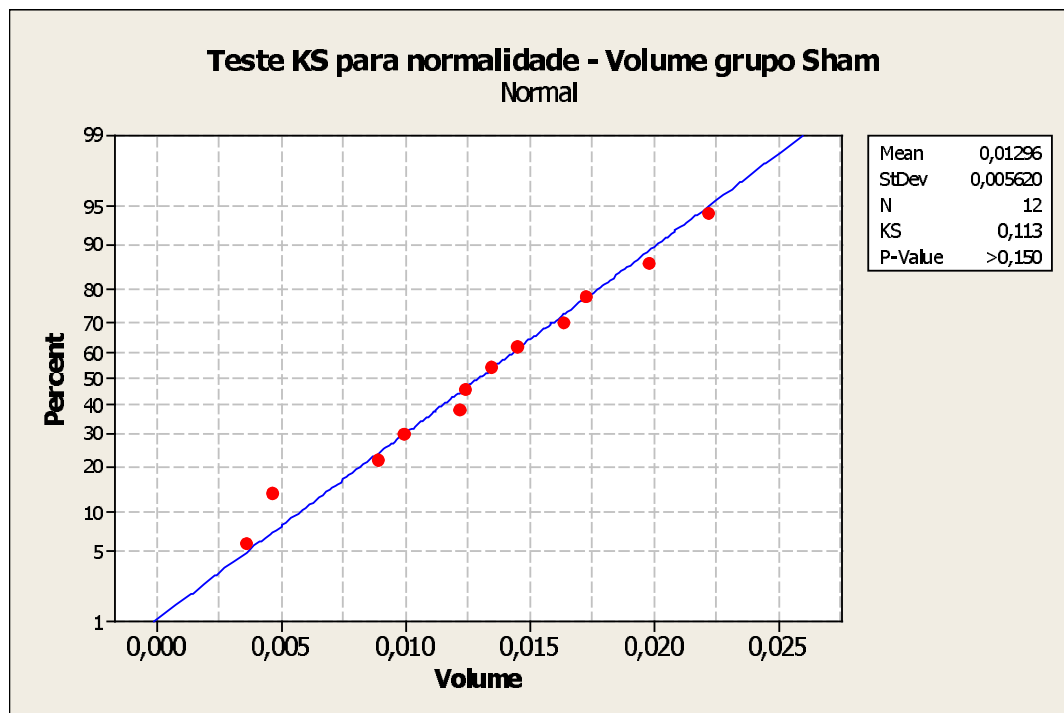


Gráfico D8 – Teste de Kolmogorov-Smirnoff para Normalidade – Grupo Sham – Variável Clearance de Creatinina

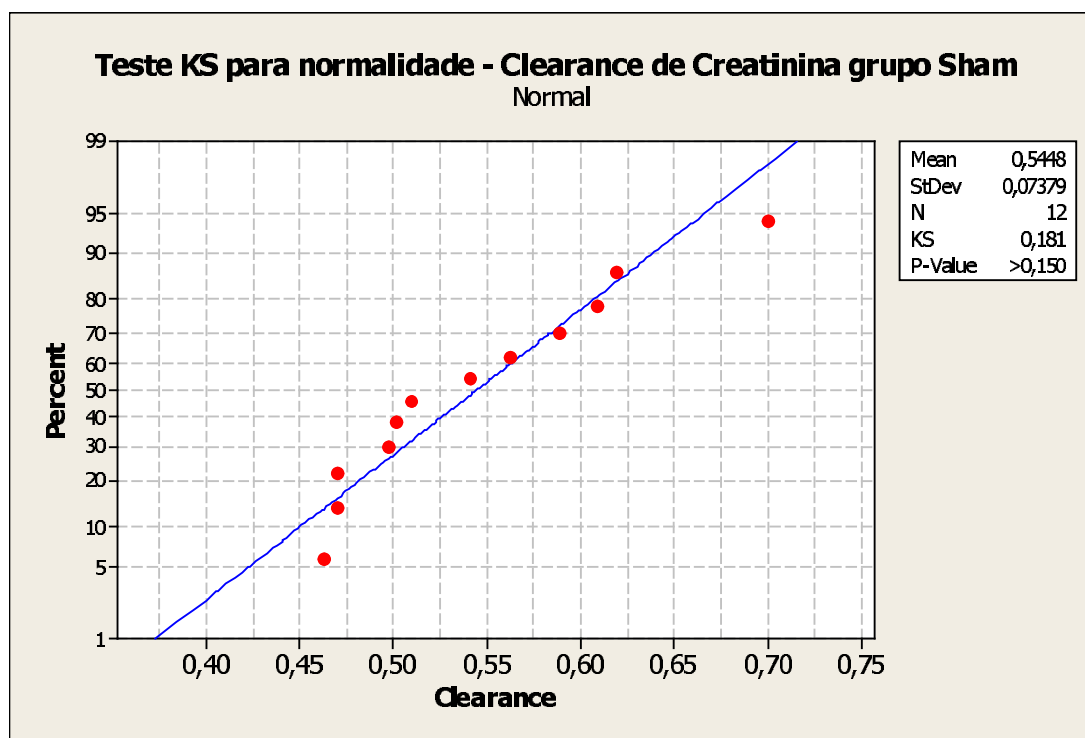


Gráfico D9 – Teste de Kolmogorov-Smirnoff para Normalidade – Grupo Sham – Variável Fração de Excreção de Sódio

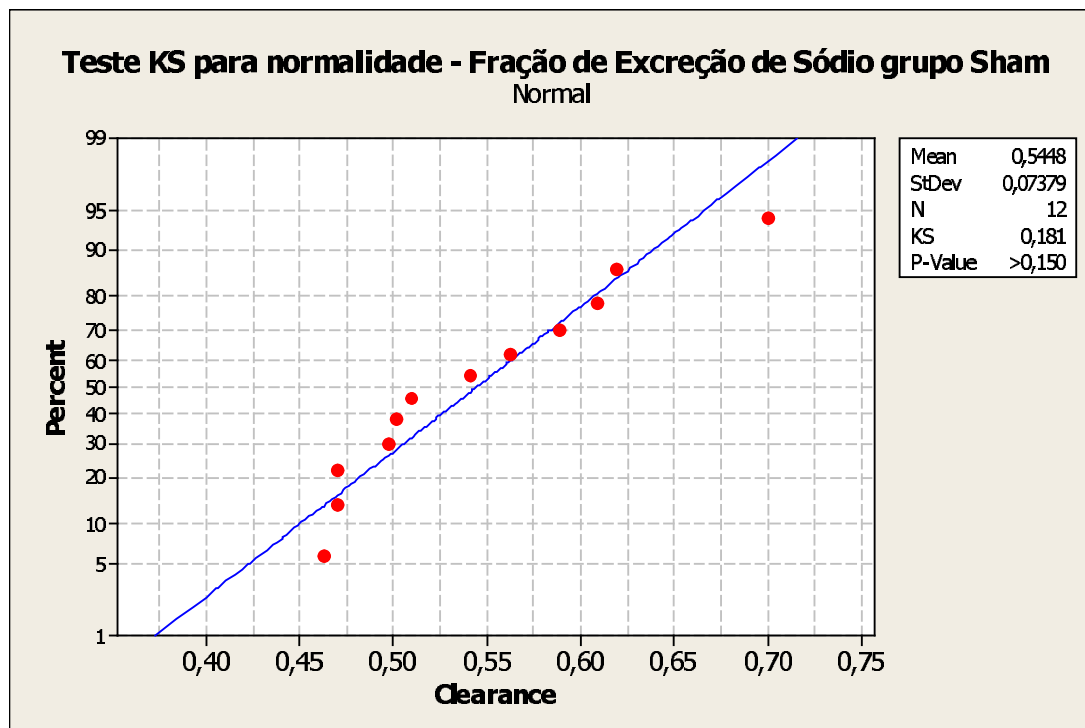


Gráfico D10 – Teste de Kolmogorov-Smirnoff para Normalidade – Grupo Isquemia – Variável Volume

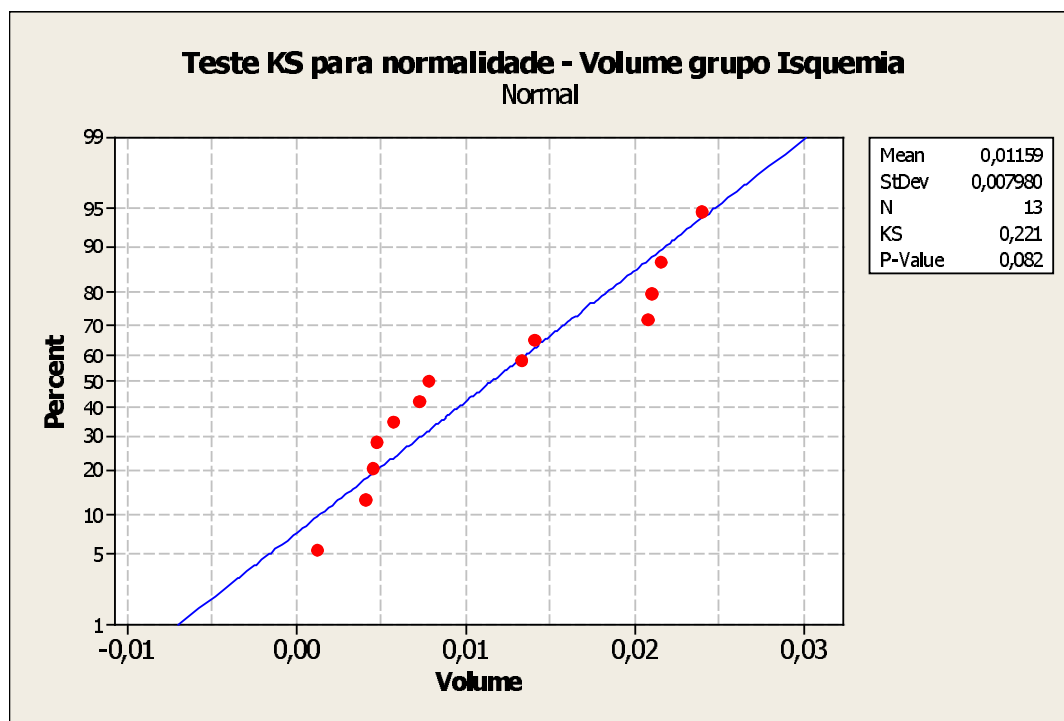


Gráfico D11 – Teste de Kolmogorov-Smirnoff para Normalidade – Grupo Isquemia
– Variável Clearance de Creatinina

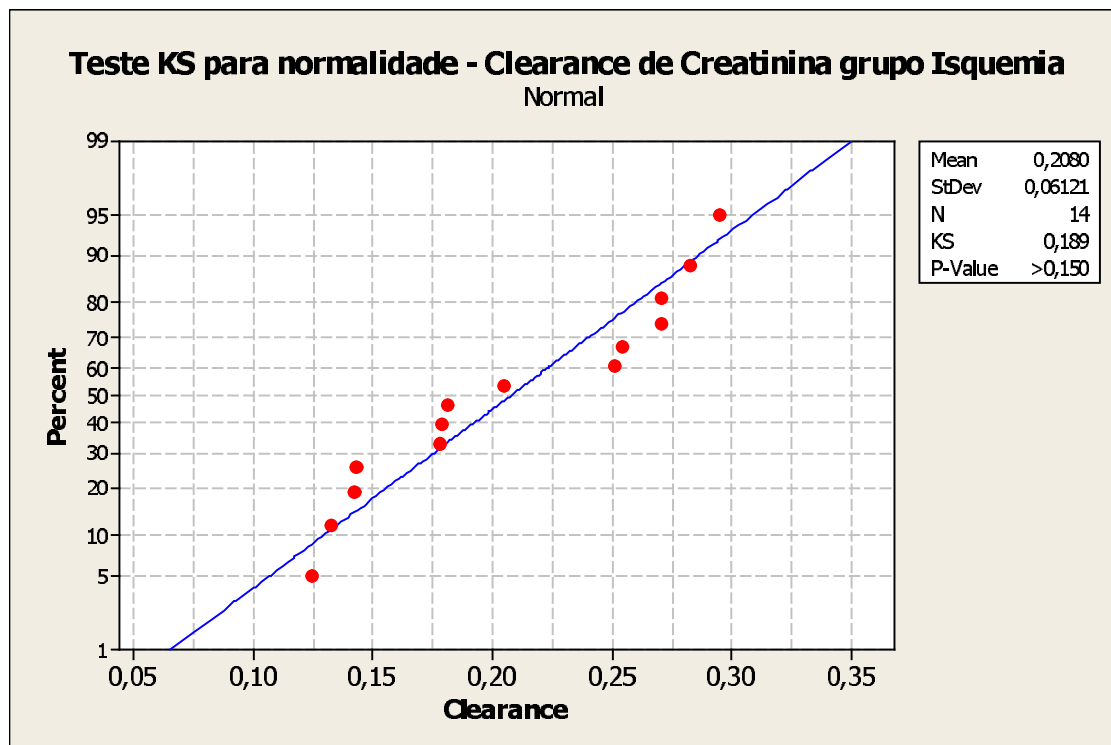


Gráfico D12 – Teste de Kolmogorov-Smirnoff para Normalidade – Grupo Isquemia
– Variável Fração de Excreção de Sódio

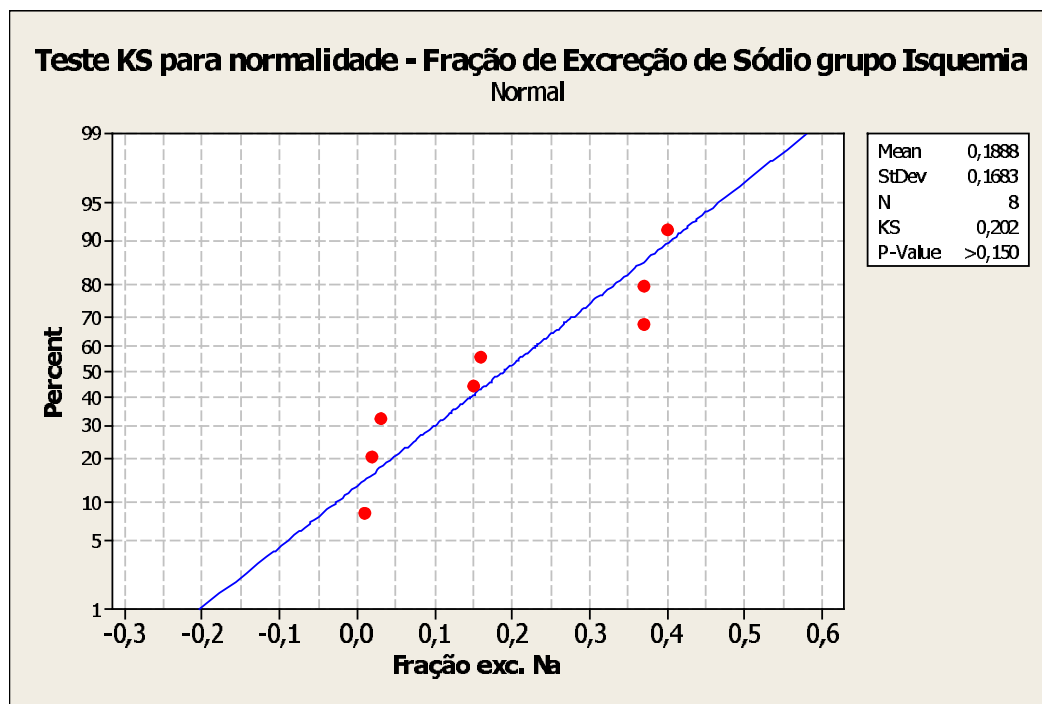


Gráfico D13 – Teste de Kolmogorov-Smirnoff para Normalidade – Grupo Sham + Alopurinol – Variável Volume

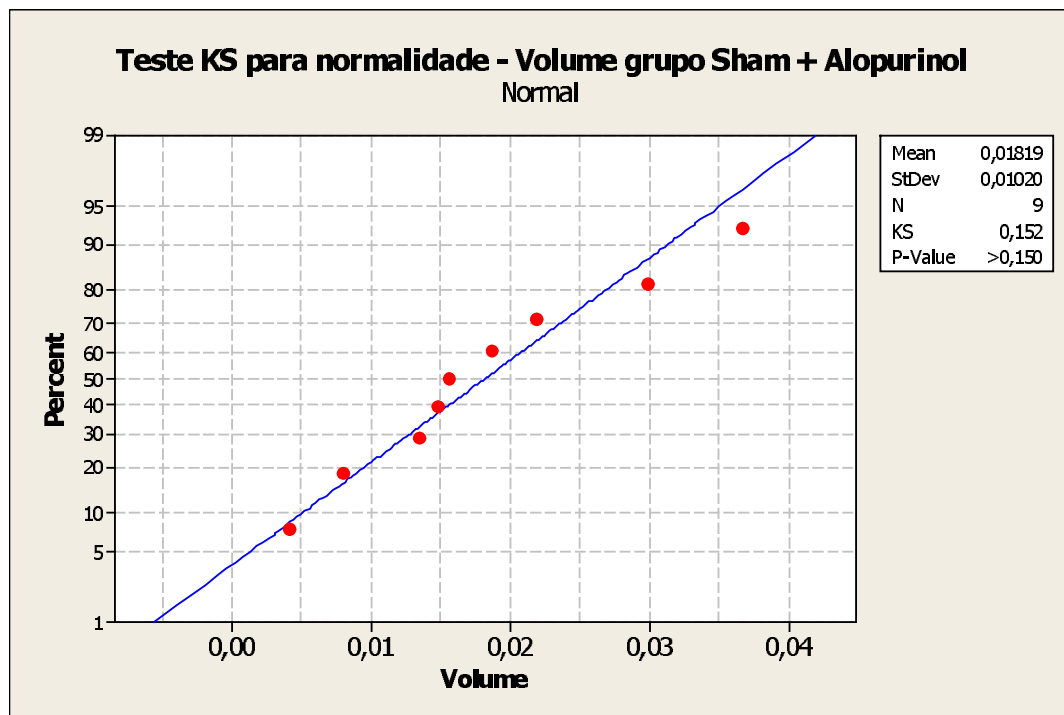


Gráfico D14 – Teste de Kolmogorov-Smirnoff para Normalidade – Grupo Sham + Alopurinol – Variável Clearance de Creatinina

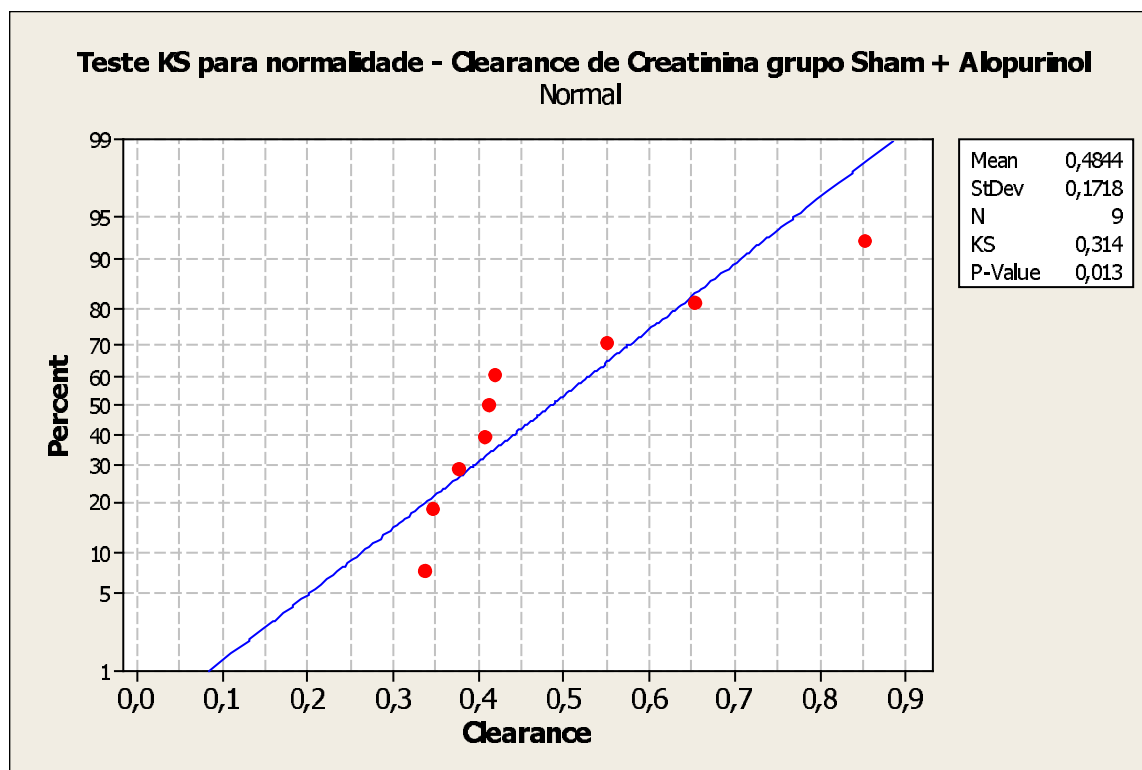


Gráfico D15 – Teste de Kolmogorov-Smirnoff para Normalidade – Grupo Sham + Alopurinol – Variável Clearance de Creatinina

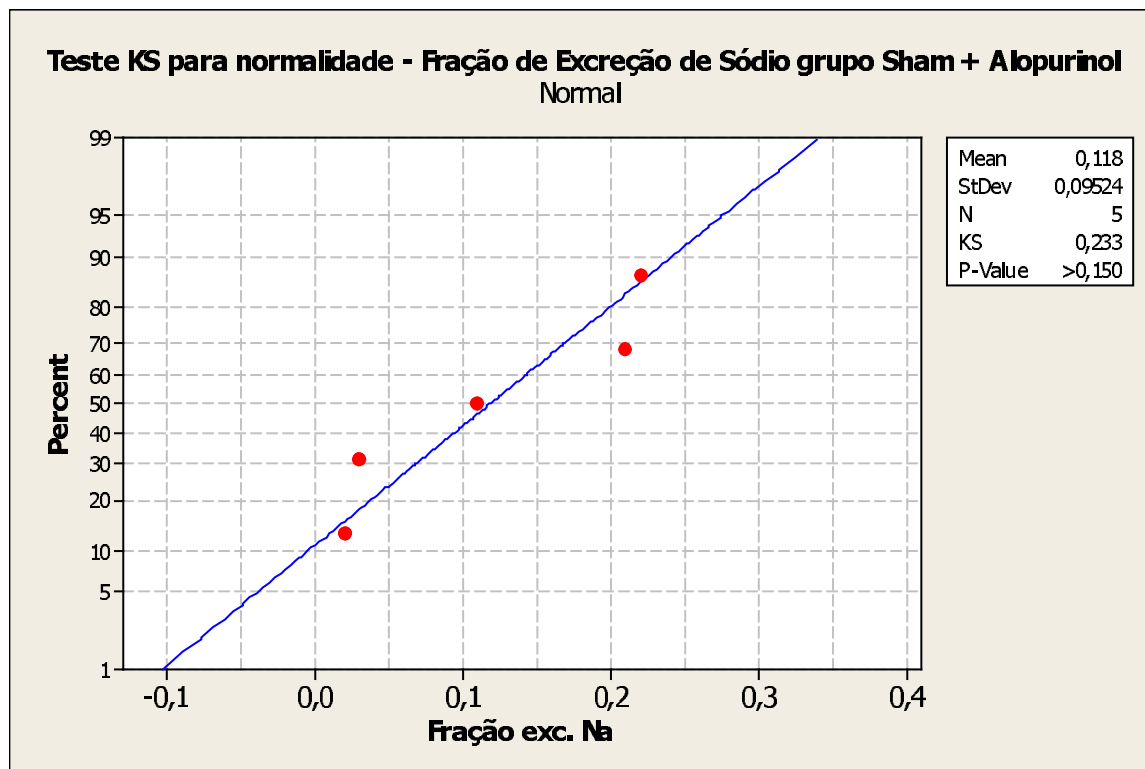


Tabela D16 – Teste t homocedástico para igualdade de médias grupo Isquemia contra Sham - variável Volume

Two-sample T for Volume

Grupo
Isquemia
Sham

Difference = μ (Isquemia) - μ (Sham)

Estimate for difference: -0,001372

95% CI for difference: (-0,007129; 0,004385)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -0,49 P-Value = 0,627 DF = 23

Tabela D17 – Teste t homocedástico para igualdade de médias grupo Isquemia contra Sham - variável Clearance de Creatinina

Two-sample T for Clearance

Grupo
Isquemia
Sham

Difference = μ (Isquemia) - μ (Sham)

Estimate for difference: -0,336773

95% CI for difference: (-0,391390; -0,282155)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -12,73 P-Value = 0,000 DF = 24

Tabela D18 – Teste t homocedástico para igualdade de médias grupo Isquemia contra Sham - variável Fração de Excreção de Sódio

Two-sample T for Fração exc. Na

Grupo
Isquemia
Sham

Difference = μ (Isquemia) - μ (Sham)

Estimate for difference: -0,000107

95% CI for difference: (-0,258930; 0,258715)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -0,00 P-Value = 0,999 DF = 13

Tabela D19 – Teste t homocedástico para igualdade de médias grupo Sham contra Sham + Alopurinol - variável Volume

Two-sample T for Volume

Grupo
Sham
Sham + Alo

Difference = μ (Sham) - μ (Sham + Alo)

Estimate for difference: -0,005231

95% CI for difference: (-0,012504; 0,002043)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -1,51 P-Value = 0,149 DF = 19

Tabela D20 – Teste t homocedástico para igualdade de médias grupo Sham contra Sham + Alopurinol - variável Fração de Excreção de Sódio

Two-sample T for Fração exc. Na

Grupo
Sham
Sham + Alo

Difference = μ (Sham) - μ (Sham + Alo)

Estimate for difference: 0,070857

95% CI for difference: (-0,230800; 0,372514)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 0,52 P-Value = 0,612 DF = 10

Tabela D21 – Modelo Gama para variável Fração de Excreção de Sódio nos grupos Sham e Sham + Alopurinol – tabela de testes sobre os coeficientes

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.34160	0.15738	-0.08093	0.11519	0.62411

Coefficients:

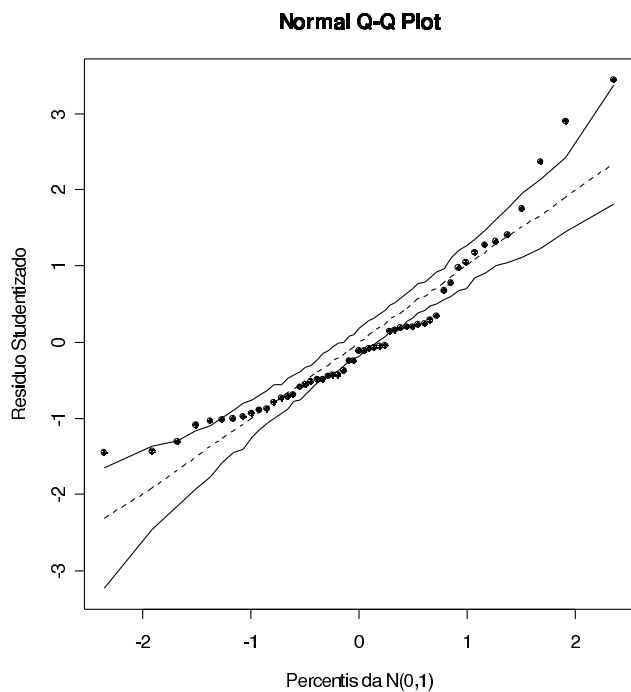
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.60732	0.07278	-8.345	8.9e-08
alopurinol1	0.11755	0.11117	-1.057	0.304

Null deviance: 1.1165 on 20 degrees of freedom

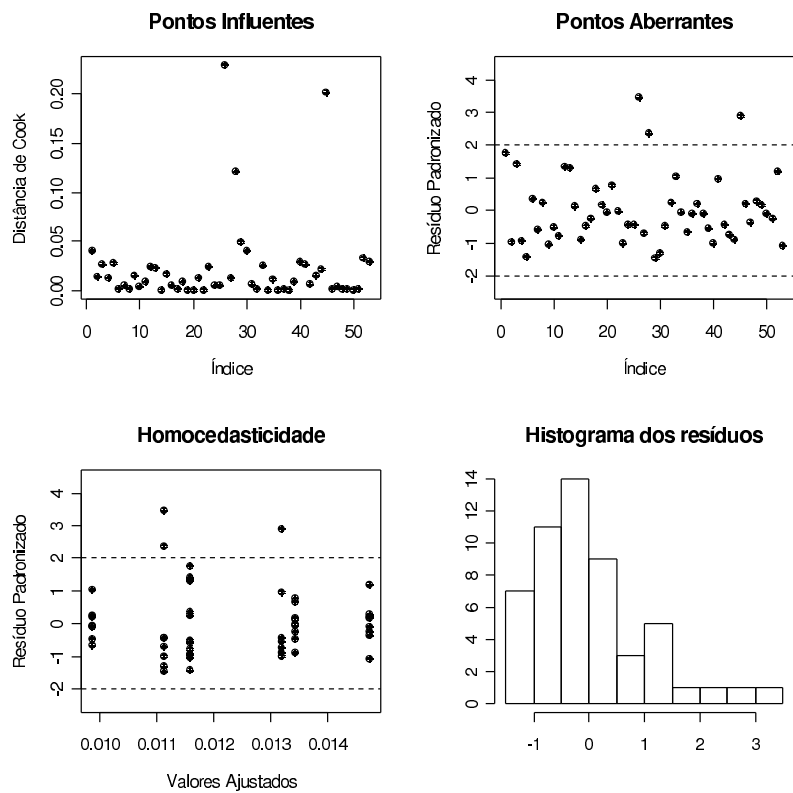
Residual deviance: 1.0459 on 19 degrees of freedom

Apêndice E - Diagnósticos

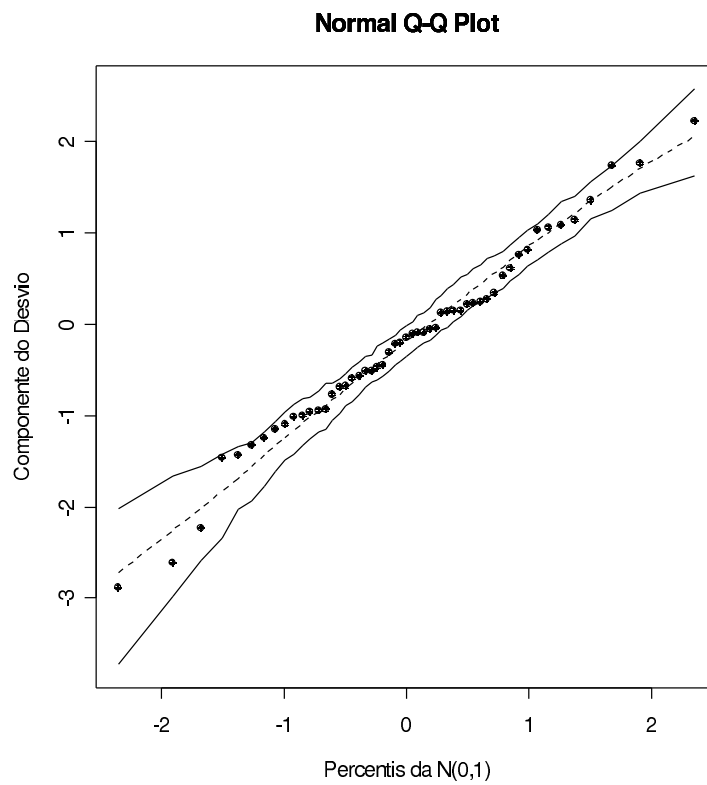
E1 – Envelope para ajuste de modelo Normal à variável Volume.



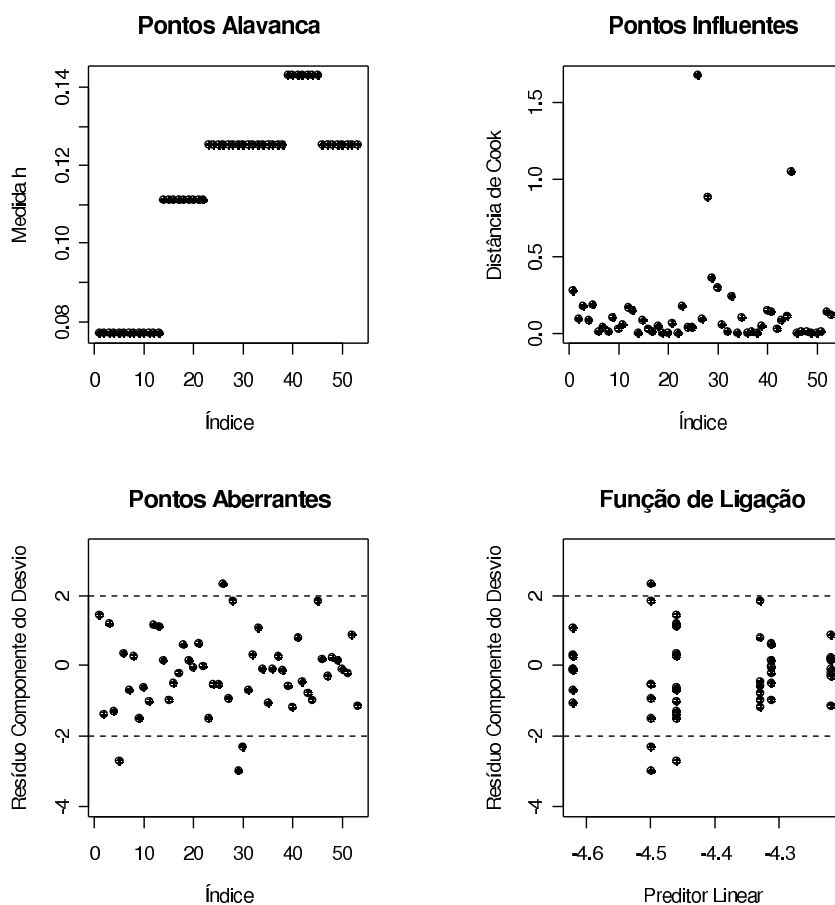
E2 – Gráficos de diagnóstico para modelo Normal variável Volume



E3 – Envelope para ajuste de modelo gama saturado, com ligação log – variável Volume.



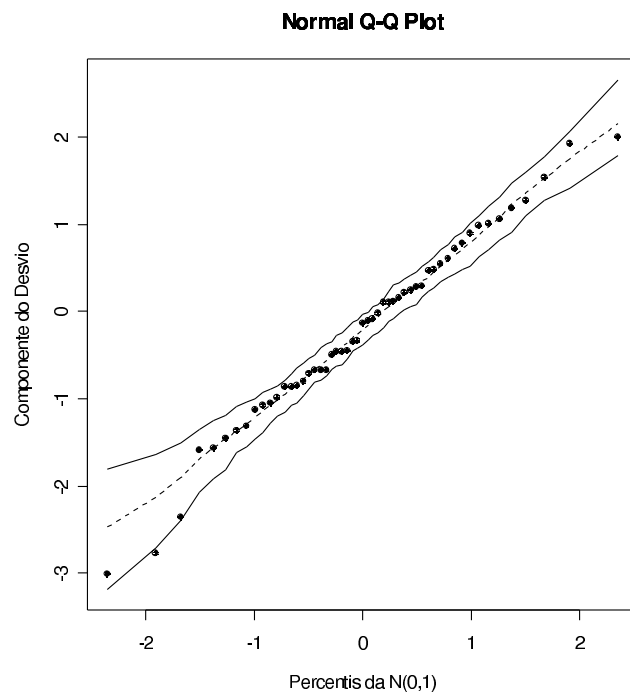
E4 – Gráficos para pontos de alavanca, influentes e aberrantes – modelo gama saturado com ligação log – variável Volume.



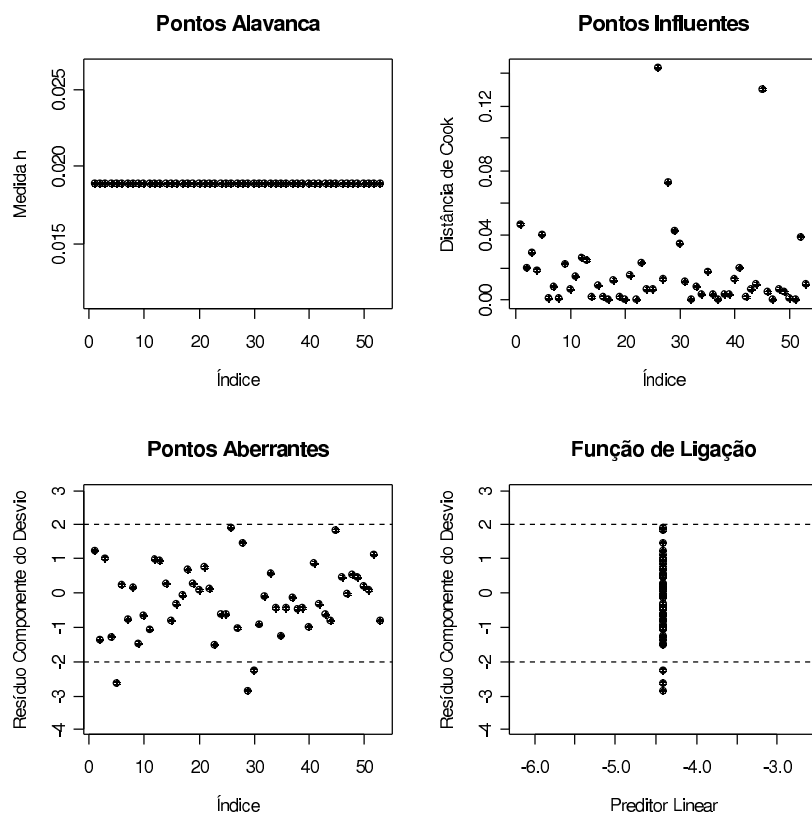
E5 – Teste qui-quadrado para qualidade de ajuste – modelo gama saturado para Volume

Desvio	G.L.	P-valor
21,234	47	0,999566

E6 – Envelope para modelo final variável Volume – modelo Gama, ligação log, apenas com o intercepto como variável explicativa



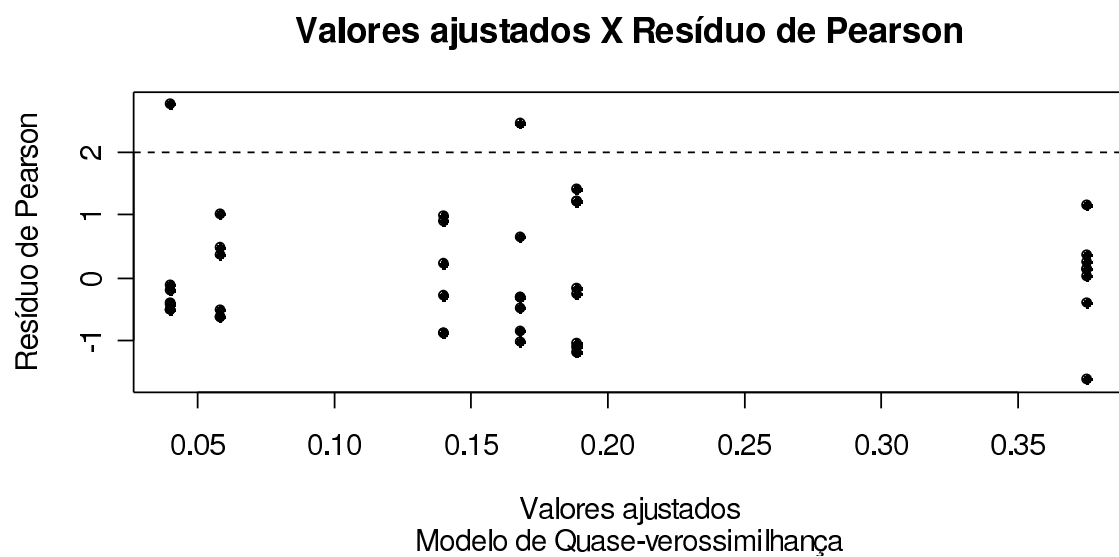
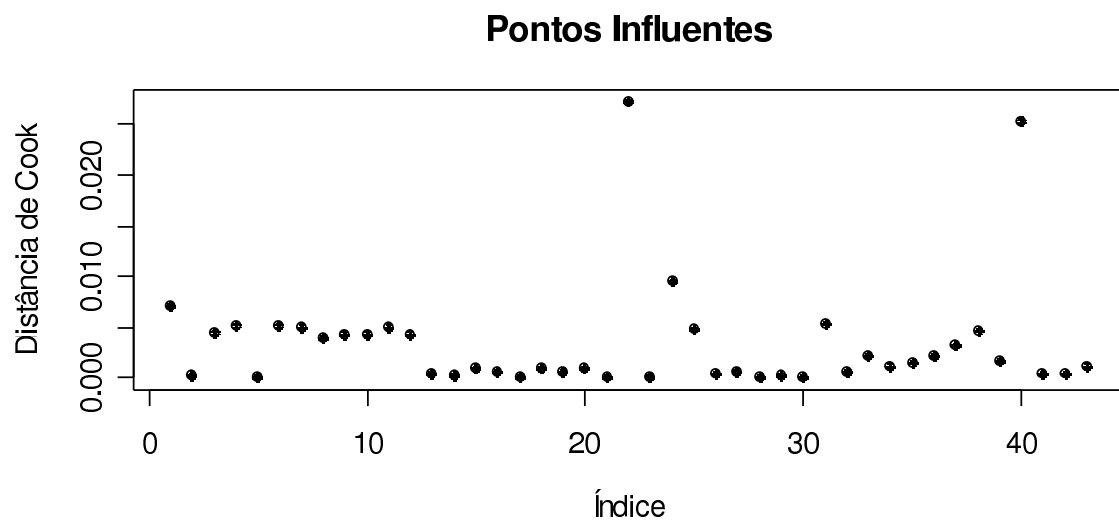
E7 – Gráficos de diagnóstico – modelo final variável Volume – modelo Gama, ligação log, apenas com o intercepto

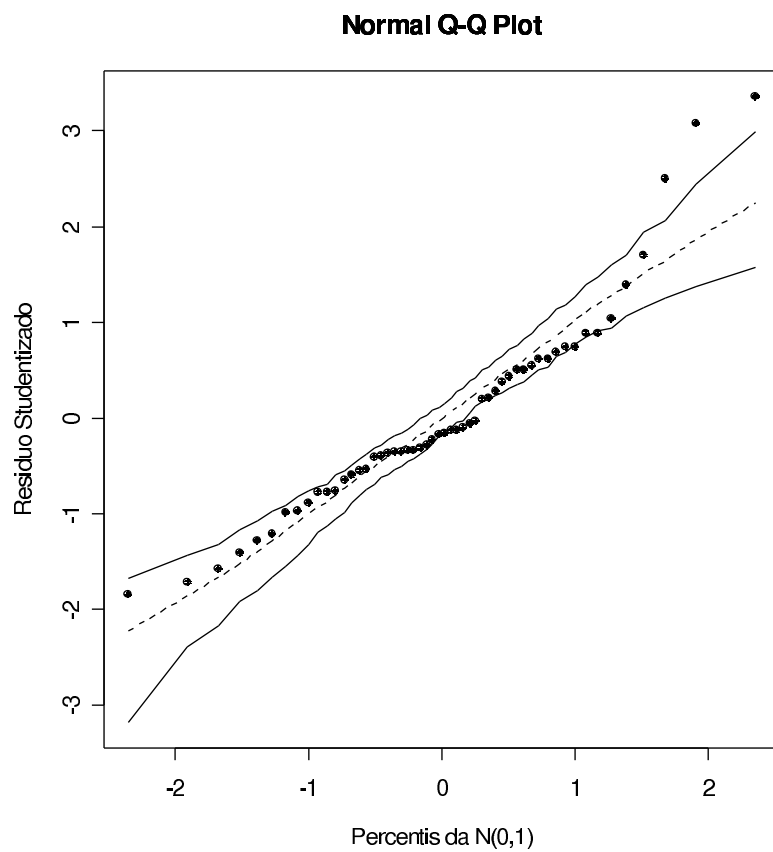


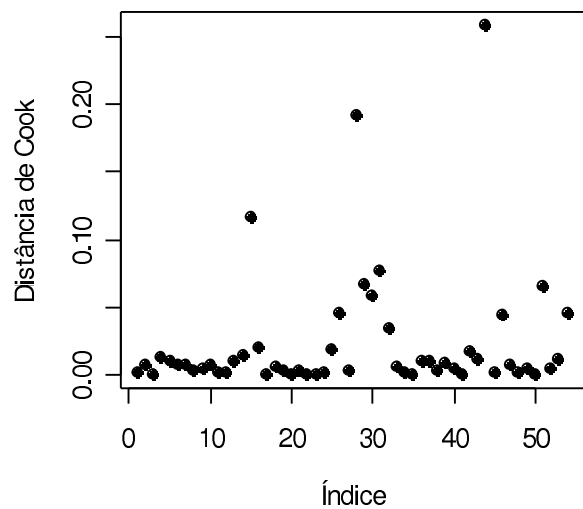
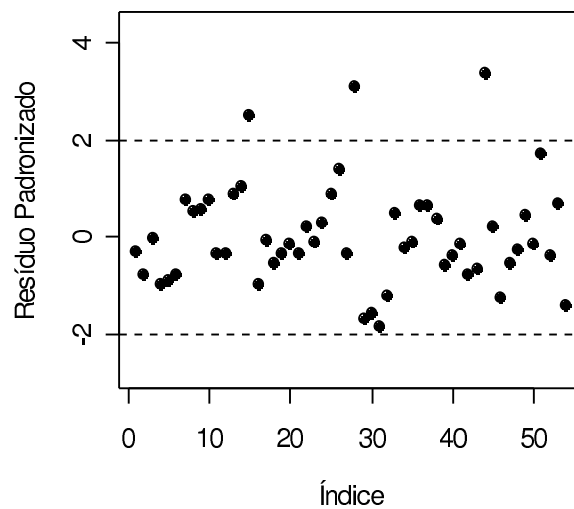
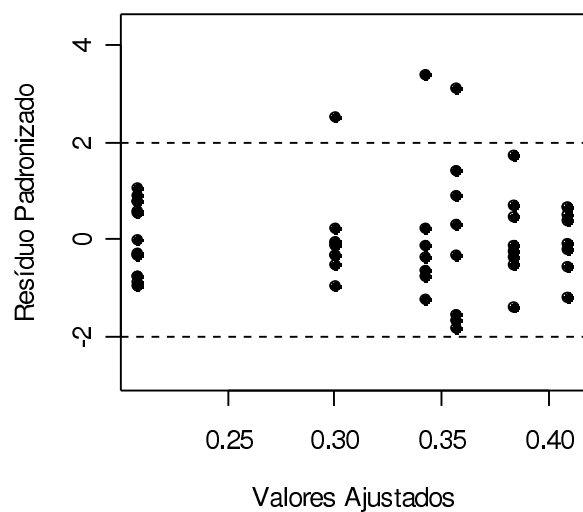
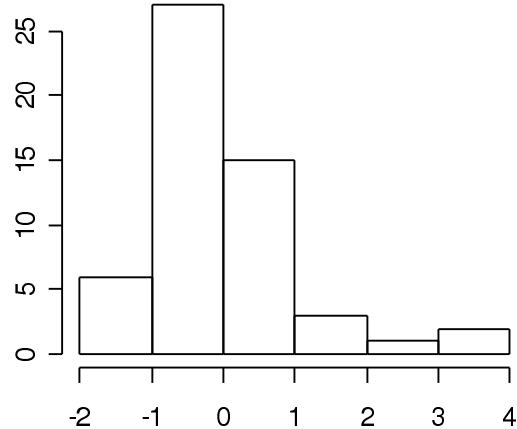
E8 – Teste de qualidade do ajuste – modelo final variável Volume – modelo Gama, ligação log, apenas com o intercepto

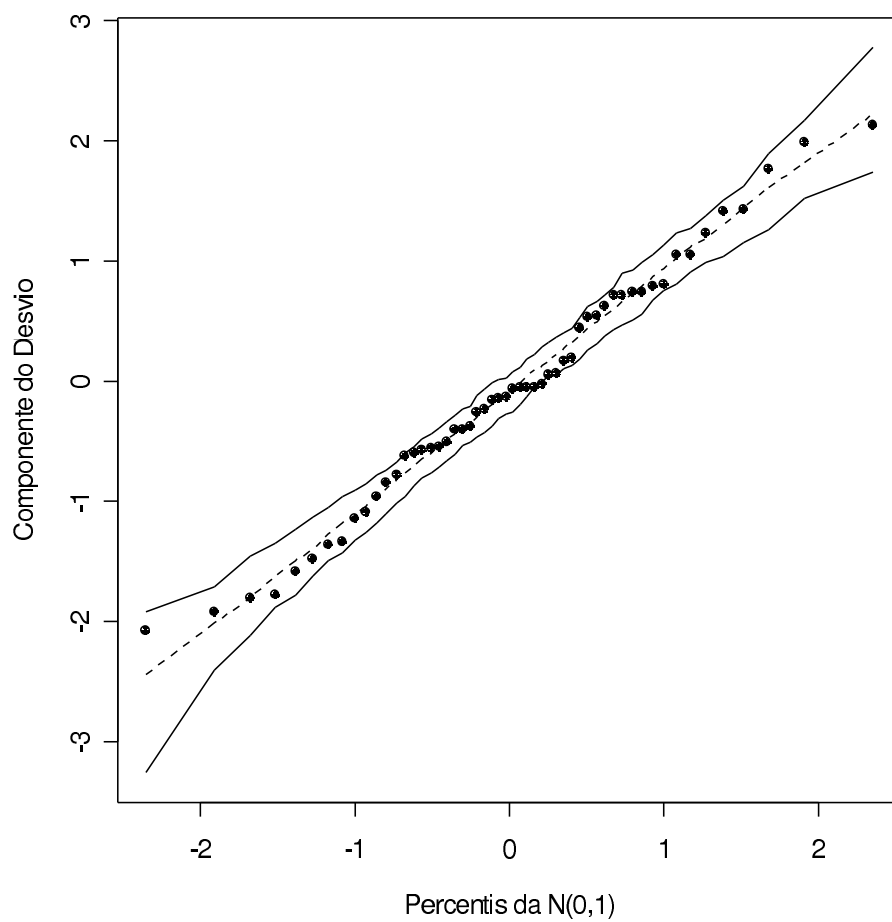
Desvio	G.L.	P-valor
22,1	52	0,9999

**E9 – Diagnóstico para modelo de Quase-verossimilhança saturado, variável
Fração de Excreção de sódio**

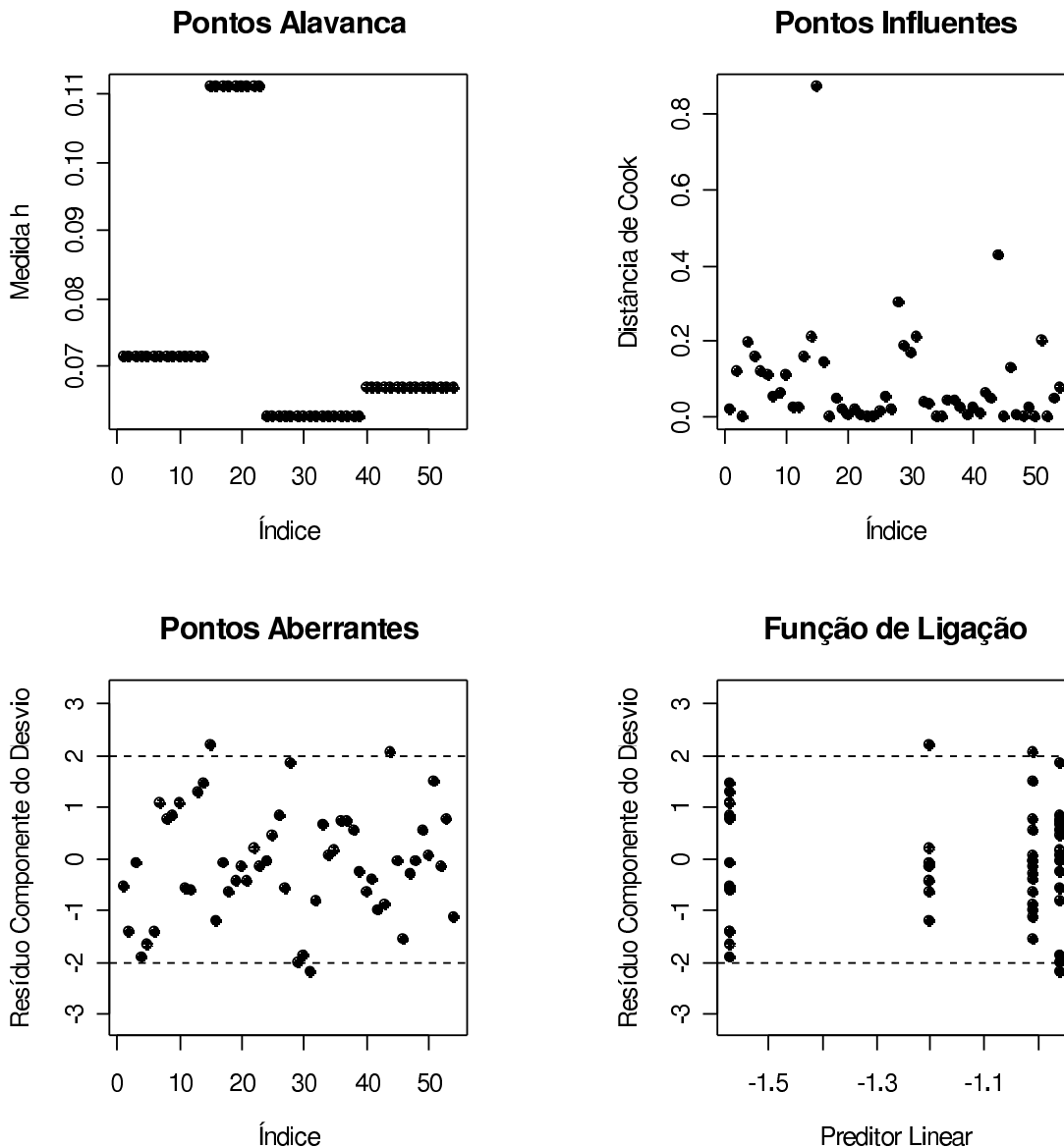


E10 – Envelope para modelo normal – variável Clearance de Creatinina

E11 – Diagnósticos para modelo normal – variável Clearance de Creatinina**Pontos Influentes****Pontos Aberrantes****Homocedasticidade****Histograma dos resíduos**

E12 – Envelope modelo final – variável Clearance de Creatinina**Normal Q-Q Plot**

E13 – Diagnóstico modelo final – variável Clearance de Creatinina



E14 – Teste de qualidade do ajuste – modelo final variável Clearance

Desvio	G.L.	P-valor
3,7299	50	1

Apêndice F - Resultados dos ajustes – modelos finais selecionados

F1 – Modelo Gama com ligação log, apenas com o intercepto – selecionado para a variável Volume

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.7818	-0.5122	-0.0799	0.2860	1.853

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-4.40197	0.08226	-53.51	<2e-16

(Dispersion parameter for Gamma family taken to be 0.358668)

Null deviance: 22.1 on 52 degrees of freedom

Residual deviance: 22.1 on 52 degrees of freedom

F2 – Modelo de Quase-verossimilhança com ligação logito e função de variância $\mu \cdot (1 - \mu)$, com fator tempo em dois níveis – 48 horas, e 24/72 horas. Selecionado para a variável Fração de Excreção de Sódio

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.6502	-0.3139	-0.1621	0.3270	0.7842

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-1.2362	0.1764	-7.007	1.61e-08
Tempo48	-1.7496	0.5262	-3.325	0.00187

(Dispersion parameter for quasi family taken to be 0.1574582)

Null deviance: 9.2466 on 42 degrees of freedom

Residual deviance: 6.7172 on 41 degrees of freedom

F3 – Modelo Gama com ligação log, fatores Alopurinol, Tempo (dois níveis – 24 e mais de 24 horas), e interação – selecionado para a variável Clearance

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.5466	-0.1591	-0.0251	0.1828	0.5470

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-1.57005	0.07283	-21.557	< 2e-16
Alopurinol1	0.36729	0.11643	3.155	0.00272
Tempo48	0.61065	0.09973	6.123	1.41e-07
Alopurinol1:Tempo48	-0.41667	0.15215	-2.739	0.00853

(Dispersion parameter for Gamma family taken to be 0.07426449)

Null deviance: 6.8436 on 53 degrees of freedom

Residual deviance: 3.7299 on 50 degrees of freedom