

RAE-CEA 12P01

Estudo do tempo de sobrevivência do caramujo *Biomphalaria glabrata* exposto a agentes químicos e físicos

Lúcia Pereira Barroso

Raquel Valente Barreiros

Thais Mateussi Cicolin

São Paulo, junho de 2012

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

TÍTULO: Estudo do tempo de sobrevivência do caramujo *Biomphalaria glabrata* exposto a agentes químicos e físicos

PESQUISADORA: Rebeca da Silva Cantinha.

ORIENTADORA: Dra. Eliana Nakano

INSTITUIÇÃO: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e Instituto Butantan

FINALIDADE DO PROJETO: Doutorado

RESPONSÁVEIS PELA ANÁLISE: Lúcia Pereira Barroso

Raquel Valente Barreiros

Thaís Mateussi Cicolin

FICHA TÉCNICA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- COLOSIMO, E. A. e GIOLO, S. R. (2006). **Análise de Sobrevida Aplicada**. 1.ed. São Paulo Edgard Blücher, 367p.
- BUSSAB, W. O. e MORETTIN, P. A. (2011). **Estatística Básica**. 7^a.ed. São Paulo: Saraiva, 540p.
- FINNEY, D.J. (1947). **Probit Analysis**. 1^a. ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

PROGRAMAS COMPUTACIONAIS UTILIZADOS:

Microsoft Excel *for Windows* ®, versão 2007;

Microsoft Word *for Windows* ®, versão 2007;

MINITAB ®, versão 16;

RStudio ®, versão 0.96.228.

TÉCNICAS ESTATÍSTICAS UTILIZADAS: (entre parênteses a classificação ISI)

Análise Descritiva Unidimensional (03:010);

Análise de Sobrevida (13:070).

ÁREAS DE APLICAÇÃO:

Bioestatística (14:030);

Ciências do Ambiente e Ecologia (14:060).

RESUMO

O estudo da proteção do caramujo *Biomphalaria glabrata*, proporcionada pela indução da proteína HSP70, tem como objetivo relacionar o aumento da sobrevivência do caramujo quando este se encontra numa situação de estresse ou agressão que possa levá-lo à morte, o que, nos experimentos, significa colocá-lo em exposição a uma alta concentração de cádmio (0,7 ppm) ou a uma temperatura letal (42°C).

Em um primeiro momento, a pesquisadora objetivou encontrar as temperaturas e as doses subletais, que são aquelas que estressam ou agredem os animais para que haja a indução da proteína de proteção, mas que não os levem à morte. Com a realização da análise descritiva, procurou-se confirmar se os valores escolhidos (33°C e 0,2 ppm de cádmio) dentre os fixados, eram realmente os que mais aumentavam a sobrevivência.

Após os valores subletais serem definidos, partiu-se para a segunda parte do estudo. Esta visa avaliar se os caramujos expostos a uma situação de estresse, que aqui foram definidas como a pré-exposição à temperatura ou à dose de cádmio subletal, apresentam um tempo de sobrevivência maior, ou seja, uma maior resistência, quando expostos a uma situação que os leve à morte.

Os animais pré-expostos à temperatura subletal de 33°C foram, posteriormente, expostos a uma dose letal de 0,7 ppm de cádmio. Os pré-expostos a uma dose subletal de 0,2 ppm de cádmio foram, em um segundo momento, expostos a uma temperatura letal de 42°C.

Pelas análises descritiva e inferencial, concluiu-se que o estresse sofrido pelo caramujo nas pré-exposições aumentou o tempo de sobrevivência.

Índice

1. Introdução.....	7
2. Objetivos.....	9
3. Descrição do estudo.....	9
3.1. Estudos preliminares (A).....	10
3.1.1. Estudo A1: Temperatura ideal para indução da HSP70.....	10
3.1.2. Estudo A2: Concentração de cádmio ideal para indução da HSP70.....	11
3.2. Estudos de tolerância cruzada entre temperatura e cádmio (B).....	13
3.2.1. Estudo B1: Resistência ao cádmio induzida pela temperatura.....	13
3.2.2. Estudo B2: Resistência à temperatura induzida pelo cádmio.....	14
4. Descrição das variáveis.....	15
5. Análise descritiva.....	15
5.1. Estudo A1.....	15
5.2. Estudo A2.....	16
5.3. Estudo B1.....	17
5.4. Estudo B2.....	17
6. Análise inferencial.....	18
6.1. Estratégia de análise.....	18
6.1.1. Estudo A1.....	18
6.1.2. Estudo A2.....	19

6.1.3. Estudo B1.....	20
6.1.4. Estudo B2.....	20
6.2. Ajuste do modelo.....	21
6.2.1. Estudo A1.....	21
6.2.2. Estudo A2.....	23
6.2.3. Estudo B1.....	23
6.2.4. Estudo B2.....	25
6.3. Curva dose-resposta.....	26
7. Conclusões.....	26
APÊNDICE A: Tabelas, gráficos e figuras.....	28

1. Introdução

Secundários apenas aos artrópodes em número de espécies viventes descritas, os moluscos são de grande relevância, constituindo o segundo filo de importância. Muitas de suas espécies têm sido empregadas na experimentação científica, especialmente em estudos de monitoramento ambiental.

Dentre estas, o caramujo *Biomphalaria glabrata*, um dos hospedeiros intermediários no ciclo do *Schistosoma mansoni* no Brasil, vem ganhando destaque nas investigações científicas, uma vez que este molusco, de fácil cultivo em laboratório, demonstrou elevada sensibilidade à toxicidade e mutagenicidade induzida pela presença de elementos químicos em condições experimentais. Essa característica, aliada ao seu fácil manuseio, o coloca na condição de excelente modelo para biomonitoramento ambiental.

Uma das pesquisas feitas com o *B. glabarata* está relacionada à sua exposição a agentes físicos e químicos, possibilitando, assim, a incrementação dos subsídios para a aplicação desses moluscos em protocolos de monitoramento.

Experimentos com este caramujo vêm contribuindo para a busca de novas técnicas de estudo e de novas moléculas alvo para possível utilização em estudos ambientais. A classe de estruturas investigada para a realização dessa busca é bem vasta e engloba, praticamente, todas as macromoléculas presentes nos organismos vivos incluindo material genético, proteínas, enzimas e lipídios.

Entre essas moléculas vitais, uma que vem despertando interesse em estudos ambientais é a proteína chaperona, que é responsável por assegurar a correta conformação dos polipeptídeos, cujas funções são: desenovelar proteínas com acomodação inadequada possibilitando novo enovelamento; conectar peptídeos lesados; solubilizar agregados protéicos; transportar proteínas para serem destruídas; entre outras.

Entre as chaperonas, destaca-se a HSP70, que tem sido estudada e sugerida como possível biomarcador de contaminação ambiental. Além de ser considerada a

mais conservada entre os diversos filos, é também a mais abundante e bem caracterizada, associando-se, preferencialmente, às organelas sensíveis às mudanças no ambiente celular, tais como ribossomos e o RNA nuclear.

Ela atua protegendo o processamento do RNA e a síntese protéica, o que, por sua vez, permite que os tecidos se recuperem dos danos induzidos pelo ambiente. Quando os danos na proteína são tão intensos que a HSP70 não consegue restaurá-la à sua conformação nativa, esta, já danificada, é carregada até os lisossomos onde será digerida, funcionando, também, como transportadora da molécula comprometida.

Diversos trabalhos já demonstraram o potencial desta classe de proteínas como marcador no monitoramento ambiental por meio de experimentos nos quais organismos foram expostos a agentes químicos, físicos e biológicos, e observou-se uma indução da HSP70 relacionada ao estresse sofrido pelo animal.

Considerando o potencial de aplicação do *B. glabrata* em protocolos experimentais, especialmente para estudos ambientais, e o interesse pela HSP70 em protocolos de monitoramento ambiental, será apresentado, neste relatório, um estudo estatístico com base em experimentos envolvendo caramujos expostos ao calor e ao cádmio (Cd) para observação de indução de termotolerância e tolerância cruzada nestes animais.

O cádmio foi o metal de escolha por ser considerado um poluente ambiental muito frequente em amostras de campo, por ser extremamente tóxico e, também, capaz de produzir radicais livres e de interagir com o mecanismo de transporte transmembrana. Sua interação com os agrupamentos sulfidríla presentes nas proteínas e seus mecanismos de redução do glutathione, aumentam os níveis de estresse oxidativo fazendo com que proteínas alteradas sejam acumuladas no organismo.

2. Objetivos

Este estudo tem como objetivo avaliar:

- Se as escolhas da temperatura de 33°C e da dose de 0,2 ppm de cádmio, feitas pela pesquisadora, como sendo as que melhor estressam o caramujo sem matá-lo, ou seja, como temperatura e dose subletal, são as mais adequadas dentre as possibilidades consideradas.
- Se os animais que foram pré-expostos a uma situação de estresse, neste caso, exposição a uma temperatura subletal de 33°C, têm o tempo de sobrevivência aumentado quando, posteriormente, expostos a uma dose letal de cádmio de 0,7 ppm.
- Se os animais que foram pré-expostos a uma situação de estresse, neste caso, exposição a uma dose subletal de 0,2 ppm de cádmio, têm o tempo de sobrevivência aumentado quando, posteriormente, expostos a uma temperatura letal de 42°C.

3. Descrição do estudo

Os caramujos *B. glabrata* adultos, pigmentados, com 5 a 6 meses de idade, diâmetro médio de concha de 14 mm, coletados em Barreiro (região de Belo Horizonte, MG), cultivados no laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan durante várias gerações e negativos quanto à presença do *S. mansoni* foram mantidos em aquários plásticos (medindo 50x23x17cm) com cerca de 20 litros de água filtrada, decolorada e aerada, na proporção de aproximadamente 300 ml de água por caramujo (Figura A.1). A troca de água ocorreu quinzenalmente, mantida sob um pH próximo de 7,0 e temperatura média de 25°C. Os animais foram submetidos a ciclos de 8 horas no escuro e 16 horas sob luz fria fluorescente, alimentados diariamente com alface fresca (*Lactuca sativa*) *ad libitum* e uma vez por semana com ração para peixes.

Os estudos com os caramujos foram divididos em duas etapas, sendo que, a primeira, tem o objetivo de determinar a temperatura e a concentração de cádmio (Cd) ideais para a indução da proteína HSP70 e, a segunda, estuda a tolerância cruzada desses animais à temperatura e ao cádmio.

3.1. Estudos preliminares (A)

3.1.1. Estudo A1: Temperatura ideal para indução da HSP70

Neste estudo foram feitos três experimentos, um para cada temperatura subletal. Em cada experimento, 10 caramujos foram expostos à temperatura subletal e outros 10 utilizados como controle. Os animais foram acompanhados durante 5 dias sob essas condições com o objetivo de determinar a temperatura que melhor induz a proteína HSP70 baseando-se na sobrevivência dos animais ao serem, posteriormente, expostos a uma temperatura letal. Temos então:

Experimento A1-1 (realizado em 16/04/10):

- 10 caramujos expostos a 33°C durante 5 dias;
- 10 caramujos expostos a aproximadamente 25°C (temperatura natural do ambiente) durante 5 dias – grupo controle.

Experimento A1-2 (realizado em 23/04/10)

- 10 caramujos expostos a 36°C durante 5 dias;
- 10 caramujos expostos a aproximadamente 25°C (temperatura natural do ambiente) durante 5 dias – grupo controle.

Experimento A1-3 (realizado em 04/05/10):

- 10 caramujos expostos a 30°C durante 5 dias;
- 10 caramujos expostos a aproximadamente 25°C (temperatura natural do ambiente) durante 5 dias – grupo controle.

Após os 5 dias de exposição, os animais sobreviventes dos três experimentos foram expostos a uma temperatura letal de 42°C (determinada em estudos anteriores) e, a cada hora, contou-se o número de animais sobreviventes, em cada experimento, até que todos tivessem morrido.

3.1.2. Estudo A2: Concentração de cádmio ideal para indução da HSP70

Para este estudo, foram feitos quatro experimentos com caramujos expostos a diferentes concentrações de cádmio (Cd) juntamente com um grupo controle, com o objetivo de determinar a concentração do metal que melhor induz a proteína HSP70, ou seja, a concentração limite que provoque stress no animal, mas não o mate. Temos então:

Experimento A2-1 (realizado em 23/03/11):

- 10 caramujos expostos a 0,5 ppm de cádmio durante 4 dias;
- 10 caramujos expostos a 0,3 ppm de cádmio durante 4 dias;
- 10 caramujos expostos a 0,2 ppm de cádmio durante 4 dias;
- 10 caramujos expostos a 0,1 ppm de cádmio durante 4 dias;
- 10 caramujos expostos a 0,09 ppm de cádmio durante 4 dias;
- 10 caramujos não expostos ao cádmio e observados durante 4 dias – grupo controle;

Após este primeiro experimento, realizou-se outro estudo para encontrar a concentração letal de cádmio e determinou-se o valor de 0,7 ppm. Essa concentração foi, então, adicionada aos próximos experimentos.

Experimento A2-2 (realizado em 11/04/11):

- 10 caramujos expostos a 0,7 ppm de cádmio durante 4 dias;
- 10 caramujos expostos a 0,5 ppm de cádmio durante 4 dias;

- 10 caramujos expostos a 0,3 ppm de cádmio durante 4 dias;
- 10 caramujos expostos a 0,2 ppm de cádmio durante 4 dias;
- 10 caramujos expostos a 0,1 ppm de cádmio durante 4 dias;
- 10 caramujos expostos a 0,09 ppm de cádmio durante 4 dias;
- 10 caramujos não expostos ao cádmio e observados durante 4 dias – grupo controle;

Experimentos A2-3 e A2-4 (realizados em 16/08/11):

Os experimentos A2-3 e A2-4 foram realizados simultaneamente, em diferentes laboratórios, da seguinte forma:

- 20 caramujos expostos a 0,7 ppm de cádmio durante 4 dias em cada laboratório;
- 10 caramujos expostos a 0,5 ppm de cádmio durante 4 dias em cada laboratório;
- 10 caramujos expostos a 0,3 ppm de cádmio durante 4 dias em cada laboratório;
- 10 caramujos expostos a 0,2 ppm de cádmio durante 4 dias em cada laboratório;
- 10 caramujos expostos a 0,1 ppm de cádmio durante 4 dias em cada laboratório;
- 10 caramujos expostos a 0,09 ppm de cádmio durante 4 dias em cada laboratório;
- 10 caramujos não expostos ao cádmio e observados durante 4 dias em cada laboratório – grupo controle;

A duplicidade deste experimento em diferentes laboratórios teve o intuito de eliminar possíveis influências externas.

3.2. Estudos de tolerância cruzada entre temperatura e cádmio (B)

Após a determinação da temperatura (33°C) e concentração de metal (0,2 ppm) ideais para a indução da proteína HSP70, realizou-se a segunda e última etapa do estudo, que foi dividida em duas partes.

3.2.1. Estudo B1: Resistência ao cádmio induzida pela temperatura

Nesta primeira parte foram realizados três experimentos utilizando caramujos pré-expostos a 33°C durante 5 dias e caramujos não expostos servindo como controle. Os animais foram mantidos em solução de cádmio (CdCl_2) a 0,7 ppm (concentração letal determinada em estudos anteriores) dissolvida em água filtrada declorada, em copos de vidro com capacidade para 180 ml, renovando-a após 48 horas de exposição (Figura A.2). Temos então:

Experimento B1-1 (realizado em 28/09/11):

- 10 caramujos pré-expostos 33°C colocados em uma solução de 0,7 ppm de cádmio;
- 10 caramujos não pré-expostos colocados em uma solução de 0,7 ppm de cádmio – grupo controle.

Experimento B1-2 (realizado em 18/10/11):

- 20 caramujos pré-expostos 33°C colocados em uma solução de 0,7 ppm de cádmio;
- 20 caramujos não pré-expostos colocados em uma solução de 0,7 ppm de cádmio – grupo controle.

Experimento B1-3 (realizado em 11/12/11):

- 20 caramujos pré-expostos 33°C colocados em uma solução de 0,7 ppm de cádmio;
- 20 caramujos não pré-expostos colocados em uma solução de 0,7 ppm de cádmio – grupo controle.

A mortalidade dos animais em cada experimento foi registrada diariamente até que todos tivessem morrido.

3.2.2. Estudo B2: Resistência à temperatura induzida pelo cádmio

Nesta segunda parte também foram feitos três experimentos, sendo que nesta, foram utilizados caramujos pré-expostos a uma concentração de 0,2 ppm de cádmio durante 4 dias juntamente com outros animais não pré-expostos que serviram como grupo controle. Estes foram, então, submetidos a uma temperatura de 42°C em banho-maria. Temos então:

Experimento B2-1 (realizado em 03/02/12):

- 10 caramujos pré-expostos a 0,2 ppm de cádmio submetidos a 42°C;
- 10 caramujos não pré-expostos ao cádmio submetidos a 42°C – grupo controle.

Experimento B2-2 (realizado em 02/03/12):

- 15 caramujos pré-expostos a 0,2 ppm de cádmio submetidos a 42°C;
- 15 caramujos não pré-expostos ao cádmio submetidos a 42°C – grupo controle.

Experimento B2-3 (realizado em 12/03/12):

- 10 caramujos pré-expostos a 0,2 ppm de cádmio submetidos a 42°C;

- 10 caramujos não pré-expostos ao cádmio submetidos a 42°C – grupo controle.

A mortalidade dos animais em cada experimento foi registrada a cada hora até que todos tivessem morrido.

4. Descrição das variáveis

O estudo envolve apenas três variáveis:

- Tempo até a morte: variável resposta de todos os experimentos, medida em horas.
- Temperatura: variável medida em graus Celsius, utilizada nos estudos A1, B1 e B2.
- Cádmio: variável medida em PPM (partes por milhão), utilizada nos estudos A2, B1 e B2.

5. Análise descritiva

5.1. Estudo A1

Como os experimentos foram feitos em dias diferentes, o primeiro passo é analisar, com o auxílio de gráficos e tabelas, se os controles são semelhantes, ou seja, se existe a possibilidade de uni-los para, então, comparar as temperaturas.

Observando a Tabela A.1 conclui-se, a priori, que parece não haver diferença entre os animais controles. Na Tabela A.2 nota-se que os controles 1 e 3 têm médias aparentemente diferentes, o que pode ser confirmado pelo gráfico de comparação entre as médias (Gráfico A.2). Para maiores detalhes sobre estatísticas descritivas ver, por exemplo, Bussab e Morettin, (2011).

Para uma melhor visualização, utilizou-se o gráfico de Kaplan-Meier (Colosimo e Giolo, 2006).

Pode-se observar que, no gráfico para os grupos controles (Gráfico A.1), as curvas são próximas e distribuem-se de forma parecida. Segundo confirmação da pesquisadora, alguma diferença pode ser explicada por variabilidade natural dos animais.

Com essa confirmação, construiu-se o Kaplan-Meier considerando os grupos controles como um único grupo. Neste gráfico (Gráfico A.3), a princípio, há indícios de que a temperatura de 33°C, escolhida pela pesquisadora, foi adequada, pois parece que esta induz a uma sobrevivência maior quando o indivíduo é exposto a uma temperatura letal, em comparação com as demais temperaturas analisadas (30°C e 36°C).

5.2. Estudo A2

Este estudo também foi realizado em dias diferentes, mas, o número amostral de ocorrência do evento em cada concentração em cada dia é pequeno, pois os dados sofreram censura à direita em 96 horas. Por isso, não há um número suficiente de animais para verificar se as mesmas concentrações, em diferentes dias, são semelhantes. Isso é confirmado pela Tabela A.4 em que não é possível obter as medianas e os desvios padrões de alguns experimentos.

Observando-se a distribuição do tempo para cada concentração (Tabela A.3), conclui-se que parece haver semelhança na sobrevivência dos grupos dos diferentes dias, ou seja, os dias podem ser unidos em uma única análise desprezando-se o fator dia. Essa decisão foi confirmada pela pesquisadora que afirmou que não há fatores externos relevantes.

Então, para a análise descritiva, utilizou-se um gráfico de Kaplan-Meier (Gráfico A.4) para comparar as curvas das diversas concentrações. Esses gráficos parecem indicar que as curvas são diferentes.

Pela análise, verifica-se também que há indícios de que a concentração de cádmio de 0,2 ppm, utilizada pela pesquisadora, foi adequada, pois pela Tabela A.3 verifica-se que a concentração de 0,2 ppm é a maior concentração que não causa um

número grande de mortos (note que há um salto de 6 para 21 mortos quando se muda a concentração de 0,2 ppm para 0,3 ppm).

5.3. Estudo B1

Neste experimento, o objetivo é comparar o tempo de sobrevivência do grupo controle com o tempo de sobrevivência dos indivíduos pré-expostos. Para uma melhor comparação, analisa-se, primeiramente, a possibilidade de unir os dados que foram extraídos em dias diferentes.

Na Tabela A.5, observa-se que parece não haver grandes diferenças na sobrevivência dos controles para os três dias, ou seja, não parece haver interferência de um fator externo relacionado ao dia em que o experimento foi realizado. A análise é análoga para os pré-expostos. Confirmam-se estas suspeitas nos gráficos das médias (Gráfico A.6 e Gráfico A.8), pois há interseção entre os intervalos, no gráfico de Kaplan-Meier (Gráfico A.5 e Gráfico A.7), pela proximidade das curvas. Pela Tabela A.6 percebe-se que as médias dos dias são próximas tanto para indivíduos controles quanto para os pré-expostos, o que reafirma essa suspeita.

Com a junção dos dados desconsiderando a data, faz-se um gráfico de Kaplan-Meier (Gráfico A.9). Neste, fica evidente a diferença entre as curvas dos animais controles e dos pré-expostos, pois pela análise do gráfico, percebe-se que a curva que contém uma sobrevida maior é a curva dos pré-expostos, como esperado.

5.4. Estudo B2

Analisando a Tabela A.7, percebe-se que o experimento realizado no dia 02/03/2012 tem uma distribuição diferente dos outros, apresentando um tempo de sobrevida maior, tanto para os indivíduos controles quanto para os indivíduos pré-expostos, em relação às outras datas. Isso também pode ser observado na Tabela A.8, pois a média do segundo dia fica maior para os controles e para os pré-expostos.

Para confirmar essa suspeita foi elaborado um gráfico de intervalo entre as médias para os controles (Gráfico A.11) e para os indivíduos pré-expostos (Gráfico A.13) e, percebe-se que o intervalo para a segunda data fica bem acima dos demais nos dois gráficos. Este resultado também é obtido nos gráficos de Kaplan-Meier para os controles (Gráfico A.10) e para os pré-expostos (Gráfico A.12), em que as curvas do dia 02/03 ficam acima das outras curvas. Com isso, conclui-se que, aparentemente, existiu algum fator de interferência no estudo nesse dia e, por este motivo, não é possível juntá-lo com os demais.

Então, uma alternativa para a elaboração de uma análise entre os animais controles e os pré-expostos, é comparar os dias que parecem ser iguais e analisar, posteriormente, o dia em que parece haver interferência e verificar se os resultados proporcionais se confirmam.

No gráfico de Kaplan-Meier dos dias 03/02/2012 e 12/03/2012 juntos (Gráfico A.14), percebe-se que a curva dos expostos está acima, indicando maior sobrevivência desse grupo.

Esta análise repete-se para o segundo dia, pois pelo gráfico de Kaplan-Meier do dia 02/03/2012, observa-se também que a curva dos indivíduos pré-expostos fica acima da curva dos controles (Gráfico A.15).

6. Análise inferencial

6.1. Estratégia de análise

6.1.1. Estudo A1

A análise inferencial deste estudo foi feita com base nos modelos de Análise de Sobrevivência (Colosimo e Giolo, 2006) e, através destes, tentou-se observar qual das temperaturas de pré-exposição aumenta significativamente o tempo de sobrevivência do caramujo quando este é exposto a uma temperatura letal.

Para isso analisou-se, utilizando três métodos gráficos diferentes, qual modelo de sobrevivência é o mais adequado. A comparação foi efetuada entre os modelos

paramétricos Exponencial, Weibull e Lognormal.

Considerando os dados do estudo A1, pelo primeiro método gráfico (Gráfico A.16) não se pode chegar a nenhuma conclusão, pois nenhum modelo apresenta os pontos ajustados à reta diagonal.

Pelo segundo método gráfico (Gráfico A.17), percebe-se que o modelo Exponencial é o mais adequado, pois observa-se que os pontos no gráfico estão próximos a uma reta diagonal, o que implica que o modelo se ajusta bem aos dados.

Pelo terceiro método gráfico (Gráfico A.18), escolheu-se, também, o modelo Exponencial, confirmando o que foi visto no Gráfico A.17, pois a linha pontilhada, que é a linha do modelo, é a que mais se aproxima da curva de Kaplan-Meier dos dados estudados.

Estes gráficos, além de mostrarem qual modelo se adequa melhor, também mostram que o modelo está bem ajustado. Portanto, o modelo escolhido neste experimento foi o Exponencial.

6.1.2. Estudo A2

A análise inferencial deste estudo foi, também, feita com base nos modelos de Análise de Sobrevivência e, através destes, tentou-se observar qual das concentrações de cádmio aumenta o tempo de sobrevivência do caramujo.

Novamente, foram utilizados três métodos gráficos diferentes para realizar a análise comparando-se os três modelos (Exponencial, Weibull e Lognormal) com o intuito de verificar qual deles é o mais adequado.

Observando-se os gráficos do primeiro método (Gráfico A.19) verifica-se que nenhum modelo apresenta os pontos bem ajustados à reta diagonal e, portanto, não é possível concluir qual dos modelos melhor se ajusta aos dados.

O segundo método gráfico (Gráfico A.20) confirma que o modelo Exponencial é o mais adequado, pois o gráfico apresenta os pontos próximos a uma reta diagonal, o que implica que o modelo se ajusta bem aos dados.

Pelo terceiro método gráfico (Gráfico A.21), não se pode concluir nada sobre os modelos.

Neste pré-experimento há uma maior dificuldade em se analisar qual modelo se ajusta melhor, pois os dados são censurados fazendo com que tenhamos poucos animais para os quais o evento ocorre e, portanto, poucos dados para analisar.

Estes gráficos, além de mostrarem qual modelo se adequa melhor, também mostram que o modelo está bem ajustado. Portanto, neste experimento, foi escolhido o modelo Exponencial.

6.1.3. Estudo B1

Com base nos modelos de Análise de Sobrevida, realizou-se a análise inferencial deste estudo com o intuito de verificar se a temperatura de pré-exposição escolhida aumenta o tempo de sobrevida do caramujo quando este é exposto a uma concentração letal de cádmio.

Como feito anteriormente, efetuou-se a análise com base nos três métodos gráficos diferentes para verificar qual dos modelos (Exponencial, Weibull e Lognormal) é o mais adequado.

O primeiro método gráfico (Gráfico A.22) não permite nenhuma conclusão, pois nenhum dos gráficos apresenta os pontos ajustados à reta diagonal.

O segundo método gráfico (Gráfico A.23), mostra que o modelo Exponencial é o mais adequado, pois este possui o gráfico que apresenta os pontos que mais se aproximam à reta diagonal, o que implica que o modelo se ajusta bem.

O terceiro método gráfico (Gráfico A.24) confirma que o modelo mais adequado é o Exponencial, pois seu gráfico apresenta a linha pontilhada (curva do modelo) que mais se aproxima da curva de Kaplan-Meier dos dados estudados.

Estes gráficos, além de mostrarem qual modelo se adequa melhor, também mostram que o modelo está bem ajustado. Portanto, neste experimento, também foi escolhido o modelo Exponencial.

6.1.4. Estudo B2

Para análise inferencial deste estudo, também utilizou-se modelos de Análise de Sobrevida com o objetivo de verificar se a concentração de cádmio de pré-

exposição escolhida aumenta o tempo de sobrevivência do caramujo quando este é exposto a uma temperatura letal.

A comparação entre os três modelos (Exponencial, Weibull e Lognormal) foi feita, novamente, com base em três diferentes métodos gráficos com o intuito de determinar o modelo mais adequado aos dados.

O primeiro método gráfico (Gráfico A.25) mostra que nenhum modelo apresenta os pontos próximos a uma reta diagonal no gráfico, portanto, este método não permite nenhuma conclusão neste caso.

Pelo segundo método gráfico (Gráfico A.26), percebe-se que o modelo Weibull é o mais adequado, pois este apresenta o gráfico que contém os pontos que mais se aproximam a uma reta diagonal, o que implica que o modelo se ajusta bem aos dados.

Pelo terceiro método gráfico (Gráfico A.27), escolheu-se, também, o modelo Weibull, confirmando o que foi visto no Gráfico A.26, pois apresenta a linha pontilhada (curva do modelo) que mais se aproxima da curva de Kaplan-Meier dos dados estudados.

Estes gráficos, além de mostrarem qual modelo se adequa melhor, também mostram que o modelo está bem ajustado. Portanto, o modelo escolhido neste experimento foi o de Weibull.

6.2. Ajuste do modelo

6.2.1. Estudo A1

Para este pré-experimento ajustou-se o modelo Exponencial com os seguintes parâmetros:

Tabela 1: Estimativas dos parâmetros do modelo Exponencial para estudo A.1

	Estimativa	Erro padrão	z	valor p
Controle (Intercepto)	1,194	0,183	6,54	< 0,001
30°C	0,332	0,365	0,91	0,363
33°C	0,780	0,365	2,14	0,033
36°C	0,647	0,365	1,77	0,077

Como observado na Tabela 1, apenas para o intercepto e para o parâmetro da temperatura 33°C, há evidências para se rejeitar a hipótese de que os parâmetros são nulos, ou seja, apenas esses dois parâmetros são significantes a um nível de significância de 5%.

O coeficiente 1,194 é a estimativa referente ao intercepto (controle) e o coeficiente 0,780 é a estimativa referente aos indivíduos pré-expostos, ou seja, este só será adicionado ao modelo quando o indivíduo for pré-exposto.

Com isso, o modelo final ajustado é:

$$\hat{S}(t|x_1) = \exp\left\{-\left(\frac{t}{\exp\{1,194 + 0,780x_1\}}\right)\right\}, t \geq 0$$

$$\text{em que } x_1 = \begin{cases} 1, & \text{se temperatura for } 33^\circ\text{C} \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases}$$

e $\hat{S}(t|x_1)$ é a função de sobrevivência.

Portanto, observa-se que quando a temperatura de pré-exposição for 33°C, a probabilidade de sobrevida aumenta em relação ao controle.

6.2.2. Estudo A2

Para este pré-experimento ajustou-se o modelo Exponencial com os seguintes parâmetros:

Tabela 2: Estimativas dos parâmetros do modelo Exponencial para estudo A.2

	Estimativa	Erro padrão	z	valor p
Controle (Intercepto)	4,369	0,707	6,179	< 0,001
0,09 ppm	-1,514	0,791	-1,916	0,055
0,1 ppm	-0,738	0,866	-0,853	0,394
0,2 ppm	-1,151	0,816	-1,409	0,159
0,3 ppm	-2,578	0,740	-3,483	< 0,001
0,5 ppm	-3,203	0,728	-4,398	< 0,001
0,7 ppm	-3,686	0,721	-5,112	< 0,001

Neste segundo pré-experimento observa-se, pela Tabela 2, que todos os parâmetros iguais ou abaixo da concentração de 0,2 ppm são não significantes, ou seja, a concentração de cádmio igual a 0,2 ppm é a maior concentração considerada que não é estatisticamente diferente do controle a um nível de significância de 5%.

6.2.3. Estudo B1

Para o primeiro experimento ajustou-se o modelo Exponencial com os seguintes parâmetros:

Tabela 3: Estimativas dos parâmetros do modelo Exponencial para estudo B.1

	Estimativa	Erro padrão	z	valor p
Controle (Intercepto)	0,752	0,162	4,64	< 0,001
Expostos	0,523	0,200	2,61	0,009
Dia	-0,026	0,204	-0,13	0,900

Observando-se o valor p da Tabela 3, conclui-se que não há evidências para se rejeitar a hipótese de que os parâmetro de efeito de dia seja nulo, ou seja, não há evidências para se considerar o efeito de dias diferentes.

Entretanto, há evidências para se rejeitar hipótese de que o efeito do intercepto e efeito de pré-exposição da temperatura 33°C sejam nulos, ou seja, estes são significantes para o modelo ao nível de significância de 5%.

O coeficiente 0,752 é a estimativa referente ao intercepto (controle) e o coeficiente 0,523 é a estimativa referente aos indivíduos pré-expostos, ou seja, este só será adicionado ao modelo quando o indivíduo for pré-exposto.

Com isso, o modelo final é:

$$\hat{S}(t|x_1) = \exp\left\{-\left(\frac{t}{\exp\{0,752 + 0,523 x_1\}}\right)\right\}, t \geq 0$$

$$\text{em que } x_1 = \begin{cases} 1, & \text{se o indivíduo for pré - exposto} \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases}$$

e $\hat{S}(t|x_1)$ é a função de sobrevivência.

Portanto, observa-se que quando o caramujo é pré-exposto a uma temperatura de 33°C, a probabilidade de sobrevida aumenta quando ele é posteriormente colocado em uma concentração letal de 0,7 ppm de cádmio.

6.2.4. Estudo B2

Para o segundo experimento ajustou-se o modelo Weibull com os seguintes parâmetros:

Tabela 4: Estimativas dos parâmetros do modelo Weibull para estudo B.2

	Estimativa	Erro padrão	z	valor p
Controle (Intercepto)	0,997	0,0700	14,24	< 0,001
Expostos	0,242	0,0963	2,51	0,012
Log (escala)	-0,909	0,0975	-9,33	< 0,001

Como observado, para o intercepto e para o parâmetro do pré-expostos, há evidências para se rejeitar a hipótese que os parâmetros sejam nulos, ou seja, esses dois parâmetros são significativos a um nível de significância de 5%.

O coeficiente 0,997 é a estimativa referente ao intercepto (controle), o coeficiente 0,242 é a estimativa referente aos indivíduos pré-expostos, ou seja, este só será adicionado ao modelo quando o indivíduo for pré-exposto e o coeficiente 0,403 é referente à escala.

Com isso, o modelo final é:

$$\hat{S}(t|x_1) = \exp \left\{ - \left(\frac{t}{\exp\{0,997 + 0,242 x_1\}} \right)^{\frac{1}{0,403}} \right\}, t \geq 0$$

$$\text{em que } x_1 = \begin{cases} 1, & \text{se o indivíduo for pré - exposto} \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases}$$

e $\hat{S}(t|x_1)$ é a função de sobrevivência.

Portanto, observa-se que quando o caramujo é pré-exposto a uma concentração de 0,2 ppm de cádmio, a probabilidade de sobrevivência aumenta quando ele é posteriormente colocado a uma temperatura letal de 42°C.

6.3. Curva dose-resposta

Para o segundo pré-experimento (Estudo A2) construiu-se a curva dose-resposta para analisar qual é a dose em que 50% dos caramujos morrem.

Para isso analisou-se, ao final de 96 horas, qual era o número de caramujos mortos em cada concentração de cádmio e, com o gráfico probit (Gráfico A.28) gerado pelo software MINITAB®, observou-se que a concentração de 0,269 ppm é a dose adequada. Para maiores detalhes sobre gráficos probit ver, por exemplo, Finney, D.J. (1947).

7. Conclusões

No estudo A1, concluiu-se que existe uma diferença significativa entre os controles, porém, essa diferença foi descartada, pois considerou-se que isso se deve a uma variabilidade comum existente nos caramujos, ou seja, essa diferença não está relacionada ao fato de o experimento ter sido realizado em dias diferentes. Com a análise conjunta, concluiu-se que há evidências de que a escolha de 33°C como temperatura subletal foi correta, ou seja, ela é a que melhor induz a proteína HSP70 que protege o caramujo em comparação com as demais temperaturas selecionadas.

No estudo A2, verifica-se que, apesar de poucos dados e estes estarem censurados, há evidências de que a escolha da dose de 0,2 ppm, feita pela pesquisadora, foi acertada, pois ela agride o animal fazendo com que a proteína HSP70 aumente e proteja o caramujo, de forma que não o mate.

Com relação à temperatura subletal definida, pode-se concluir que, no estudo B1, as curvas dos grupos expostos são mais altas em relação à dos controles e que,

portanto, parece existir uma proteção maior nos caramujos que ficaram expostos à temperatura de 33°C.

No estudo B2, considerando as comparações em que apenas os dias similares foram unidos, conclui-se que há evidências de uma maior sobrevivência nos indivíduos que foram pré-expostos ao cádmio.

APÊNDICE A

Tabelas, gráficos e figuras



Figura A.1: Aquários de criação dos caramujos (Imagem fornecida pela pesquisadora).



Figura A.2: Animais mantidos em solução de cádmio (Imagem fornecida pela pesquisadora).

Tabela A.1: Número de animais mortos do Estudo A1.

Tempo de exposição (em horas)	04/05/2010		16/04/2010		23/04/2010	
	Animais controle	Animais pré-expostos a 30°C/5d	Animais controle	Animais pré-expostos a 33°C/5d	Animais controle	Animais pré-expostos a 36°C/5d
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1	0	4	0
3	3	1	5	0	4	0
4	6	4	4	2	2	0
5	1	3	-	1	-	3
6	-	2		1		2
7		-		1		4
8				1		1
9				2		-
10				2		
Total	10	10	10	10	10	10

Tabela A.2: Medidas descritivas do tempo de sobrevivência dos animais do Estudo A1.

	04/05/2010		16/04/2010		23/04/2010	
	Animais controle	Animais pré-expostos a 30°C/5d	Animais controle	Animais pré-expostos a 33°C/5d	Animais controle	Animais pré-expostos a 36°C/5d
Média	3,80	4,60	3,30	7,20	2,80	6,30
Mediana	4,00	4,50	3,00	7,50	3,00	6,50
Mínimo	3,00	3,00	2,00	4,00	2,00	5,00
Máximo	5,00	6,00	4,00	10,00	4,00	8,00
Desvio Padrão	0,20	0,30	0,21	0,74	0,25	0,33

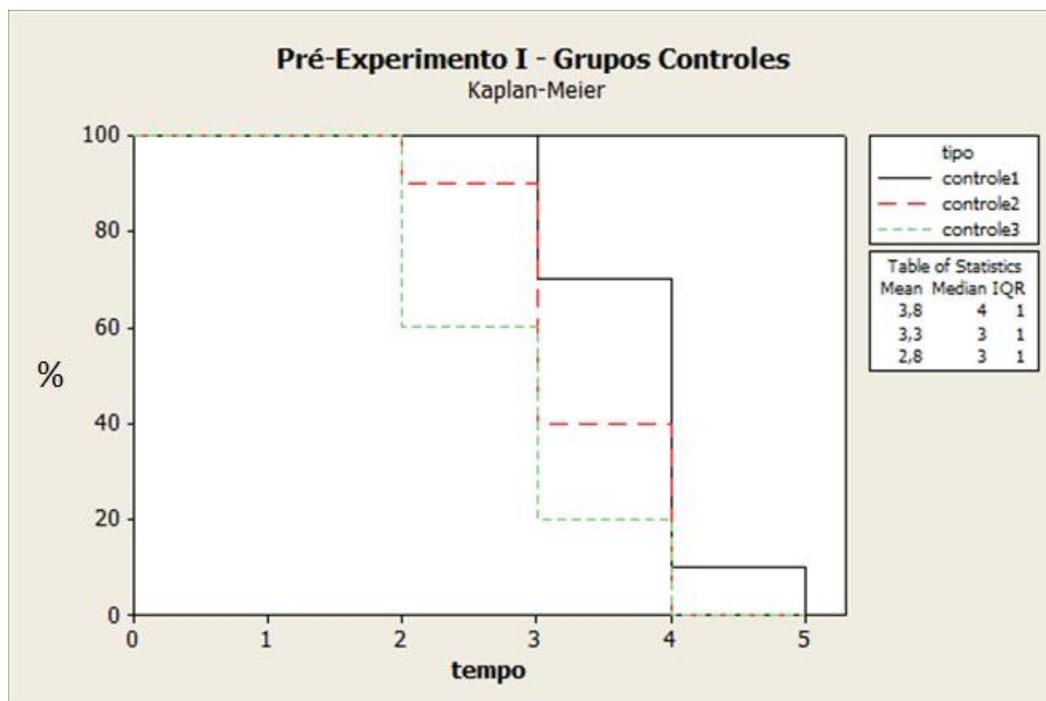


Gráfico A.1: Kaplan-Meier para os experimentos controles do Estudo A1.

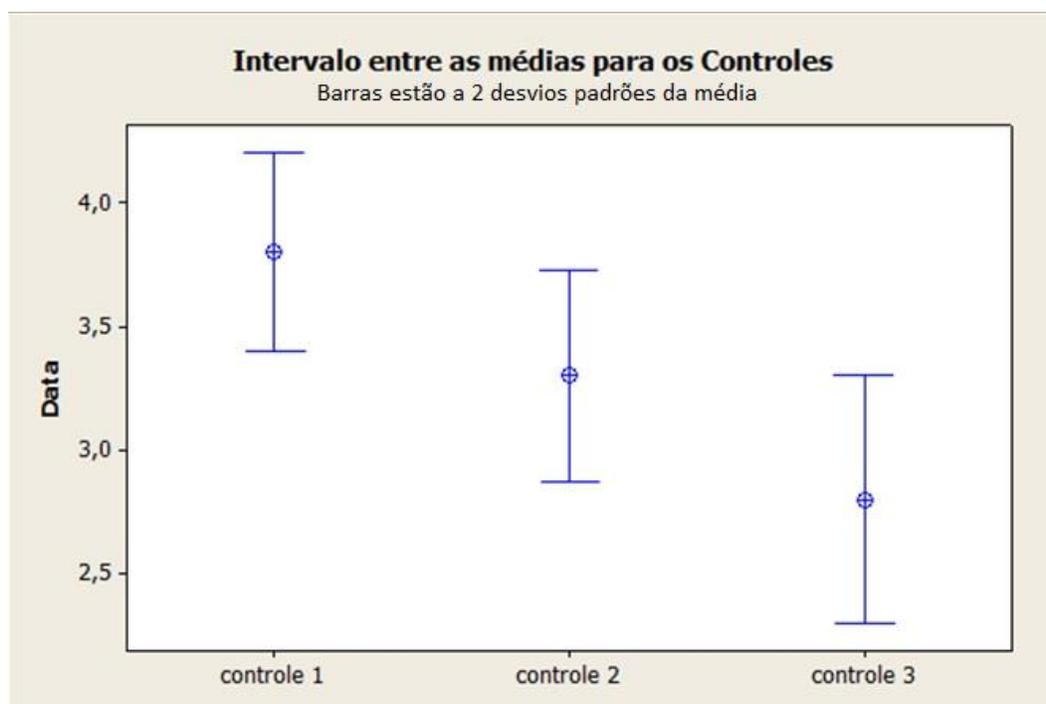


Gráfico A.2: Intervalo entre as médias para os experimentos controles do Estudo A1.

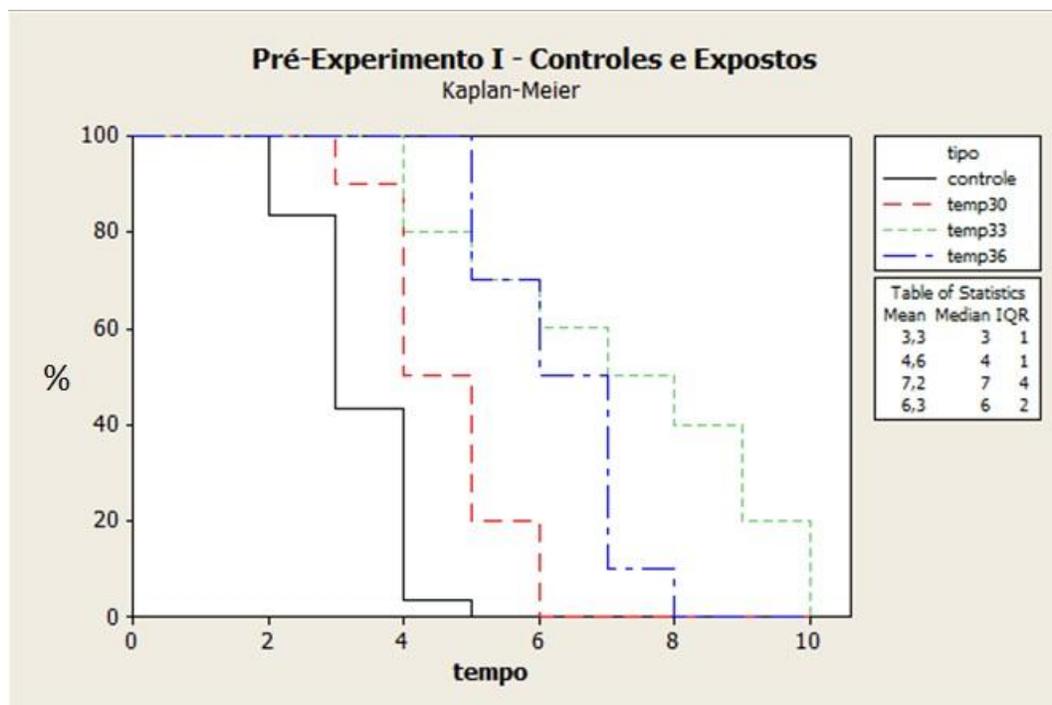


Gráfico A.3: Kaplan-Meier para todos os experimentos do Estudo A1.

Tabela A.3: Número de animais mortos do Estudo A2.

Data	Tempo de exposição (dia)	0,7	0,5	0,3	0,2	0,1	0,09	Controle
23/03/2011	1	*	0	0	0	0	0	0
	2	*	3	0	0	0	0	0
	3	*	1	3	0	1	0	0
	4	*	5	1	0	0	0	0
11/04/2011	1	3	1	1	2	0	2	0
	2	5	3	1	0	0	0	0
	3	1	1	1	1	0	0	0
	4	1	1	0	0	0	0	0
16/08/2011 (sala1)	1	7	2	0	0	0	0	0
	2	11	3	6	0	0	0	0
	3	2	2	1	1	0	0	0
	4	0	2	2	0	0	1	0
16/08/2011 (sala 2)	1	4	5	2	0	2	5	0
	2	11	4	3	0	1	0	1
	3	2	0	0	2	0	0	0
	4	3	0	0	0	0	0	1
Total		50	33	21	6	4	8	2
Proporcional	%	100	82	52	15	10	20	5

Tabela A.4: Medidas descritivas do tempo de sobrevivência dos animais do Estudo A2.

Data		0,7	0,5	0,3	0,2	0,1	0,09	Controle
23/03/2011	Média	*	3,30	3,70	-	3,00	-	-
	Mediana	*	4,00	-	-	-	-	-
	Mínimo	*	2,00	3,00	-	3,00	-	-
	Máximo	*	>4,00 (1)	>4,00 (6)	-	>4,00 (9)	-	-
	Desvio Padrão	*	0,30	0,17	-	-	-	-
11/04/2011	Média	2,00	3,00	1,80	2,60	-	1,00	-
	Mediana	2,00	3,00	-	-	-	-	-
	Mínimo	1,00	1,00	1,00	1,00	-	1,00	-
	Máximo	4,00	>4,00 (4)	>4,00 (7)	>4,00 (7)	-	>4,00 (8)	-
	Desvio Padrão	0,29	0,38	0,15	0,31	-	0,00	-
16/08/2011 (sala1)	Média	1,75	2,60	2,70	3,00	-	4,00	-
	Mediana	2,00	2,00	2,00	-	-	-	-
	Mínimo	1,00	1,00	2,00	3,00	-	4,00	-
	Máximo	3,00	>4,00 (1)	>4,00 (1)	>4,00 (9)	-	>4,00 (9)	-
	Desvio Padrão	0,14	0,37	0,30	-	-	-	-
16/08/2011 (sala 2)	Média	2,20	1,50	1,80	3,00	1,80	1,00	3,80
	Mediana	2,00	1,00	2,00	-	-	1,00	-
	Mínimo	1,00	1,00	1,00	3,00	1,00	1,00	2,00
	Máximo	4,00	>4,00 (1)	>4,00 (5)	>4,00 (8)	<4,00 (7)	>4,00 (5)	>4,00 (8)
	Desvio Padrão	0,21	0,17	0,14	-	0,15	-	0,26

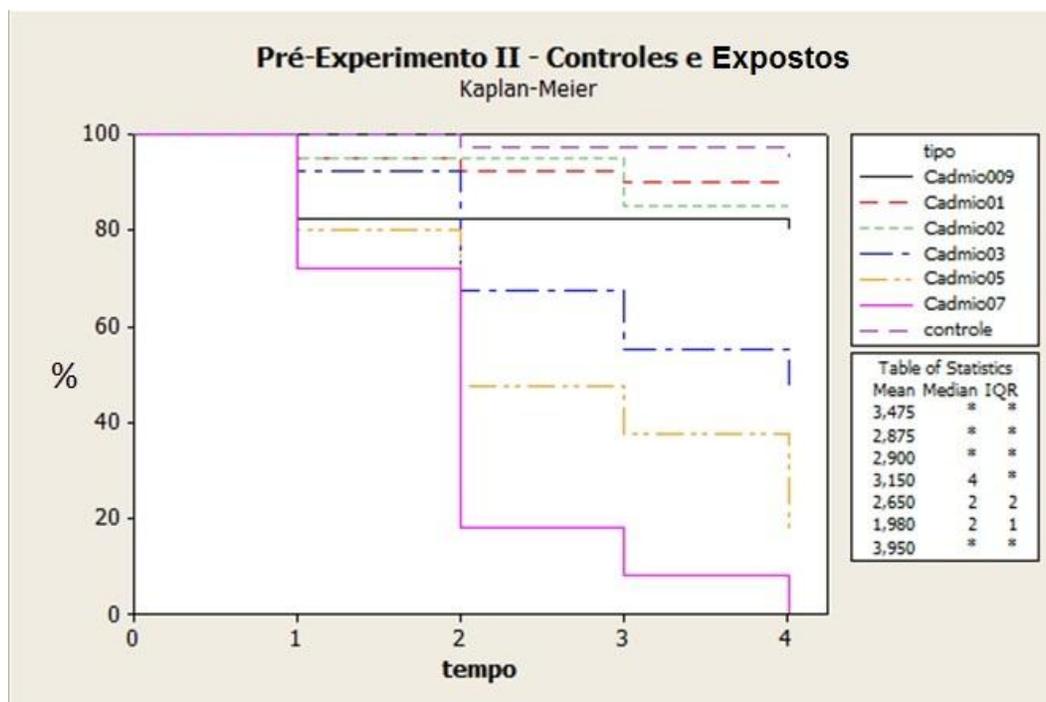
**Gráfico A.4:** Kaplan-Meier para todos os experimentos do Estudo A2.

Tabela A.5: Número de animais mortos do Estudo B1.

.Tempo de Exposição (em dias)	28/09/2011		18/10/2011		11/12/2011	
	Controle	33° C	Controle	33° C	Controle	33° C
1	0	0	3	0	4	0
2	8	2	17	3	7	4
3	1	1	-	9	9	8
4	1	3		9	-	6
5	-	4		0		2
6		-		0		-
7				1		
8				1		
Total	10	10	20	20	20	20

Tabela A.6: Medidas descritivas do tempo de sobrevivência dos animais do Estudo B1.

Tempo de Exposição (em dias)	28/09/2011		18/10/2011		11/12/2011	
	Controle	33° C	Controle	33° C	Controle	33° C
Média	2,30	3,90	1,85	3,60	2,25	3,30
Mediana	2,00	4,00	2,00	3,00	2,00	3,00
Mínimo	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
Máximo	4,00	5,00	2,00	8,00	3,00	5,00
Desvio Padrão	0,21	0,38	0,08	0,34	0,18	0,21

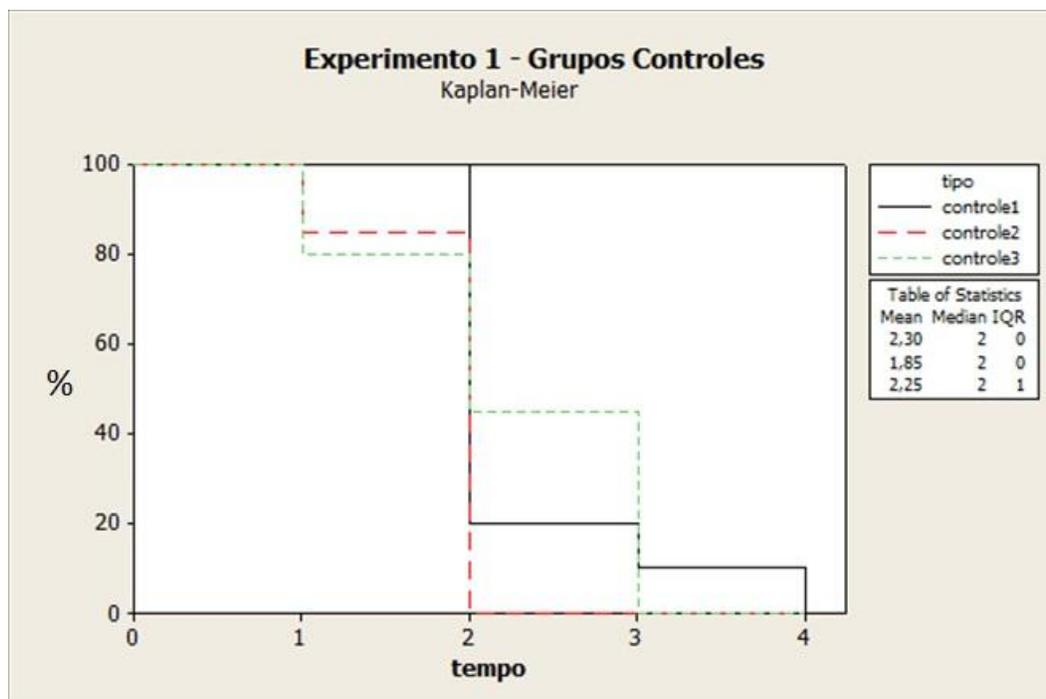


Gráfico A.5: Kaplan-Meier para os experimentos controles do Estudo B1.

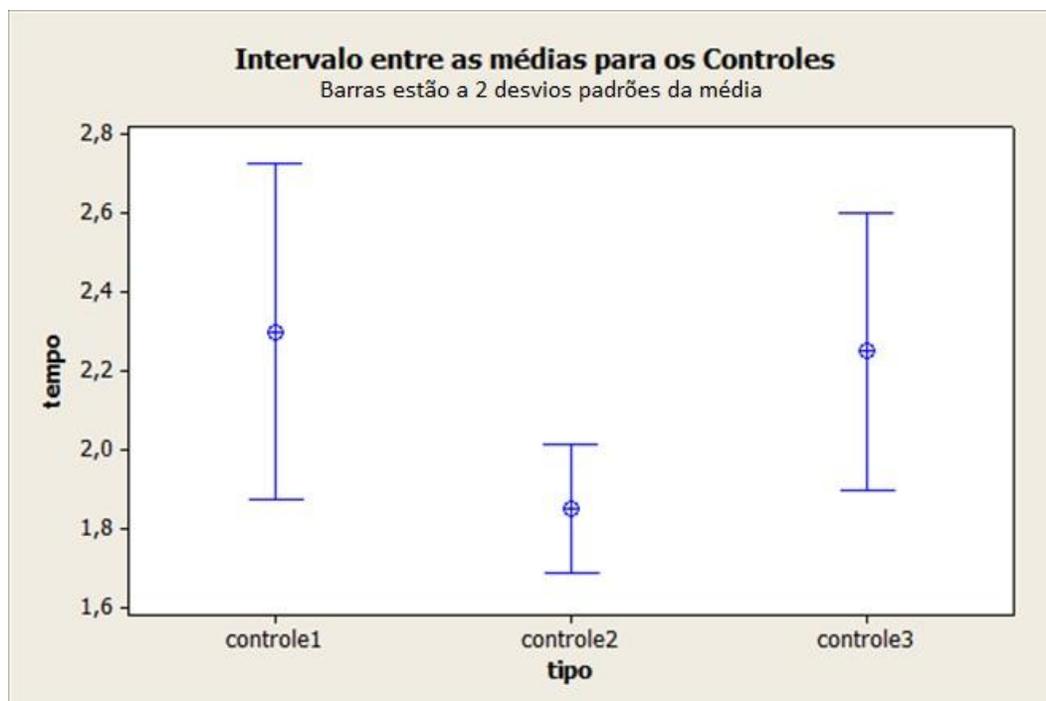


Gráfico A.6: Comparação entre as médias para os experimentos controles do Estudo B1.

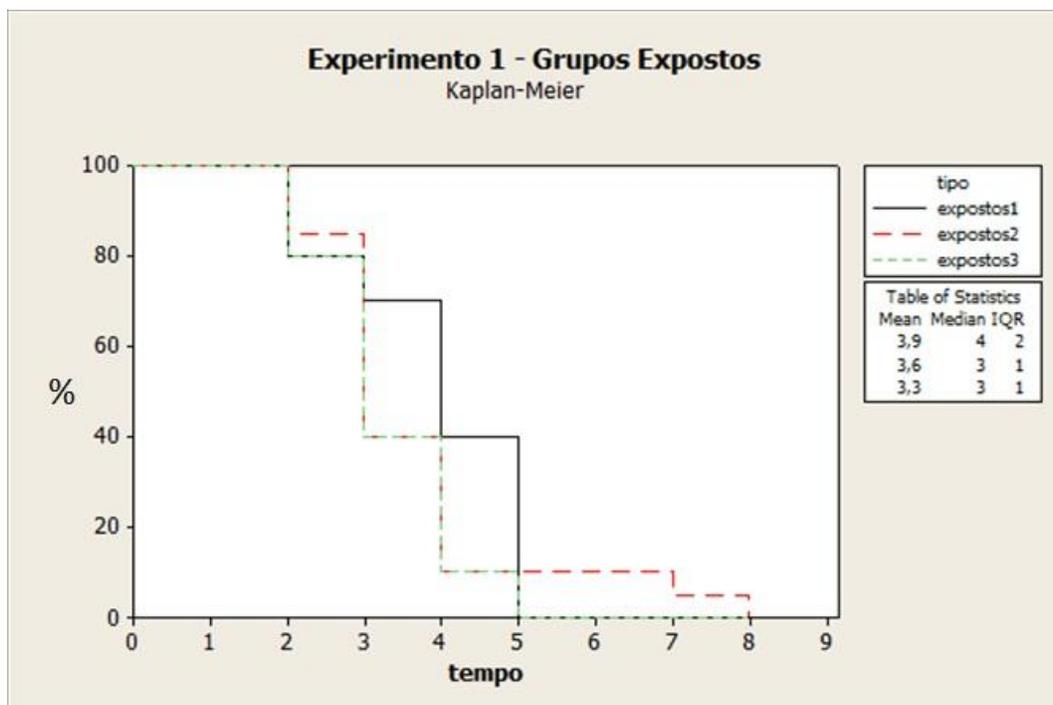


Gráfico A.7: Kaplan-Meier para os experimentos expostos do Estudo B1.

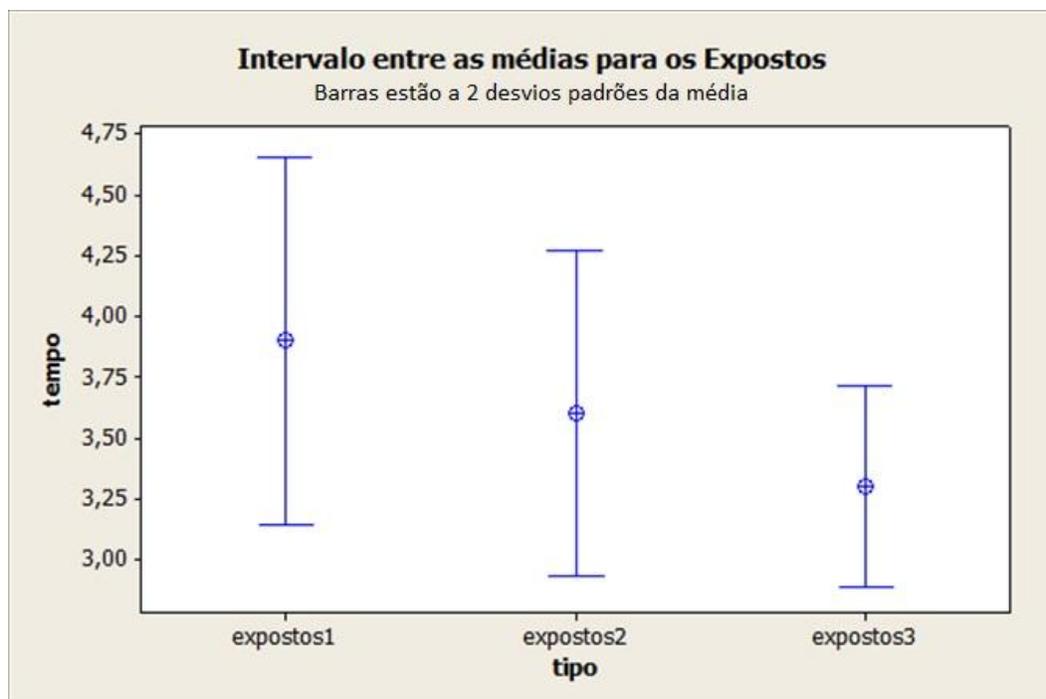


Gráfico A.8: Comparação entre as médias para os experimentos expostos do Estudo B1

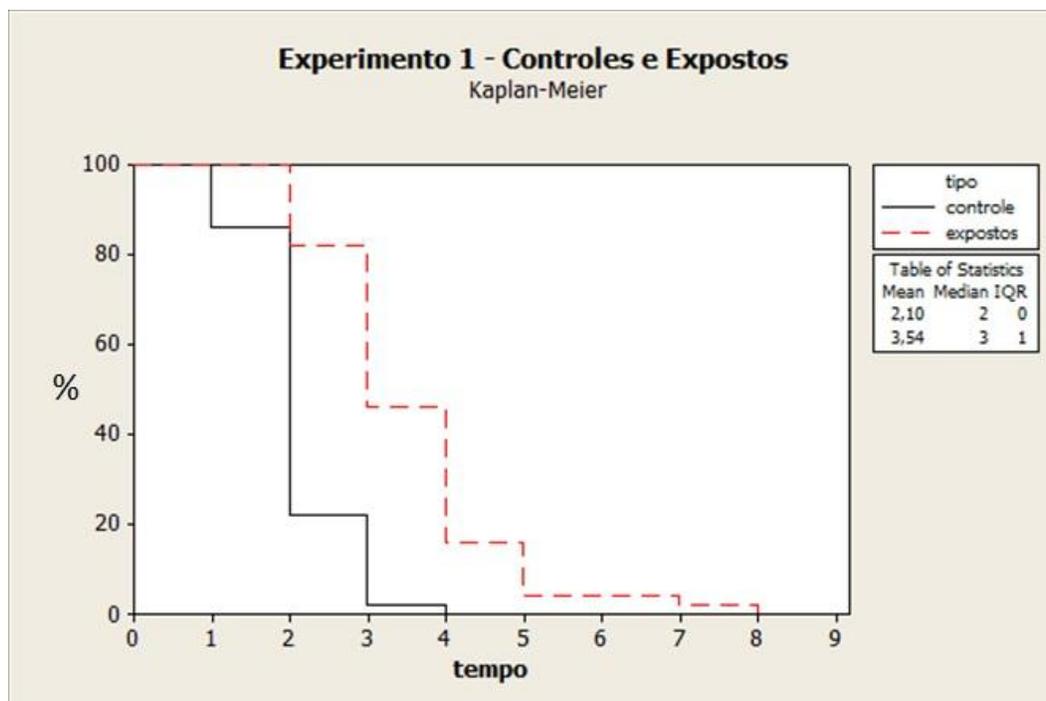


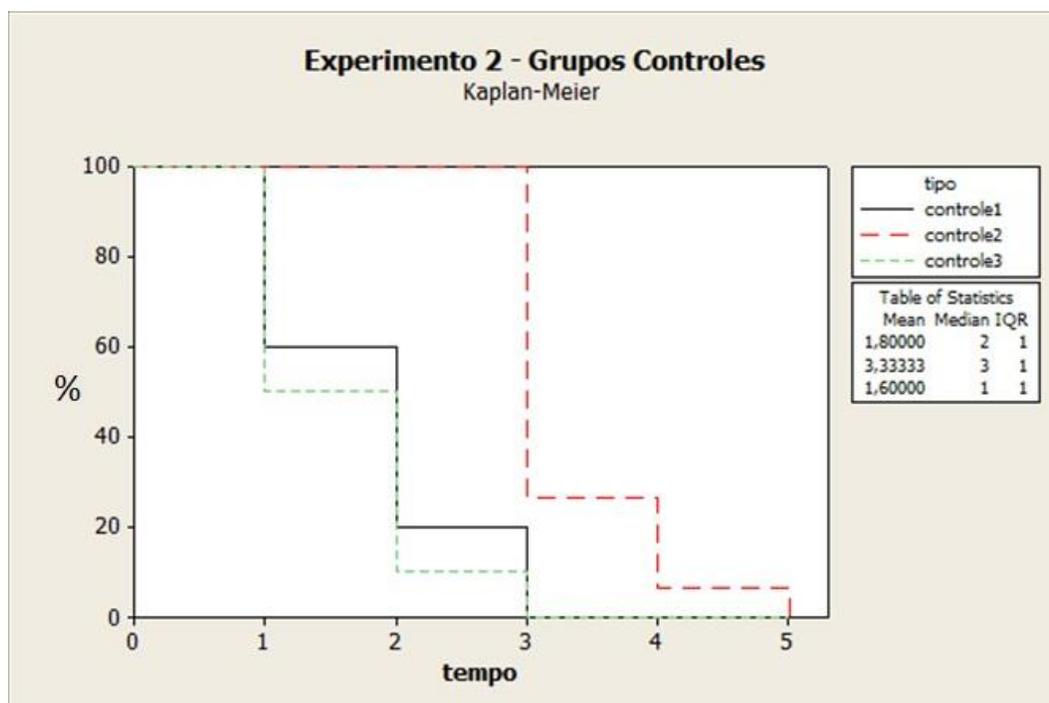
Gráfico A.9: Kaplan-Meier para todos os experimentos do Estudo B1

Tabela A.7: Número de animais mortos do Estudo B2.

Tempo de Exposição (em horas)	03/02/2012		02/03/2012		12/03/2012	
	Controle	0,2 ppm	Controle	0,2 ppm	Controle	0,2 ppm
1	4	0	0	0	5	7
2	4	4	0	0	4	1
3	2	5	11	0	1	1
4	-	1	3	12	-	1
5		-	1	2		-
6			-	1		
Total	10	10	15	15	10	10

Tabela A.8: Medidas descritivas do tempo de sobrevivência dos animais do Estudo B2.

Tempo de Exposição (em horas)	03/02/2012		02/03/2012		12/03/2012	
	Controle	0,2 ppm	Controle	0,2 ppm	Controle	0,2 ppm
Média	1,80	2,70	3,33	4,27	1,60	1,60
Mediana	2,00	3,00	3,00	4,00	1,00	1,00
Mínimo	1,00	2,00	3,00	4,00	1,00	1,00
Máximo	3,00	4,00	5,00	6,00	3,00	4,00
Desvio Padrão	0,25	0,21	0,16	0,15	0,22	0,34

**Gráfico A.10:** Kaplan-Meier para os experimentos controles do Estudo B2.

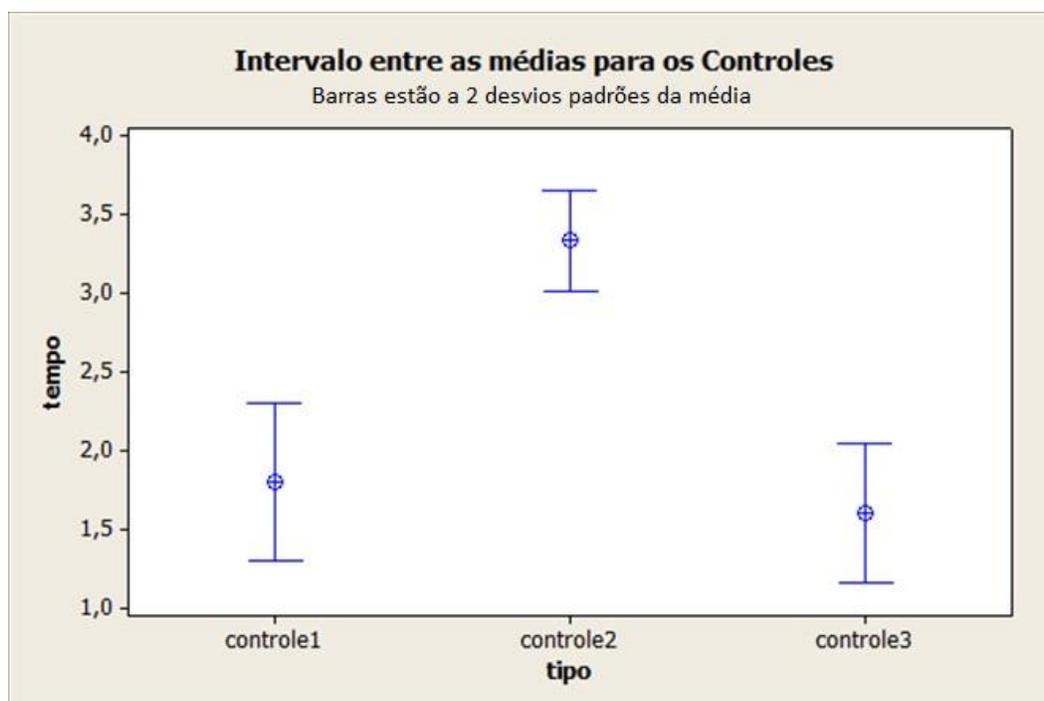


Gráfico A.11: Comparação entre as médias para os experimentos controles do Estudo B2.

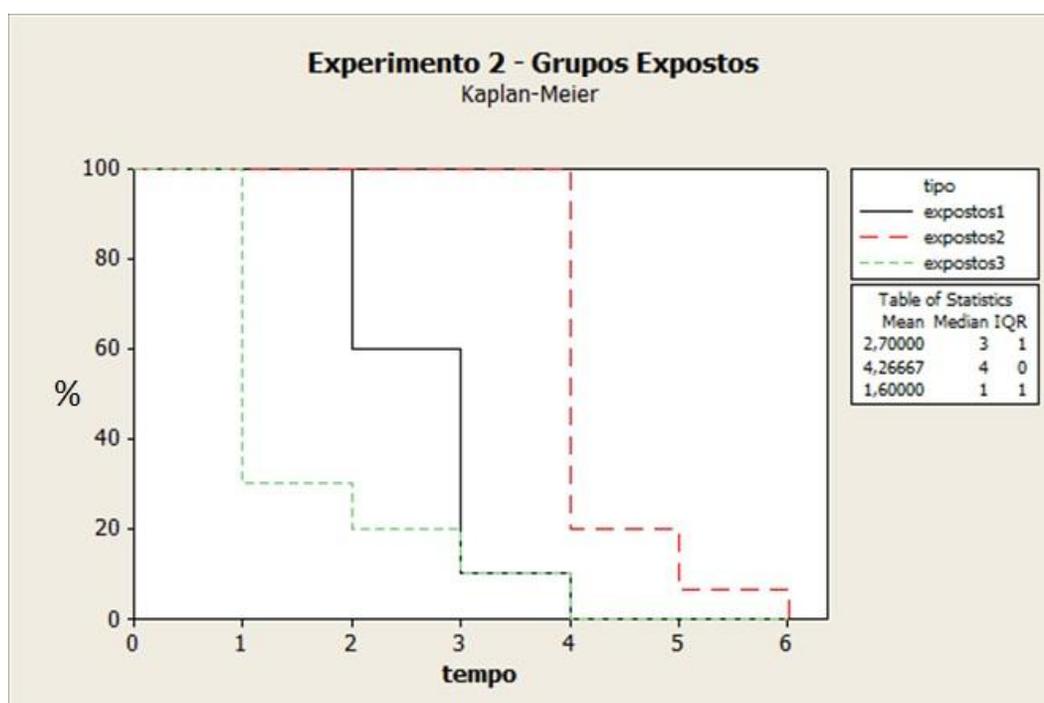


Gráfico A.12: Kaplan-Meier para os experimentos expostos do Estudo B2.

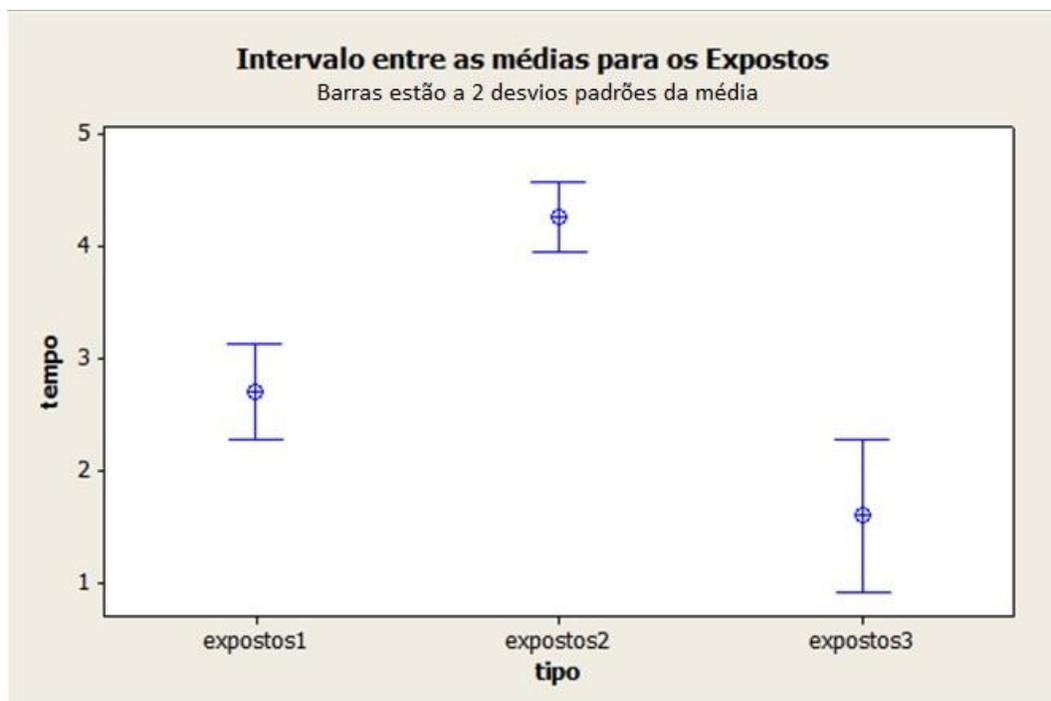


Gráfico A.13: Comparação entre as médias para os experimentos expostos do Estudo B2.

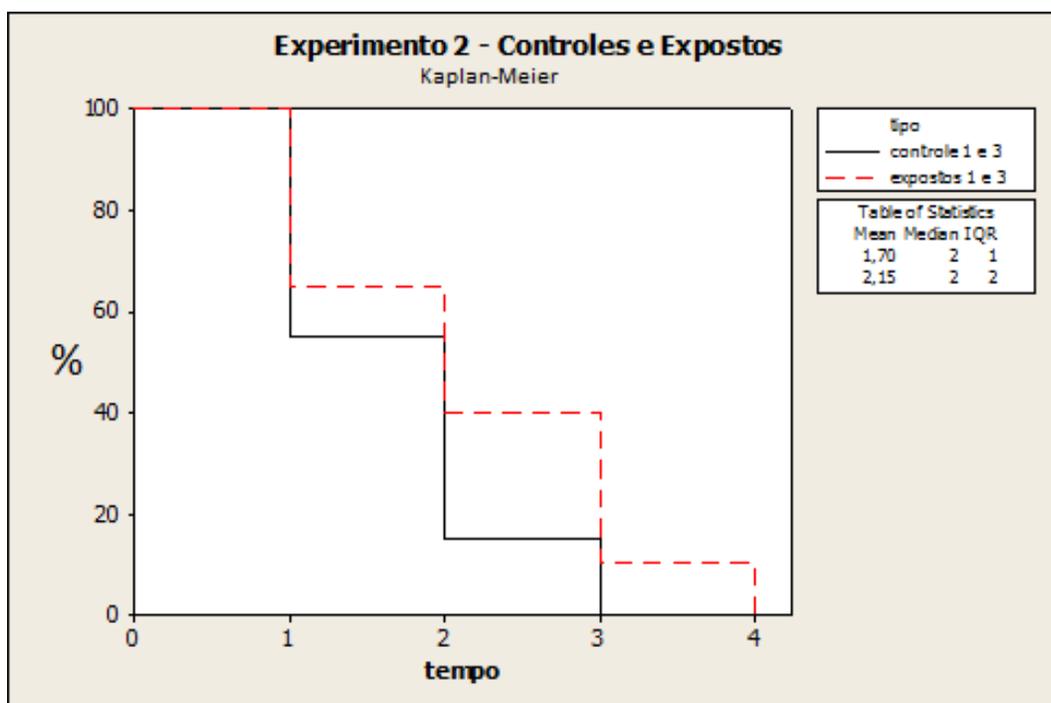


Gráfico A.14: Kaplan-Meier para os experimentos dos realizados nas datas de 03/02/2012 e 12/03/2012 do Estudo B2.

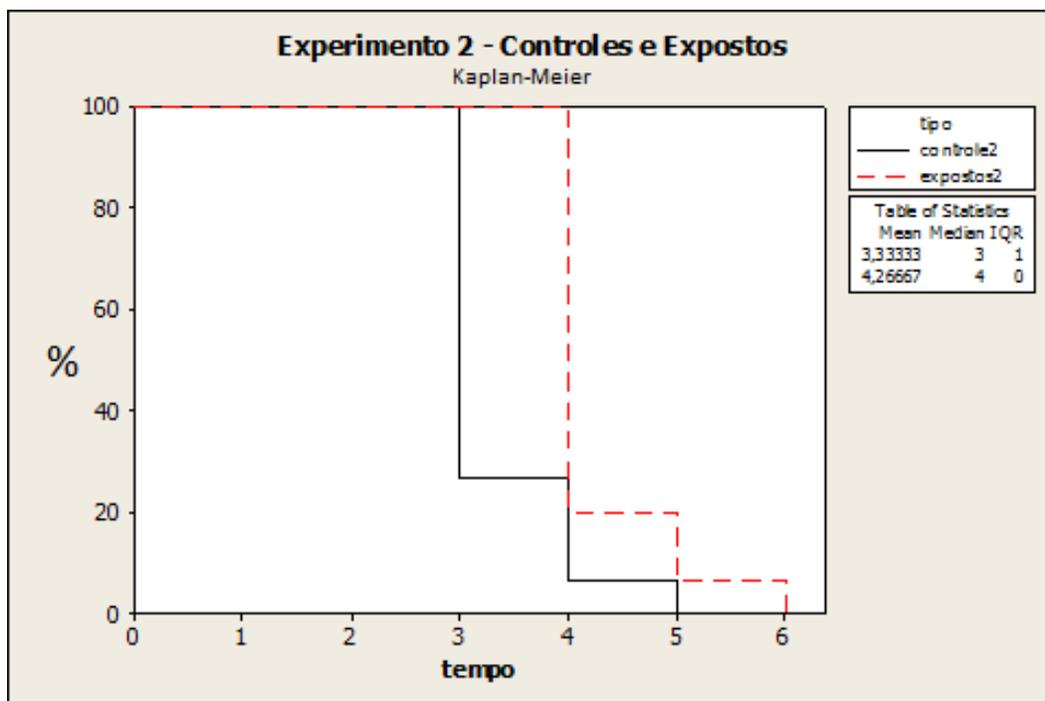


Gráfico A.15: Kaplan-Meier para os experimentos dos realizado na data 02/03/2012 do Estudo B2.

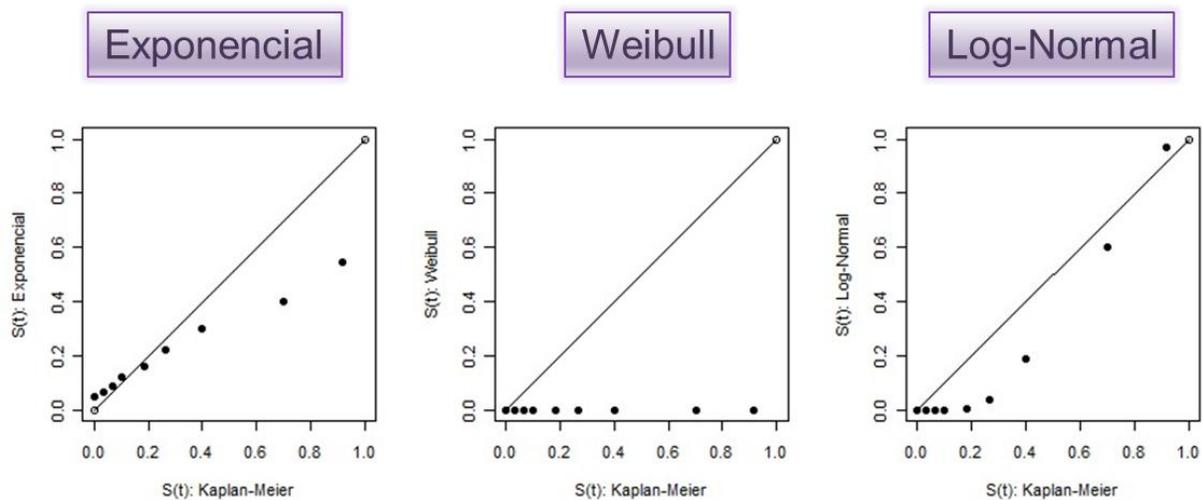


Gráfico A.16: Gráfico de sobrevivência de Kaplan-Meier versus sobrevivência do modelo para o Estudo A1.

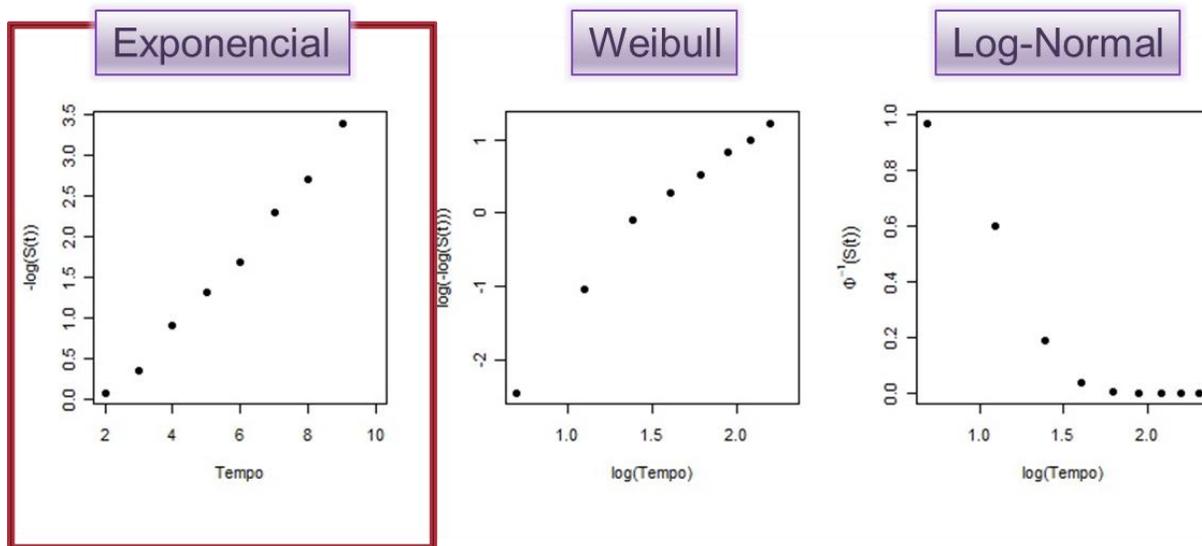


Gráfico A.17: $-\log(S(t))$ versus tempo para o Estudo A1.

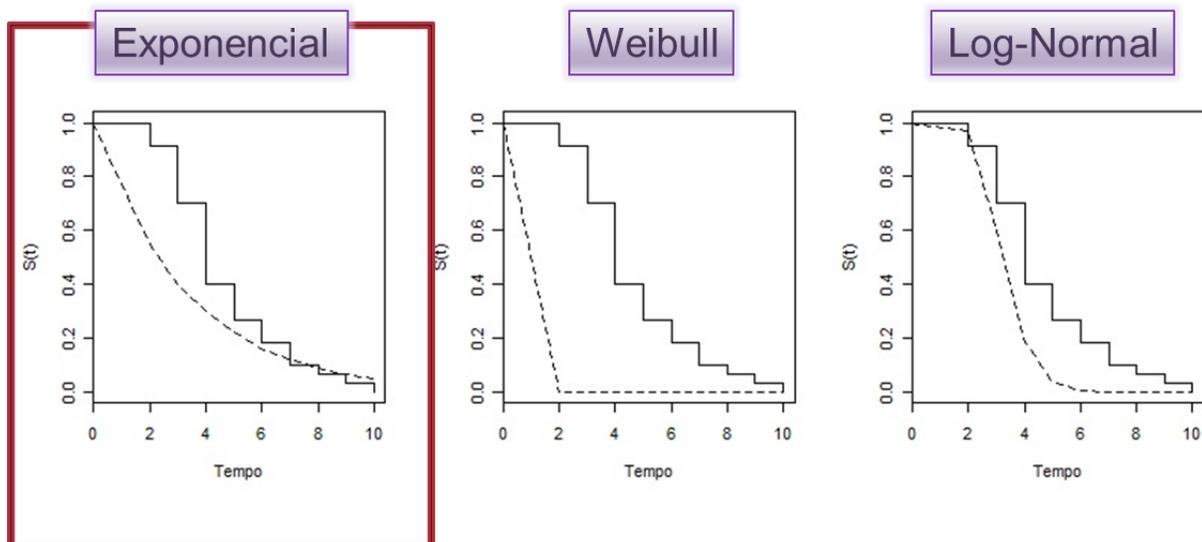


Gráfico A.18: $S(t)$ versus tempo para o Estudo A1.

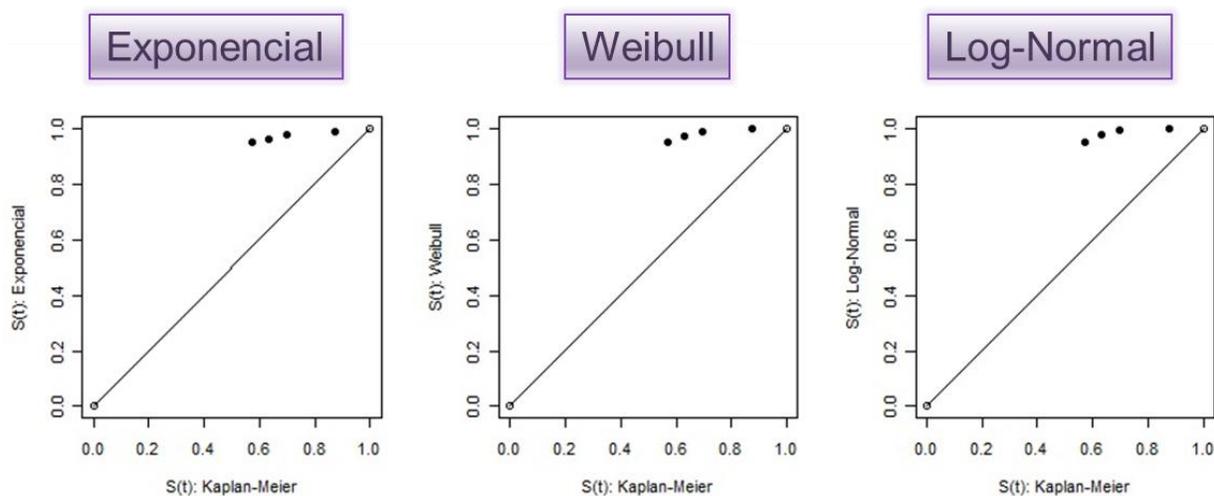


Gráfico A.19: Gráfico de sobrevivência de Kaplan-Meier versus sobrevivência do modelo para o Estudo A2.

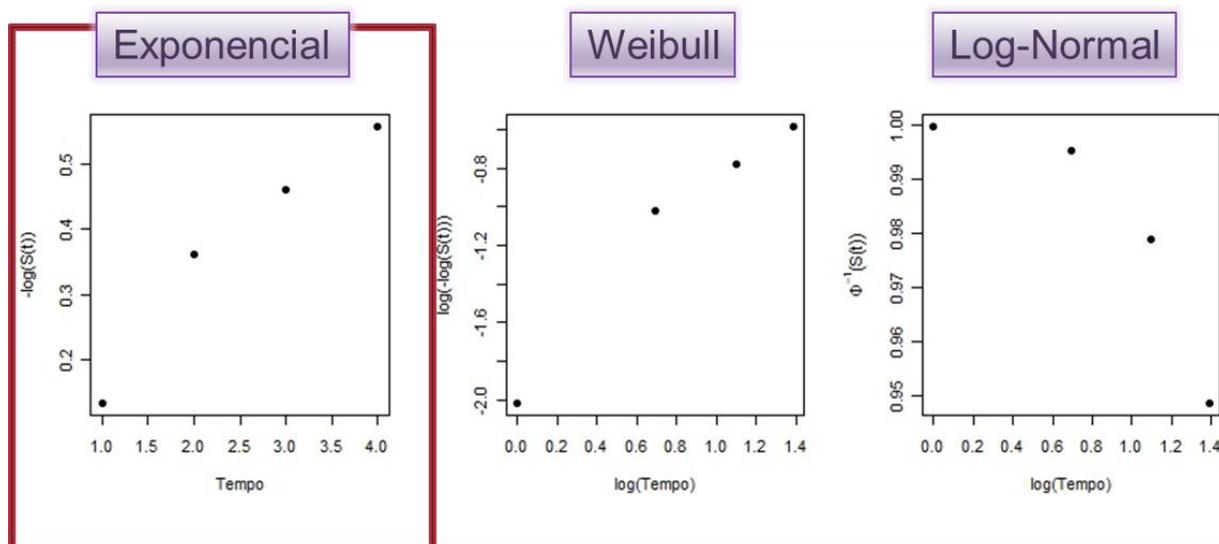


Gráfico A.20: $-\log(S(t))$ versus tempo para o Estudo A2.

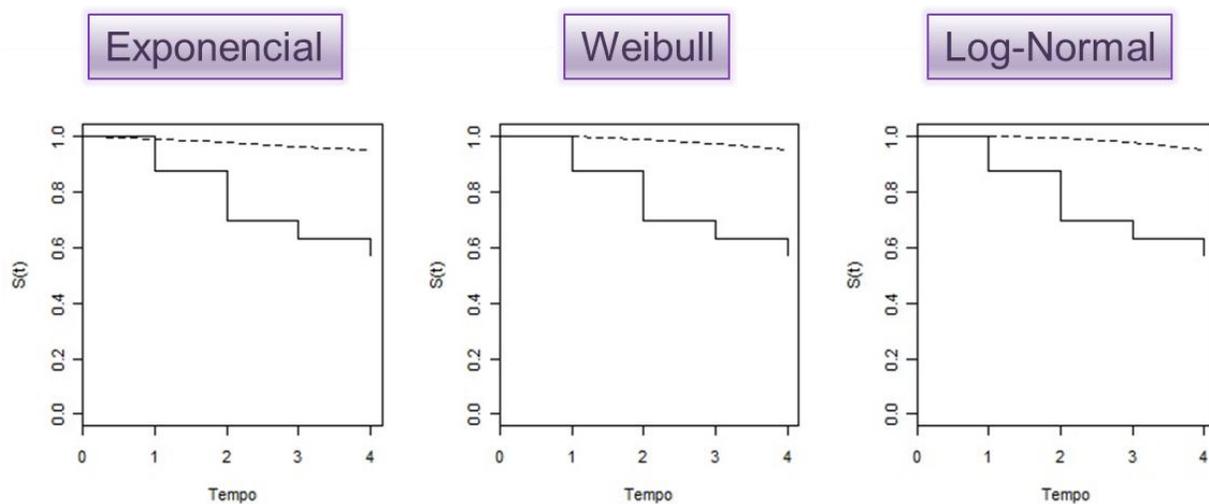


Gráfico A.21: $S(t)$ versus tempo para o Estudo A2.

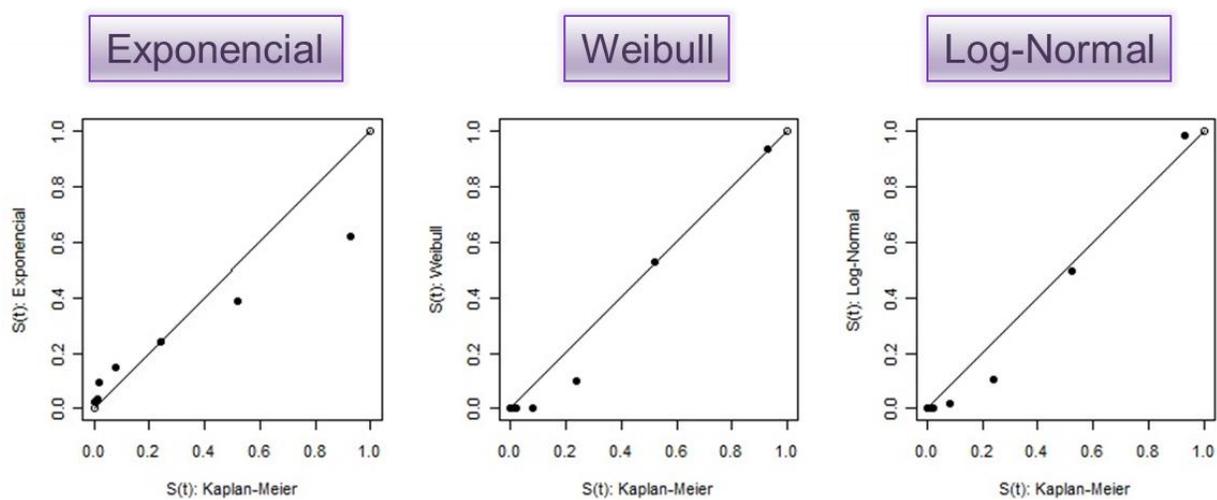


Gráfico A.22: Gráfico de sobrevivência de Kaplan-Meier versus sobrevivência do modelo para o Estudo B1.

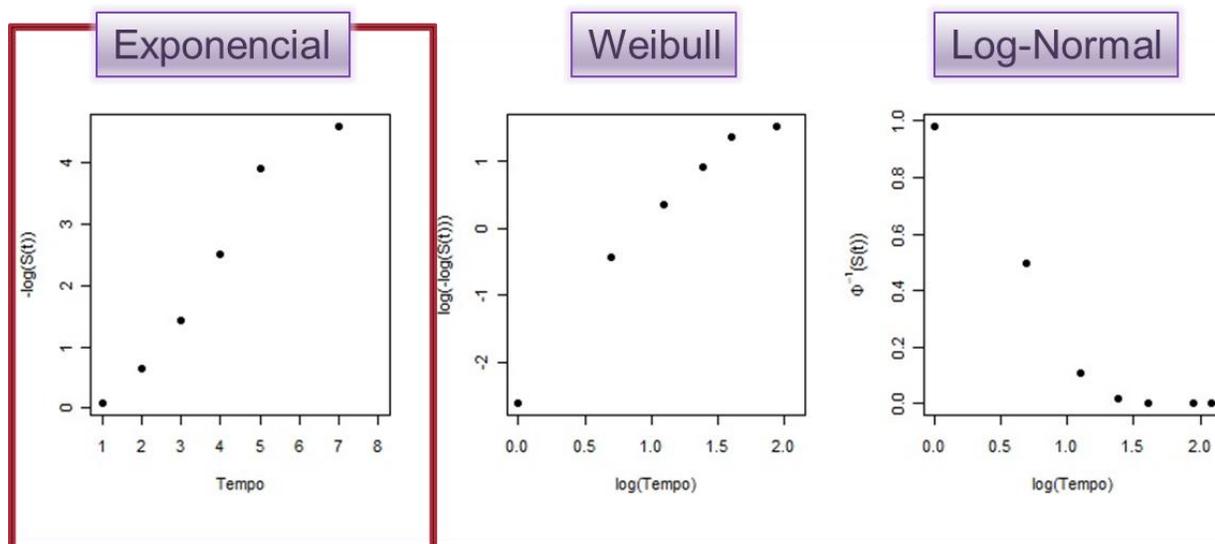


Gráfico A.23: $-\log(S(t))$ versus tempo para o Estudo B1.

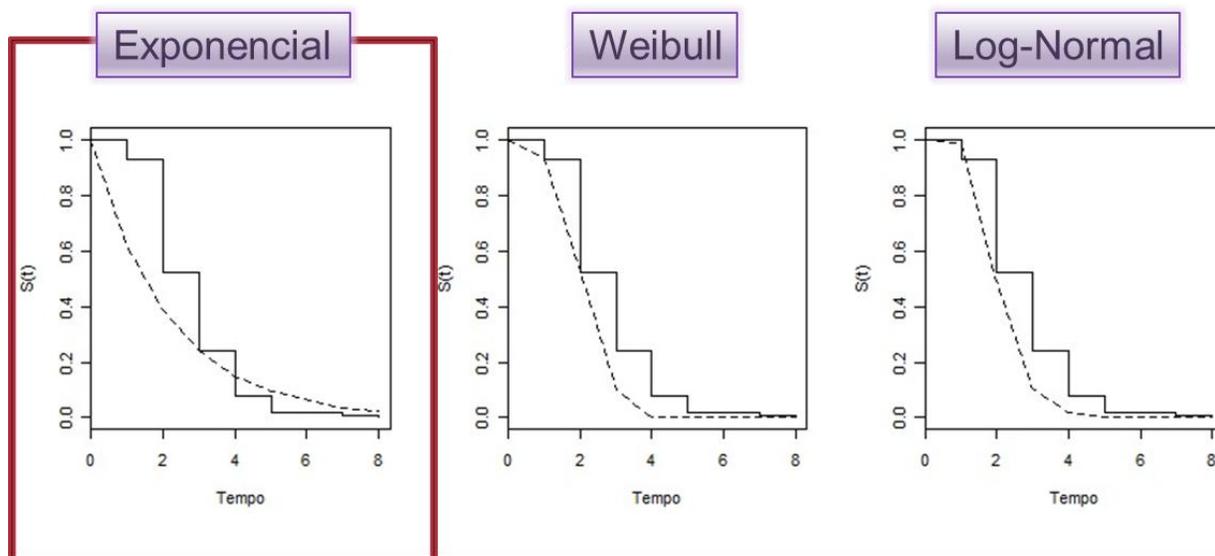


Gráfico A.24: $S(t)$ versus tempo para o Estudo B1.

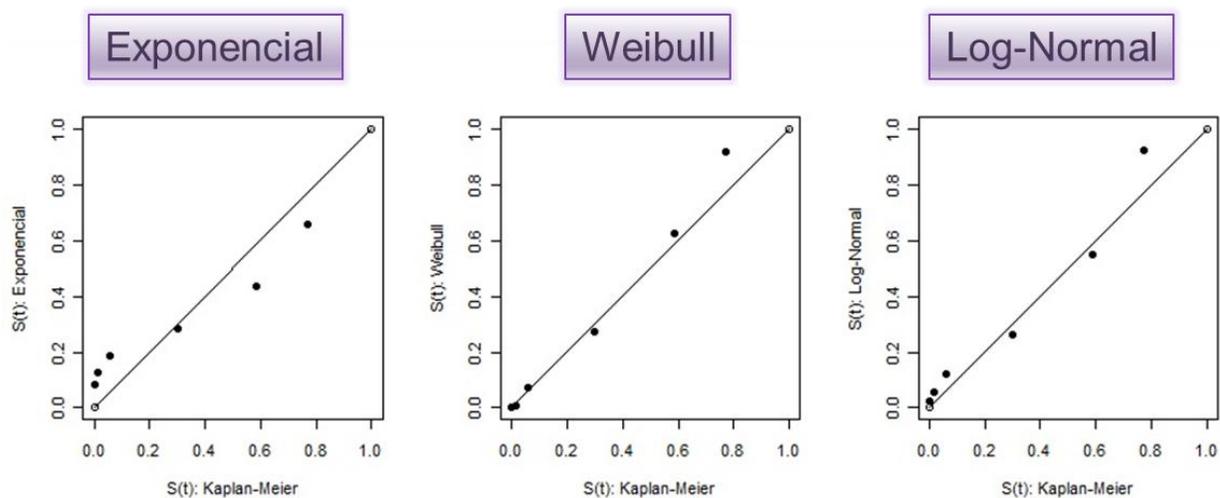


Gráfico A.25: Gráfico de sobrevivência de Kaplan-Meier versus sobrevivência do modelo para o Estudo B2.

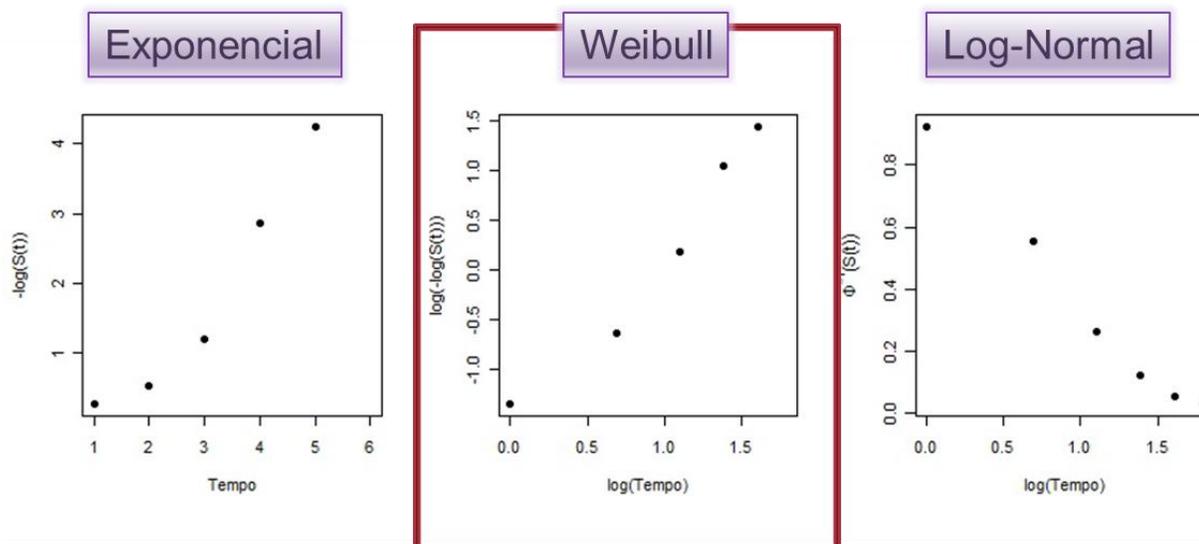


Gráfico A.26: $-\log(S(t))$ versus tempo para o Estudo B2.

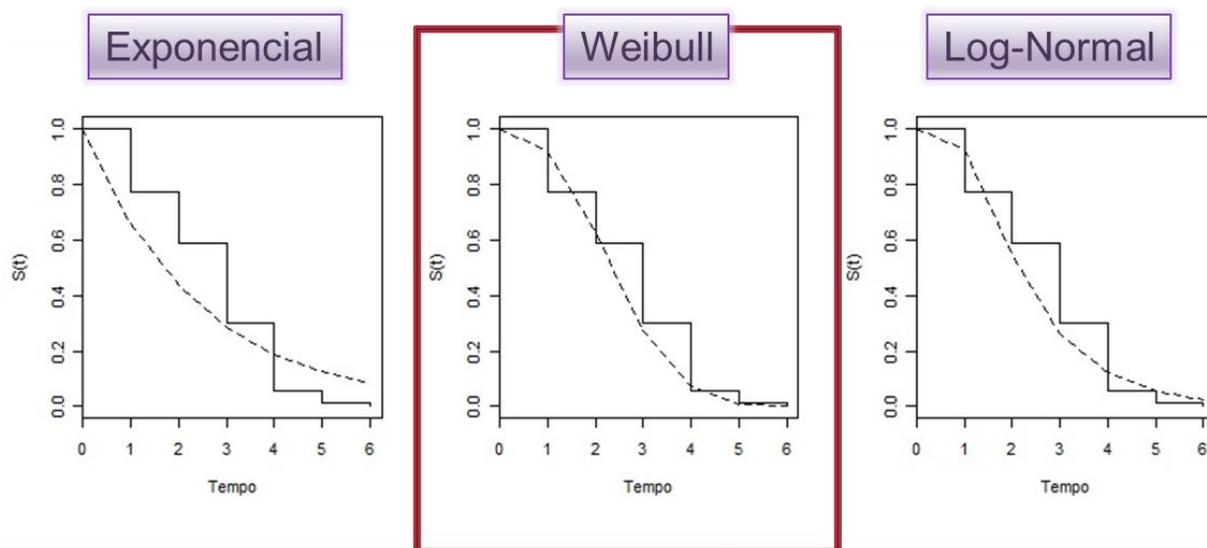


Gráfico A.27: $S(t)$ versus tempo para o Estudo B2.

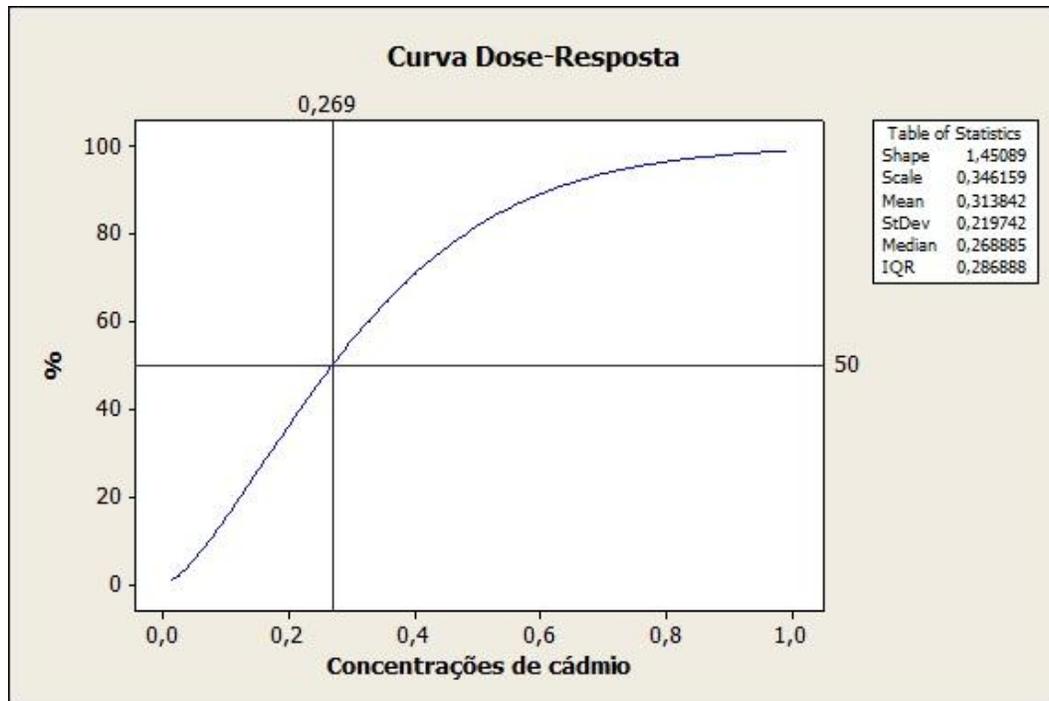


Gráfico A.28: Curva Dose-Resposta para o estudo A2.