

## **Modelo linear misto para avaliar toxicidade por doses repetidas**

**Luzia Pedroso de Oliveira<sup>1 2</sup>**

**César Gonçalves de Lima<sup>3</sup>**

**Vera Lúcia Scherholz Salgado de Castro<sup>4</sup>**

**Maria Célia Siqueira<sup>5</sup>**

**Aline de Holanda Nunes Maia<sup>4</sup>**

### **1 Introdução**

Com o uso crescente de compostos químicos com características ainda não completamente elucidadas, torna-se imprescindível avaliar o risco que eles podem representar à saúde humana. Em modelo animal, testes toxicológicos com ratos Wistar têm sido os mais utilizados. Um dos testes para avaliar ecotoxicidade é o teste por doses repetidas, no qual os ratos recebem, via oral, diariamente ao longo de 28 dias, a substância analisada. Neste tipo de teste uma das características avaliada é a variação de peso corporal durante o período de exposição a substância, pois no caso de efeito tóxico mais evidente pode ocorrer uma diminuição do ganho natural de peso.

Em se tratando de dados longitudinais, o uso de modelos mistos é apropriado, pois possibilitam descrever os perfis de pesos, considerando a variabilidade e as correções das observações ao longo do tempo, assim como a variabilidade entre os animais.

Neste trabalho foi utilizado o modelo linear misto para avaliar a toxicidade por doses repetidas de nanopartículas com propriedades bactericidas, produzidas para serem incluídas em filmes comestíveis para revestimento de frutas e legumes, visando sua conservação.

### **2 Material e métodos**

O experimento foi conduzido no laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança da EMBRAPA Meio Ambiente. A amostra analisada foi composta por 40 ratos Wistar adultos, sendo 5 machos e 5 fêmeas atribuídos aleatoriamente a cada uma das 4 doses do nanocomposto testadas (0, 1, 3 e 5 µg/ml/100g de peso corpóreo). As doses foram administradas diariamente, via oral, ao longo de 28 dias e os animais foram acompanhados e

---

<sup>1</sup> Doutoranda do PPGEEA ESALQ/USP. E-mail: luziapoliveira@usp.br.

<sup>2</sup> Agradecimento a CAPES pelo apoio financeiro.

<sup>3</sup> ZAB - FZEA/USP.

<sup>4</sup> EMPRAPA Meio Ambiente.

<sup>5</sup> Doutoranda do PPGQ UFSCar/EMBRAPA São Carlos.

pesados até o 29º dia. Os ratos do grupo controle (dose 0) foram tratados com solução salina e tiveram o mesmo manejo dos ratos tratados com as outras doses. As diretrizes nacionais e institucionais para manejo e habitação foram seguidas.

O modelo de regressão linear misto com dois fatores para dados longitudinais é apresentado, a seguir, de forma hierárquica em dois níveis. Essa especificação é usada por alguns autores como Raudenbush e Bryk (2002), sendo comum nas ciências sociais e na educação.

No nível 1, o perfil individual dos pesos do rato  $i$ ,  $i=1, 2, \dots, 40$ , ao longo das ocasiões  $t=1, 2, \dots, m$ , em que foram feitas as pesagens é representado por uma reta de regressão, dada pela equação (1). Neste caso,  $m=29$  (número de ocasiões) é igual para todos os ratos, por se tratar de um delineamento balanceado com relação ao fator longitudinal  $d$  (dias após o início do experimento) e sem observações perdidas, não sendo essa uma condição necessária.

$$y_{it} = \beta_{0i} + \beta_{1i}d_t + e_{it}; \quad \underset{\sim}{e}_i = (e_{1i}, e_{2i}, \dots, e_{mi}) \sim N(\underset{\sim}{0}, \underset{\sim}{R}_i) \quad (1)$$

sendo,  $y_{it}$  o peso do rato  $i$  na ocasião  $t$ ;  $\beta_{0i}$  o intercepto da reta referente ao rato  $i$ ;  $\beta_{1i}$  a inclinação da reta do rato  $i$ ;  $d_t$  o  $n^\circ$  dias após o início do experimento (na ocasião  $t$ );  $e_{it}$  o erro aleatório associado ao peso observado do rato  $i$  na ocasião  $t$ ;  $\underset{\sim}{e}_i$  o vetor dos erros aleatórios associados às medidas repetidas observadas no rato  $i$ ;  $\underset{\sim}{R}_i$  a matriz de variâncias e covariâncias residuais de dimensão  $m \times m$ , podendo assumir vários tipos de estruturas (LITTELL et al., 2006).

Os coeficientes das retas individuais  $\beta_{0i}$  e  $\beta_{1i}$  em (1), são considerados no nível 2, variáveis respostas que dependem dos efeitos fixos dos fatores e/ou de covariáveis no nível do rato e/ou de efeitos aleatórios. O modelo considerando os 2 níveis de sexo, os 4 níveis de doses, suas interações e os efeitos aleatórios, é descrito pela equação (2):

$$\beta_{qi} = \gamma_{q0} + \gamma_{q1}M_i + \gamma_{q2}D_{1i} + \gamma_{q3}D_{3i} + \gamma_{q4}D_{5i} + \gamma_{q5}M_iD_{1i} + \gamma_{q6}M_iD_{3i} + \gamma_{q7}M_iD_{5i} + u_{qi}, \quad (2)$$

$q = 1, 2$ , sendo,

$M_i$ ,  $D_{1i}$ ,  $D_{3i}$  e  $D_{5i}$  as variáveis indicadoras de macho e das doses 1, 3 e 5, respectivamente;  
 $\gamma_{q0}$  o coeficiente associado aos níveis de referência de sexo e dose (fêmea e grupo controle);  
 $\gamma_{q1}$  efeito principal de macho;  
 $\gamma_{q2}, \gamma_{q3}, \gamma_{q4}$  efeitos principais dos níveis 1, 3 e 5 de dose, respectivamente;  
 $\gamma_{q5}, \gamma_{q6}, \gamma_{q7}$  efeitos das interações dos níveis dos fatores sexo e dose;  
 $u_{qi}$  variável aleatória denominada efeito aleatório, ou seja, diferença entre o coeficiente da reta individual em relação ao coeficiente da reta média referente a respectiva combinação dos níveis dos fatores sexo e dose, ou seja,

$$u_{qi} = \beta_{qi} - (\gamma_{q0} + \gamma_{q1}M_i + \gamma_{q2}D_{1i} + \gamma_{q3}D_{3i} + \gamma_{q4}D_{5i} + \gamma_{q5}M_iD_{1i} + \gamma_{q6}M_iD_{3i} + \gamma_{q7}M_iD_{5i}). \quad (3)$$

Assume-se que o vetor de efeitos aleatórios  $(u_{0i}, u_{1i}) \sim N(0, G_i)$ , sendo

$$G_i = \begin{bmatrix} \sigma_{u_0}^2 & \sigma_{u_0, u_1} \\ \sigma_{u_0, u_1} & \sigma_{u_1}^2 \end{bmatrix} \text{ a matriz de variâncias e covariâncias dos efeitos aleatórios, em que, } \sigma_{u_0}^2,$$

$\sigma_{u_1}^2$ , representam respectivamente, as variâncias dos interceptos e dos coeficientes angulares das retas associadas aos ratos da população e  $\sigma_{u_0, u_1}$  a covariância entre esses coeficientes.

Existe a possibilidade de assumir matrizes  $G_i$  e  $R_i$ , distintas para diferentes grupos de ratos, por exemplo, assumir  $G_{i\_M}$  para os machos e  $G_{i\_F}$  para as fêmeas.

O modelo linear misto obtido substituindo no modelo do nível 1 em (1) as expressões de  $\beta_{0i}$  e  $\beta_{1i}$  em (2) é dado por:

$$y_{it} = \gamma_{00} + \gamma_{01}M_i + \gamma_{02}D_{1i} + \gamma_{03}D_{3i} + \gamma_{04}D_{5i} + \gamma_{05}M_iD_{1i} + \gamma_{06}M_iD_{3i} + \gamma_{07}M_iD_{5i} + \\ + \gamma_{10}d_t + \gamma_{11}M_id_t + \gamma_{12}D_{1i}d_t + \gamma_{13}D_{3i}d_t + \gamma_{14}D_{5i}d_t + \gamma_{15}M_iD_{1i}d_t + \gamma_{16}M_iD_{3i}d_t + \\ + \gamma_{17}M_iD_{5i}d_t + \mathbf{u}_{oi} + \mathbf{u}_{1i}d_t + \mathbf{e}_{ti}. \quad (4)$$

Na parte fixa os coeficientes  $\gamma_{0j}$ ,  $\gamma_{1j}$   $j=1, 2, \dots, 7$ , representam, respectivamente, os efeitos de sexo, dose e da interação  $\text{sexo} \times \text{dose}$  nos interceptos e nas inclinações das retas. Dessa forma, têm-se retas médias com interceptos e inclinações diferentes para as combinações de sexo e dose. As estimativas dos coeficientes dessas retas médias são obtidas substituindo as variáveis indicadoras por seus valores correspondentes. Por exemplo, a reta média para os machos que receberam a dose 1 ( $M\_D_1$ ) é dada por:

$$\bar{y}_{t(M\_D_1)} = (\gamma_{00} + \gamma_{01} + \gamma_{02} + \gamma_{05}) + (\gamma_{10} + \gamma_{11} + \gamma_{12} + \gamma_{15})d_t. \quad (5)$$

A parte aleatória do modelo misto em (4) está destacada em negrito. Ao incluir os efeitos aleatórios  $u_{0i}$ ,  $u_{1i}$ , no intercepto e no coeficiente angular em (2), cada rato passa a ter uma reta predita com intercepto e inclinação diferentes das demais retas dos outros ratos. Na maioria dos casos não há interesse específico nos coeficientes dessas retas preditas, mas é por meio da inclusão dos efeitos aleatórios que a variabilidade entre as unidades experimentais é levada em conta no modelo. Nesse caso,

$$\text{Var}(Y_{it}) = \text{Var}(u_{oi} + u_{1i}d_t + e_{ti}) = \sigma_{u_0}^2 + d_t \sigma_{u_1}^2 + \sigma^2 \quad e \quad (6)$$

$\text{Cov}(Y_{it}, Y_{it'}) = \text{Cov}(u_{oi} + u_{1i}d_t + e_{ti}, u_{oi'} + u_{1i'}d_{t'} + e_{t'i'}) = \text{Var}(u_{oi}) + d_t d_{t'} \text{Var}(u_{1i}) = \sigma_{u_0}^2 + d_t d_{t'} \sigma_{u_1}^2$  e portanto, as variâncias e covariâncias passam a depender não somente das variâncias e covariâncias dos erros, mas também das variâncias e covariâncias dos efeitos aleatórios e dos

níveis do fator longitudinal. Dado que  $Cov(Y_{ii}, Y_{i'i'}) = Cov(u_{oi} + e_{ii}, u_{oi'} + e_{i'i'}) = 0$ , assume-se independência entre os animais.

A especificação apropriada das matrizes de covariâncias é uma etapa bastante importante na seleção de um modelo linear misto, uma vez que as inferências sobre os efeitos fixos dependem das estruturas de covariâncias consideradas.

Os modelos foram ajustados usando o procedimento MIXED do SAS. Em alguns casos houve problemas de convergência, sendo necessário entrar com outros valores iniciais. Kiernan, Tao e Gibbs (2012), apresentam dicas e estratégias para ajustes de modelos mistos no SAS. O comando `type` possibilita especificar as estruturas das matrizes  $G_i$  e  $R_i$ , estando vários tipos disponíveis.

Os modelos foram comparados usando TRV, critérios de informação AIC, AICC e BIC, obtidos usando o método de máxima verossimilhança restrita (`method=REML`) (WEST; WELCH; GALECKI, 2007). Os efeitos fixos foram testados usando a correção de Kenward-Roger (`ddfm=KR`) e o método de máxima verossimilhança (`method=ML`) (SPEED, 2013).

### 3 Resultados e discussões

A Figura 1 apresenta os perfis de pesos individuais observados de machos (azul) e fêmeas (vermelho) e os perfis médios de pesos nos níveis dos fatores sexo e dose (linhas pontilhadas). Observa-se uma dispersão dos perfis individuais com relação aos respectivos perfis médios, sugerindo a inclusão de efeitos aleatórios.

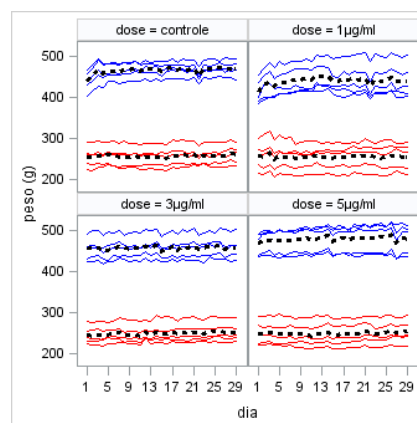


Figura 1 - Perfis individuais e médios de pesos nos níveis dos fatores sexo e dose.

De acordo com os resultados da Tabela 1, que apresenta o resumo de alguns modelos ajustados, verificou-se que o melhor ajuste foi obtido com o modelo 6, segundo TRV e os 3 critérios de informação. A análise gráfica dos resíduos condicionais desse modelo indicou normalidade e aleatoriedade em torno de zero.

Tabela 1 – Estatísticas de ajuste de alguns modelos.

mod.	efeitos aleat.	var. ef. aleat.	variâncias dos erros (estrutura de $R_i$ )	-2log MVR	AIC	AICC	BIC
1	$u_{0i}$	$\sigma_{u_0}^2$	$\sigma_F^2, \sigma_M^2$	7562	7568	7568	7573
2	$u_{0i}, u_{1i}$	$\sigma_{u_0}^2, \sigma_{u_1}^2$	$\sigma_F^2, \sigma_M^2$	7287	7295	7295	7302
3	$u_{0i}, u_{1i}$	$\sigma_{u_0}^2, \sigma_{u_1}^2$	$\sigma_1^2 \dots \sigma_{29}^2$	7126	7188	7190	7241
4	$u_{0i}, u_{1i}$	$\sigma_{u_0}^2, \sigma_{u_1}^2$	$\sigma_{F1}^2, \dots, \sigma_{F29}^2, \sigma_{M1}^2, \dots, \sigma_{M29}^2$	6972	7092	7098	7193
5	$u_{0i}, u_{1i}$	$\sigma_{u_0}^2, \sigma_{u_1}^2$	$\sigma_1^2, \dots, \sigma_{29}^2, \rho(\text{arh1})$	7024	7088	7090	7142
6	$u_{0i}, u_{1i}$	$\sigma_{u_0}^2, \sigma_{u_1}^2$	$\sigma_1^2, \dots, \sigma_{29}^2, \rho_1, \dots, \rho_{28}(\text{ante1})$	6882	7000	7007	7100

De acordo com o modelo 6 apenas os efeitos de dia e sexo foram significativos, ou seja, não houve diferenças entre os ganhos de pesos de machos e fêmeas nas diferentes doses, havendo somente diferença entre os sexos com relação ao pesos iniciais dos animais.

Depois de escolhida a estrutura de covariâncias um modelo reduzido com relação a parte fixa foi ajustado, sendo os perfis médios dos pesos descritos por apenas duas retas paralelas, uma para cada sexo.

#### 4 Conclusões

Foi possível obter um bom ajuste, usando modelo linear misto, que descreveu de forma apropriada os perfis médios de pesos, assim como as variâncias e as correlações ao longo do tempo no mesmo rato e entre eles.

#### 5 Bibliografia

- KIERNAN, K.; TAO, J.; GIBBS, P. Tips and Strategies for Mixed Modeling with SAS/STAT® Procedures. n. 332. SAS Institute Inc. 2012. 18p. Disponível em: <https://support.sas.com/resources/papers/proceedings12/332-2012.pdf>. Acesso em: 5 de fevereiro de 2014.
- LITTELL, R. C.; MILLIKEN, G. A.; STROUP, W. W.; WOLFINGER R. D.; SCHABENBERGER, O. **SAS® for mixed models**, 2a. ed. Cary, NC: SAS Institute Inc. 2006. 813 p.
- RAUDENBUSH, S. W.; BRYK, A. S. **Hierarchical linear models: applications and data analysis methods**. 2nd ed. Advanced Quantitative Techniques in the Social Sciences Series 1. London: Sage Publications, Inc. 2002. 485 p.
- SPEED, M. **Applied mixed models for professors course notes**. Cary: SAS Institute Inc. 2013.
- WEST, B. T.; WELCH, K. B.; GALECKI, A. T. **Linear mixed models: a practical guide using statistical software**. Boca Raton, Chapman & Hall/CRC. 2007. 339p.