

**CURVAS DE RESPOSTA NA MANOBRA DE CÁLCIO EM ANIMAIS
INDUZIDOS À ESTENOSE AÓRTICA**

LÍVIA PASCHOALINO DE CAMPOS

Texto apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Doutor em Biometria.

BOTUCATU
São Paulo - Brasil
Fevereiro – 2019

**CURVAS DE RESPOSTA NA MANOBRA DE CÁLCIO EM ANIMAIS
INDUZIDOS À ESTENOSE AÓRTICA**

LÍVIA PASCHOALINO DE CAMPOS

Orientador: Prof. Dr. **Carlos Roberto Padovani**

Texto apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Doutor em Biometria.

BOTUCATU
São Paulo - Brasil
Fevereiro – 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Campos, Livia Paschoalino de.

Curvas de resposta na manobra de cálcio em animais induzidos à estenose aórtica / Livia Paschoalino de Campos. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Carlos Roberto Padovani

Capes: 90194000

1. Análise multivariada. 2. Estenose da válvula aórtica. 3. Modelos estatísticos. 4. Cálcio. 5. Remodelação ventricular. 6. Experimentação animal.

Palavras-chave: Curvas de Crescimento; Estenose Aórtica Induzida; Manobras de Cálcio; Potthoff & Roy.

Dedicatória

Aos meus pais, Eduardo e Regina, por sempre estarem ao meu lado.

Agradecimentos

À Deus por tudo em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, por toda dedicação na orientação, disponibilidade (aos sábados, domingos e feriados), paciência, ensinamentos diários, amor incondicional pelo que faz e ser um exemplo de homem. Por contribuir de forma ímpar na minha formação. Meu eterno muito obrigada pelos mais de 10 anos de dedicação a mim!

Ao Grupo de Pesquisa em Cardiologia Experimental pela disponibilização dos dados, em especial ao Prof. Dr. Carlos Antônio Cicogna e seus alunos Dijon e Paula Grippa pelo esclarecimento das dúvidas.

À Professora Dra. Gislaine Batistela pelas conversas, discussões e auxílio recebidos durante a elaboração deste trabalho.

Aos amigos do Departamento de Bioestatística: Arthur, Júnior, Luiz e Dona Selda por serem sempre disponíveis, dispostos e mostrarem-se tão acolhedores.

Aos Professores Dr. Sérgio Augusto Rodrigues e Dr. Paulo André de Oliveira por aceitarem compor a banca do exame geral de qualificação. As sugestões, críticas e correções foram imprescindíveis para o engrandecimento desse trabalho. Agradeço, também, as ajudas extras recebidas.

Aos docentes do Departamento de Bioestatística, ao programa de Pós-Graduação em Biometria e aos funcionários da Pós-Graduação por todo auxílio recebido.

Aos meus amigos de Pós-Graduação em Biometria: Magali, Jacque, Felipe e Ágda, pelos cafés, pelos jantares japa, pelos abraços apertados e por deixarem essa jornada muito mais cheia de brilho. Sem vocês essa etapa seria muito mais árdua.

Às "Ladies da sala 8", Edijane e Rita, por todas leseiras, cafés no Mariazinha, quilos de açúcar ingeridos, mensagens de desespero, horas de companhia nos estudos e conversas. Vocês são SHOW!

Aos meus pais, Regina e Eduardo, por todo apoio emocional, carinho, cuidado, amor, ensinamentos, integridade, por serem pessoas batalhadoras e mostrarem o verdadeiro valor da vida; ao meu irmão Fábio, por me permitir ser tia do doce Miguel, que tanto me traz alegria.

À minha tia Eliane por todo amor e pela realização da revisão gramatical.

À toda minha família que sempre acreditou em mim e torceu pelo meu sucesso. Em especial ao: Gu, Cris, Gi e tia Cleide.

Ao amigo Felipe Teles que me surpreende a cada dia com a sua amizade, por me fazer sentir cada dia mais jovem e por toda ajuda recebida durante a realização deste trabalho.

À Letícia, por se mostrar uma irmã, estar sempre ao meu lado me ouvindo e ajudando. Por dividir comigo momentos de amizade, parceria, risadas, dúvidas, anseios e alegria.

Às minhas amigas "Patitas" que me acompanham desde o ensino fundamental e sempre estão ao meu lado me apoiando e motivando.

Aos meus amigos, cada um a sua maneira, que contribuíram para a realização desse trabalho: Manu, Marcelo, Nika, Elisa, Cíntia, Amanda, André, Lígia, Malu, Garça, Camis, Fê, Josi, Adriano, Ana Paula e Nathalya. Obrigada pela torcida, amizade e compreensão nessa fase de muitas ausências.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Sumário

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE QUADROS	xi
RESUMO	xii
SUMMARY	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Ciências da Saúde	3
2.2 Estatística Multivariada aplicada à Ciência da Saúde	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Plano Experimental	28
3.2 Estatística Multivariada	34
3.2.1 Análise de Variância Multivariada	38
3.2.2 Modelo Linear Multivariado de Crescimento (MLMC)	50
4 RESULTADOS	60
4.1 Medidas descritivas	60
4.2 Modelo linear multivariado	65

	vii
4.3 Modelo Linear Multivariado de Crescimento	70
5 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

Lista de Figuras

	Página
3.1 Alocação do clipe.	29
3.2 Representação esquemática da curva de contração isométrica.	32
4.1 Gráfico do perfil das médias dos grupos de G1, G2, G3 e G4 para a variável TD.	62
4.2 Gráfico do perfil das médias dos grupos de G1, G2, G3 e G4 para a variável TR.	64
4.3 Gráfico Q-Q de G1, G2, G3 e G4 para a variável TD.	66
4.4 Gráfico Q-Q de G1, G2, G3 e G4 para a variável TR.	67

Lista de Tabelas

	Página
3.1 Descrição geral da matriz de dados de um experimento multivariado com quatro grupos em sete momentos (concentração de cálcio) de avaliação	35
3.2 Descrição geral da matriz de médias das variáveis nas concentrações de cálcio de um experimento multivariado com quatro grupos nas sete concentrações de cálcio avaliadas	37
4.1 Média e desvio padrão da TD segundo a concentração de cálcio (mM) e grupos	61
4.2 Média e desvio padrão da TR segundo a concentração de cálcio (mM) e grupos	63
4.3 Matriz de correlação da variável TD nas concentrações de cálcio (mM)	64
4.4 Matriz de correlação da variável TR nas concentrações de cálcio (mM)	65
4.5 Resultado do modelo de análise de variância multivariada para a variável TD	68
4.6 Resultado do modelo de análise de variância multivariada para a variável TR	69
4.7 Limites do intervalo de 95% de confiança simultâneo para as diferenças de médias da variável TR para o fator cirurgia em cada concentração de cálcio	69
4.8 Valor-p da estatística de teste (RV) para os graus do polinômio para a TD segundo o modelo polinomial proposto	73
4.9 Médias da TD obtidas a partir polinômio de 2 ^o grau em $\frac{1}{Ca}$	75

4.10	Médias da TD obtidas a partir do polinômio de 2 ^o grau em $\frac{1}{\ln(C_{a+1})}$. . .	76
4.11	Valor-p da estatística de teste (RV) para os graus do polinômio para a TR segundo o modelo polinomial proposto	77
4.12	Média da TR obtidas a partir do polinômio de 1 ^o grau em $\frac{1}{C_a}$	78
4.13	Média da TR obtidas a partir do polinômio de 1 ^o grau em $(\frac{1}{\ln(C_{a+1})})$. . .	79
4.14	Intervalos de confiança simultâneo de Hotelling para as diferenças entre as médias de dois grupos para a TD no modelo inverso da concentração de cálcio $(\frac{1}{C_a})$	80
4.15	Intervalos de confiança simultâneo de Hotelling para as diferenças entre as médias de dois grupos para a TD no modelo inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade $\frac{1}{\ln(C_{a+1})}$	81
4.16	Intervalos de confiança simultâneo de Hotelling para as diferenças entre as médias de dois grupos para a TR no modelo polinomial inverso da raiz quadrada da concentração de cálcio $(\frac{1}{C_a})$	82
4.17	Intervalos de confiança simultâneo de Hotelling para as diferenças entre as médias de dois grupos para a TR no modelo inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade $\frac{1}{\ln(C_{a+1})}$	83
4.18	Soma de quadrados dos desvios da variável TD para o ajuste dos modelos de 2 ^o grau	84
4.19	Soma de quadrados dos desvios da variável TR para o ajuste do modelo de 1 ^o grau	85

Lista de Quadros

	Página
1 Quantidade de calorias e ácidos graxos nas dietas	30
2 Quadro da MANOVA para dois fatores	47
3 Estrutura dos grupos experimentais	60

CURVAS DE RESPOSTA NA MANOBRA DE CÁLCIO EM ANIMAIS INDUZIDOS À ESTENOSE AÓRTICA

Autora: LÍVIA PASCHOALINO DE CAMPOS

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ROBERTO PADOVANI

RESUMO

Em diversos experimentos biológicos, mais especificamente nos relacionados à área da saúde, é muito comum ocorrerem situações em que a estrutura dos dados apresenta dependência em suas unidades experimentais (dados longitudinais), portanto, não se deve considerar apenas a variabilidade dos dados, mas também a estrutura de covariância envolvida. Neste estudo, utilizou-se dois grupos de ratos, sendo um induzido à Estenose Aórtica (EAo) pela colocação do clipe de prata na raiz da aorta ascendente e outro submetido apenas ao procedimento cirúrgico chamado Controle (Sham). Ambos foram submetidos à duas diferentes dietas (Normolipídica e Hiperlipídica) em que se avaliou as respostas das variáveis mecânicas tensão desenvolvida (TD) e tensão de repouso (TR) segundo a técnica do músculo papilar isolado, para sete concentrações sequenciais de cálcio, com o propósito de apreciar o processo de remodelação cardíaca. Primeiramente, houve interesse em comparar as médias

nos grupos formados pela combinação de dois fatores, que resultaram em quatro grupos (G1 - EAo e Normolipídica ($n = 12$), G2 - EAo e Hiperlipídica ($n = 13$), G3 - Sham e Normolipídica ($n = 13$) e G4 - Sham e Hiperlipídica ($n = 14$), nas duas variáveis envolvidas. Além disso, houve interesse em descrever o perfil médio de resposta das funções mecânicas nas diferentes concentrações de cálcio (0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM, 3,0 mM, 3,5 mM) empregando o modelo linear multivariado de crescimento (MLMC) via proposta de Potthoff & Roy (1964) para estimar a relação funcional das variáveis mecânicas com as concentrações de cálcio estudadas, que consideraram o vetor de respostas determinado pelas diferentes concentrações de cálcio. Para a proposta de modelo funcional de resposta do fenômeno biológico, foram consideradas pesquisas anteriores que sugerem que a resposta funcional das variáveis TD e TR não são adequadamente previstas nas concentrações originais de cálcio, indicando a necessidade de transformação dos valores das concentrações, a fim de se obter um modelo relacional mais compatível aos dados em estudo. Diante dessa constatação, adotaram-se alguns polinômios não convencionais (raiz quadrada da concentração de cálcio, inverso da concentração de cálcio, inverso da raiz quadrada da concentração de cálcio, logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade e inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade) e complementaram-se os estudos com o teste para avaliação do grau polinomial a ser utilizado, como resposta do MLMC, a fim de se encontrar o modelo mais simples e informativo que explicasse as variáveis consideradas. As transformações mais adequadas para descrever o comportamento das variáveis TD e TR foram as que envolveram o inverso da concentração de cálcio e o inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade. Os ajustes dos modelos indicaram a utilização de polinômio de 2^o grau como sendo o mais parcimonioso para representar a relação funcional da variável mecânica TD e polinômios de 1^o grau para a variável TR. Quando se empregou o MLM os grupos estudados apresentaram diferença apenas em suas respostas médias no fator cirurgia na variável TR. Para o MLMC, além da diferença encontrada nos perfil médios da variável TR, também, foi possível

encontrar diferença nos perfis na variável mecânica TD. Em síntese, concluí-se que a família polinomial que melhor responde a predição das variáveis mecânicas TD e TR, nas diferentes concentrações de cálcio, consiste no inverso da concentração de cálcio e no inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade. Quanto à adequabilidade do modelo o mais informativo para a resposta biológica das variáveis mecânicas indica-se: o polinômio de 1^o grau no inverso da concentração de cálcio para a variável TR e o polinômio de 2^o grau no modelo inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade para a TD.

RESPONSE CURVES IN CALCIUM MEASURE IN ANIMALS INDUCED AORTIC STENOSIS

Author: LÍVIA PASCHOALINO DE CAMPOS

Adviser: Prof. Dr. CARLOS ROBERTO PADOVANI

SUMMARY

In many biological experiments, more specifically that ones concerned to the health field, it is very common that data structure shows in its experimental units some dependency (longitudinal data), therefore we should not consider only data variability, but also the covariance structure involved. In this research, we have used two group of rats, in which one of them was induced to Aortic Stenosis (EAo) by placing a silver clip in ascending aortic root and another was only submitted to surgery process named Control (Sham). Both of groups have been to two different diets (Normolipidic and Hiperlipidic), wherein we evaluated responses of mechanical variables developed tension (DT) and resting tension (RT), according to the isolated papillary muscle's technique with seven concentrations of calcium in order to appreciate the process of Cardiac Remodeling. At first, we have been interested in to compare means in the groups constituted by the combination of two factors that resulted in four groups (G1 - EAo and normolipidic ($n = 12$), G2 - EAo and hiperlipidic

($n = 13$), Sham and normolipidic ($n = 13$) and G4 - Sham and hyperlipidic ($n = 14$) about the two involved variables to verify differences in two factors effects and in their interaction, applying multivariate linear model (MLM) for this. In addition, we have concerned in to describe mechanical responses mean profile in different calcium concentrations (0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM, 3,0 mM, 3,5 mM) applying the multivariate growth linear model (MGLM) via Potthoff & Roy (1964) proposal to estimate the functional relationship of mechanical variables and calcium concentrations, which have considered the response vector set by seven different measures. In respect to the functional model proposal of biological phenomenon response, we have considered previous researches which suggest that functional responses of TD and TR variables are not properly predicted at original calcium concentrations, thus indicating the need of concentration values transformation in order to reach a relational model more compatible with this data. Regarding this consideration, we have adopted some new non-conventional polynomials (calcium concentration square root, inverse of the calcium concentration, inverse of calcium concentration square root, natural logarithm of calcium concentration addition to the unit and inverse of the natural logarithm of the calcium concentration addition to the unit) and they were tested in order to evaluate the polynomial degree to be used, as a response to MGLM, in the search for the simplest and most informative model which can explain the studied variables. The most adequate transformations to describe the behaviour of TD and TR variables were that ones which involved inverse of calcium concentration and inverse of natural logarithm of calcium concentration added to the unity. Fitted models indicated that second degree polynomial was more informative and concise among all tested to represent the functional relation of mechanical variable TD, as first degree polynomial described better the variable TR. When we applied MLM, differences in mean responses to surgery at TR variable were observed between analyzed groups. In regards to MLMC, differences in TR variable mean profiles were observed and it was possible to find some differences in TD variable mean profiles. Therefore, polynomial family which can best predict the behaviour of TD and TR,

at different levels of calcium concentration, consists in inverse of calcium concentration and inverse of natural logarithm of calcium concentration added to the unity. In respect to the adequacy, most informative model to describe biological response of mechanical variables were first degree polynomial in inverse of calcium concentration for TR variable and second degree polynomial in inverse of natural logarithm of calcium concentration added to the unity to express TD variable.

1 INTRODUÇÃO

A remodelação cardíaca, segundo Mendes et al. (2010), tem como definição as alterações ocorridas na expressão gênica, moleculares, celulares ou intersticiais, que clinicamente se caracterizam por modificações no tamanho, massa, volume e função do coração, em resposta a uma agressão ocorrida (isquemia, inflamação, alteração genética e sobrecarga volumétrica).

A existência de associação entre as variáveis respostas ocorre em quase a totalidade das situações em que são consideradas, simultaneamente, várias medidas no mesmo indivíduo (unidade experimental ou observacional).

Exemplo disto ocorre em pesquisas de remodelação cardíaca quando se incluem a manobra de cálcio, pois a mesma unidade experimental é submetida a doses acumulativas e sequenciais, configurando, assim, uma estrutura correlacional entre as respostas das variáveis biológicas estudadas nas diferentes concentrações.

Entretanto, praticamente a totalidade dessas pesquisas experimentais tratam os dados como modelo univariado de resposta para representar o fenômeno biológico, ou seja, irrelevam a relação de dependência existente, e analisam cada uma das variáveis separadamente sem levar em consideração a estrutura de correlação existente entre as mesmas.

Sabe-se pela literatura estatística que as técnicas de análise multivariada são as mais adequadas e consistentes para essas situações experimentais, pois permitem levar em consideração a estrutura completa de dependência (correlação) existente possibilitando examinar as variações intra e inter unidades de observação.

Na presente pesquisa, técnicas estatísticas mais robustas devem ser empregadas, já que objetiva-se o refinamento das informações e vigorosas conclusões

acerca da manobra de cálcio nas diferentes dietas e nos procedimentos cirúrgicos para as funções mecânicas. Torna-se imprescindível utilizar, neste sentido, procedimentos de análise multivariada exploratória e inferencial para melhorar a qualidade da informação biológica contida nos dados, pois esses consideram para maior conhecimento da realidade biológica a estrutura total de variabilidade dos dados.

Neste estudo, foram utilizados dados de um experimento com quatro grupos de animais formados pela combinação de dois fatores com dois níveis qualitativos cada um, medidos de forma longitudinal em sete diferentes concentrações de cálcio, obtendo como resposta as variáveis funcionais associadas ao processo de remodelação cardíaca dos animais (tensão desenvolvida - TD e tensão de repouso - TR).

O uso de dados longitudinais nos fornece informação acerca do comportamento das variáveis nos diferentes momentos avaliados levando-se em consideração a estrutura de variabilidade conjunta.

De acordo com o desempenho observado nas variáveis respostas TD e TR, há indicativos que o emprego de modelos polinomiais de crescimento sejam os mais adequados para descrevê-las.

Diante desse contexto, alguns modelos que envolvem curvas de crescimento expressas em funções polinomiais são avaliados. Para comparar os perfis médios de respostas das variáveis TD e TR em função do esquema de dois fatores no estudo longitudinal da manobra sequencial de cálcio será aplicada a análise de variância multivariada (MANOVA) e, a proposta desenvolvida por Potthoff & Roy (1964) para a construção das curvas dos perfis médios de resposta dos diferentes grupos (GMANOVA).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Estudos realizados na área da saúde, tanto experimental como observacional (clínica), dependem de procedimentos estatísticos que aplicam técnicas de amostragem, de planejamento de experimento, de estatística descritiva e de procedimentos inferenciais para situações práticas que envolvam uma única variável (univariada) ou muitas variáveis (multivariada). Em um primeiro momento são abordados artigos relacionados à área da saúde em que a análise estatística é empregada de forma univariada (sem procedimentos que envolvam técnicas multivariadas), e posteriormente trabalhos que aplicaram a análise estatística multivariada.

2.1 Ciências da Saúde

Zornoff & Spadaro (1997) avaliam os efeitos dos medicamentos e terapias no tratamento da remodelação ventricular (RV) após o infarto agudo do miocárdio (IAM). A RV são alterações complexas ocorridas na estrutura do ventrículo em decorrência ao IAM, podendo essas alterações ser no tamanho, na massa e na geometria ventricular. A região infartada apresenta células inflamatórias e edemas; sequencialmente há a substituição do tecido necrótico pelo tecido fibroso responsável pela cicatrização. Em decorrência desse processo, observa-se que esta região está mais suscetível a deformações. Posteriormente, ocorrem complicações como a expansão do infarto, que distorce a cavidade ventricular e, a extensão, que faz com que novos focos da necrose apareçam em áreas não afetadas anteriormente. A expansão do infarto acarreta a dilatação do ventrículo esquerdo na fase aguda. Ocorre a hipertrofia dos ventrículos e a dilatação cavitária tardia como consequência das novas

situações de carga. A análise da mecânica do processo de RV detecta mudanças nas funções sistólicas e diastólicas, tendo o aumento da área cardíaca, a ruptura ventricular, a formação de aneurismas, as arritmias e a piora funcional como as principais consequências associadas a este processo.

Cohn et al. (2000) definem a remodelação cardíaca (RC) como mudanças moleculares, celulares e intersticiais que se manifestam clinicamente por alterações no tamanho, forma e função do coração. A RC no ventrículo esquerdo inicia-se nas primeiras horas após o infarto e a sua duração e magnitude podem ser influenciadas pela gravidade e tamanho do infarto. Na fase inicial, a área necrosada do coração cicatriza e o volume do ventrículo esquerdo aumenta, podendo tais mudanças interferir de forma negativa na função cardíaca. Como principais mudanças celulares, há hipertrofia de miócitos, necrose, apoptose, fibrose, colágeno fibrilar aumentado e proliferação de fibroblastos. Em decorrência da RC, há também alterações nas cargas hemodinâmicas e na ativação neuro-hormonal responsável pelas mudanças compensatórias em resposta à queda do débito cardíaco. Para identificar a disfunção do ventrículo é utilizado o exame ecocardiográfico ou a imagem de radionuclídeos que avaliam a fração de ejeção, importante para orientar o início do tratamento. Os autores indicam que o uso de agentes terapêuticos como os vasodilatadores, os medicamentos inotrópicos positivos, os inibidores da enzima conversora da angiotensina e os betabloqueadores modificam positivamente vários parâmetros do processo de remodelação e trazem benefícios, clinicamente, relevantes na redução da morbidade e da mortalidade em pacientes com insuficiência cardíaca. Porém, ainda há a necessidade do desenvolvimento de tratamentos mais específicos para a reversão das anormalidades estruturais no ventrículo esquerdo.

Com o objetivo de determinar os efeitos das dietas ricas em ácidos graxos saturados e poliinsaturados nas vias metabólicas e a relação de deslocamento metabólico e estresse oxidativo no tecido cardíaco, Diniz et al. (2004) utilizam 30 ratos *Wistar* machos em três diferentes dietas: baixo teor de gordura (controle), rica em ácidos graxos saturados (SFA) ou rica em ácidos graxos poliinsaturados

(PUFA). Após cinco semanas de tratamento, foram medidas proteínas, glicogênio, triacilglicerol, lactato desidrogenase, citrato sintase, beta-hidroxiacil-coenzima-A desidrogenase, catalase, glutathiona peroxidase, superóxido dismutase, lipoperóxido e hidroperóxido lipídico no tecido cardíaco. A partir do procedimento estatístico da técnica da análise de variância realizada variável a variável e do teste complementar de Tukey para comparação das médias dos grupos de tratamento, concluiu-se que o grupo PUFA é o recomendado como medida terapêutica na medicina preventiva para diminuir o colesterol, mas ele aumenta o estresse oxidativo no coração, proporcionando suscetibilidade cardíaca à lipoperoxidação com deslocamento da via metabólica para a produção de energia. Contudo, a dieta controle produz melhores resultados clínicos, melhor perfil de gordura e menos estresse oxidativo do que as dietas ricas em ácidos graxos.

Mozaffari et al. (2006) estudam os efeitos da ingestão de sal e gorduras saturadas na função miocárdica e no tamanho do infarto causado em ratos machos *Wistar-Kyoto*. Estes animais foram divididos em quatro grupos de acordo com a dieta que receberam: gorda basal (controle), rica em gordura (FAT), básica em gordura e sal elevado (SAL) e rica em gordura e alto teor de sal (FATSALT). Após cinco semanas de ingestão das dietas, aplica-se a técnica de análise de variância univariada com um fator (ANOVA) e o teste *post-hoc* de Duncan, verifica-se que o ganho de peso corporal é significativamente maior para os grupos FAT e FATSALT. Já o tamanho do infarto é reduzido no grupo SAL. O grupo FATSALT apresenta uma deterioração mais acentuada na função contrátil após a lesão de isquemia-reperfusão que os demais grupos.

Muniz et al. (2006) utilizam 93 pacientes portadores da doença arterial coronariana (DAC) e 108 pacientes sem a doença para analisar a prevalência do polimorfismo C677T do gene metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR). Há interesse também em avaliar a associação da concentração plasmática de homocisteína plasmática na DAC. Como variáveis de interesse, são considerados os perfis lipídicos, as concentrações plasmáticas de homocisteína, o folato e a genotipagem dos animais

em ambos os grupos. Para a avaliação da homogeneidade são empregados os testes qui-quadrado e o t de Student para amostras independentes. O intervalo de confiança de Bonferroni é utilizado para comparar os grupos nas diferentes variáveis e o teste bilateral de Fisher para associar MTHFR e homocisteína. Os resultados das análises univariadas detectam que os grupos não diferem quanto ao perfil genético do polimorfismo. Para as concentrações plasmáticas de homocisteína e de folato, os grupos são estatisticamente diferentes, porém, estas variações não podem ser atribuídas ao polimorfismo C677T do gene MTHFR.

Bregagnollo et al. (2007) em um estudo experimental analisam a contribuição relativa das modificações na geometria da cavidade do ventrículo esquerdo (VE), as alterações morfológicas e a contratilidade miocárdica que ocorrem na fase de transição da hipertrofia compensada para a insuficiência cardíaca congestiva (ICC) em ratos com hipertrofia ventricular esquerda induzida por sobrecarga pressórica desencadeada por estenose aórtica supraavalvar (EAS). Este estudo ocorreu em dois momentos, sendo o primeiro com dois grupos, um submetido a cirurgia simulada (GC) e outro que realizou a EAS (GE), com ambos submetendo-se a avaliações ecocardiográficas, hemodinâmicas e morfológicas. A comparação desses dois grupos é realizada pelo teste t de Student para amostras independentes, o qual identificou diferença significativa nas variáveis, porém, nenhum animal apresentou ICC. Após 21 semanas do início do experimento (segundo momento), o grupo GC continuou no estudo, porém o grupo GE foi subdividido em não portadores (GE) ou portadores de insuficiência cardíaca congestiva (GE-IC) e avaliados, clinicamente, por meio de exames ecocardiográficos, hemodinâmicos, morfológicos e mecânicos dos músculos papilares isolados do VE. Para comparação desses três grupos utiliza-se a técnica da análise de variância, sendo verificado que os grupos GE-IC e GE diferem na remodelação geométrica do VE; o grupo GE, quanto à estrutura do miocárdio, apresenta um estado cronicamente compensado e a ICC aparece adiantada no grupo GE-IC. Foi possível concluir que a fase de transição da hipertrofia compensada para a ICC está associada ao remodelamento geométrico adverso do VE e estrutural do miocárdio.

Vale evidenciar que, neste estudo, o teste t de *Student* é realizado para cada uma das variáveis independentes individualmente, o que não é aconselhado por Oshiiwa & Padovani (2002), pois, quando há interesse em obter conclusão conjunta para duas ou mais variáveis, indicam-se a aplicação de procedimentos que envolvam a análise multivariada por esta considerar o nível de significância conjunto diferente do que ocorre na conclusão conjunta de várias análises univariadas.

Com interesse na prevenção e tratamento da insuficiência cardíaca, Denipote et al. (2009) realizam um estudo de revisão a fim de avaliar a influência da taurina (aminoácido livre, abundante no meio intracelular, principalmente no músculo esquelético, no músculo cardíaco e cérebro) no processo de remodelação cardíaca (RC). Sabe-se que a RC tem por objetivo manter a função cardíaca estável nas situações de agressão e que pode resultar em alguns casos na disfunção ventricular progressiva, conseqüentemente, levar à morte. A revisão mostra que a redução das concentrações de taurina resultam em importantes modificações cardiovasculares e que a sua suplementação suavizou o processo de remodelação. Há também indicativos em relação ao mecanismo de atuação da taurina que consiste em: excretar sódio e água, modulador de íons relevantes para o funcionamento normal da célula cardíaca, proteger as membranas lipossômicas contra danos causados por radicais livres e ação antagonista da angiotensina II.

Mendes et al. (2010) estudam a estenose aórtica supraavalvar (EAo) a fim de caracterizar as modificações morfofuncionais ocorridas durante a remodelação cardíaca por sobrecarga pressórica e buscam identificar o índice mais sensível para detecção do aparecimento da disfunção diastólica e sistólica no ventrículo esquerdo. Para isso, utilizam dois grupos de ratos *Wistar* separados em controle (GC, $n = 13$) e EAo ($n = 24$) avaliados na 3^a, 6^a, 12^a e 18^a semanas após a cirurgia por meio do ecocardiograma. Os resultados dos testes estatísticos t de Student ou de Mann-Whitney mostram que os ratos submetidos a EAo apresentam hipertrofia concêntrica, disfunção diastólica precoce e melhoria na função sistólica. Já os índices mais sensíveis para a detecção da disfunção diastólica e sistólica, obtidos por meio

do ecocardiograma, são a relação entre a onda E e onda A(E/A) e a porcentagem de encurtamento endocárdico. Neste estudo, o delineamento experimental foi realizado considerando o mesmo animal avaliado em quatro momentos consecutivos, caracterizando o modelo de medidas repetidas, situação que não foi considerado quando da realização do procedimento de análise estatística.

Com a preocupação relacionada ao uso de betabloqueadores associados ao treinamento físico no tratamento de camundongos com insuficiência cardíaca, Vanzelli et al. (2010) utilizam camundongos machos ($n = 35$) da linhagem *C57/BL6* divididos em: sedentários (S), treinados (T) e tratados com os betabloqueadores Metoprolol (M) ou Carvedilol (C). Em um segundo momento, quando já se sabia o efeito isolado de cada um dos tratamentos, avaliaram-se as terapias associadas com os animais subdivididos aleatoriamente em novos grupos: sedentário (S), treinado e tratado com metoprolol (MT) e treinado e tratado com carvedilol (CT). Durante oito semanas, os animais realizaram o treinamento físico em esteira. O procedimento estatístico da técnica da ANOVA foi aplicado a cada uma das variáveis. As variáveis analisadas foram: tolerância ao esforço, fração de encurtamento (FE), diâmetro dos cardiomiócitos e a fração de colágeno. Como resultado da fase inicial, têm-se que os grupos T, M e C apresentam melhora na FE e na remodelação cardíaca. Na segunda etapa do estudo, verifica-se o aumento da tolerância ao esforço, a redução do diâmetro dos cardiomiócitos e da fração de colágeno nos grupos MT e CT, já a FE apresenta melhora significativa no grupo CT.

Com interesse em investigar o efeito da alimentação com hidroxietil metil celulose (HEMC) e suas diferentes viscosidades (alta, moderada ou baixa) no peso corporal e no metabolismo lipídico de ratos alimentados com alto teor de gordura, Ban et al. (2012) utilizam cinco grupos com diferentes dietas, durante seis semanas, divididos em: controle normal (NC), rica em gordura (HF), dieta rica em gordura suplementada com HEMC com alta viscosidade (HF-HV), moderada (HF-MV) ou baixa (HF-LV). Após esse período, para avaliação dos dados coletados, aplica-se a técnica da ANOVA para o modelo com um fator e as diferenças entre os

pares de médias são avaliadas pelo teste de Duncan. Constatou-se pelos resultados que o HEMC elimina o ganho de peso, reduz a gordura corporal, diminui os níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos nos ratos. Conclui-se, também, que o HEMC de alta viscosidade pode ser útil no gerenciamento de hiperlipidemia e obesidade.

Rockett et al. (2012) testam os efeitos do ciclo de luz e da dieta em ratos machos. Para isso, os animais foram divididos em três grupos, de acordo com a dieta, denominados: alto teor de gordura (HF), baixo teor gordura (LF) e dieta controle (CD) e com ciclo de luz claro-escuro de 12 horas. Em relação à dieta é avaliado o ganho de peso e, ao ciclo de luz, a atividade locomotora e metabólica (calorimetria indireta, volume do consumo de oxigênio, volume da produção de dióxido de carbono e taxa de troca respiratória). Após o período de três semanas de ingesta das dietas, os animais são colocados, durante quatro dias, em gaiolas a fim de monitorar as atividades motoras e metabólicas nos diferentes ciclos de luz. Utiliza-se a técnica da ANOVA para o modelo com dois fatores, seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni para comparação de médias, no qual observa-se que a dieta HF reduz a atividade locomotora, metabólica e a taxa de troca respiratória em relação a CD. Há um aumento significativo das atividades durante o ciclo escuro em todas as dietas. Não há diferença estatística significativa entre as dietas durante os diferentes ciclos de luz.

Farah et al. (2013) utilizam pacientes com infarto agudo para verificar a existência de influência de diferentes geometrias no processo de remodelação cardíaca. Um grupo inicial com 90 pacientes (apenas 80 concluíram o experimento) foi dividido em quatro grupos segundo o índice de massa e a espessura relativa da parede, ambos do ventrículo esquerdo, que definiram as geometrias: índice de massa normal e espessura relativa normal - Normal (N); índice de massa normal e espessura relativa aumentada - remodelação concêntrica (RC); índice de massa aumentado e espessura relativa aumentada - hipertrofia concêntrica (HC) e índice de massa aumentado e espessura relativa normal - hipertrofia excêntrica (HE). Os pacientes realizam exames clínicos e são submetidos ao ecocardiograma (avaliações morfológicas e funcionais)

no início do estudo e no sexto mês, momento em que recebem alta. As variáveis presentes nos exames clínico e ecocardiográfico são analisadas por meio do teste t de Student ou pelo teste de Mann-Whitney e observa-se que 41 dos 80 pacientes evoluem com a remodelação. Constata-se que a geometria ventricular pode ter impacto no processo de remodelação pós-infarto. A regressão logística múltipla identifica como preditor no processo de remodelação ventricular, o tamanho do infarto e como fator protetor, a hipertrofia excêntrica. Contudo, Paes (2010) salienta a importância de se investigar simultaneamente o efeito das variáveis explicativas na variável resposta, quanto à aplicação fracionada de vários testes estatísticos, já que ao analisar de forma univariada essas variáveis só se estaria sendo considerado o efeito de cada uma das variáveis isoladamente e possivelmente, acarretando vieses na conclusão global.

Sussenbach et al. (2013) têm por objetivo comparar pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio com quadro de angina instável (AI) e sem angina instável. Para tal comparação, é realizado estudo de coorte com 25 variáveis de 2818 pacientes maiores de 18 anos. As análises estatísticas, incluindo o teste qui-quadrado, a técnica da análise de variância, o teste t de Student seguido de teste de Bonferroni e a regressão logística múltipla são aplicadas. A análise univariada mostra que os pacientes do sexo feminino são predominantes entre os pacientes com AI, utilizam mais balões intra-aórtico (BIA) e medicações, porém, apresentam menor necessidade do uso de diuréticos se comparado aos pacientes sem angina instável. Vale ressaltar que no estudo realizado por Leão et al. (2009), o qual compara a análise univariada à multivariada, percebe-se diferença nos resultados obtidos nas duas análises. Os autores justificam que a diferença encontrada deve-se ao fato de não se levar em consideração, na análise univariada, a correlação existente entre as variáveis do modelo. A análise regressão logística constata que os pacientes com AI no pré-operatório da cirurgia de revascularização do miocárdio são também, em sua maioria, do sexo feminino, fazem uso de mais medicamentos e necessitam de menos diureticoterapia, porém, apresentam maior número de pacientes com necessidade de monitorização com cateter de *Swan-Ganz* e suporte para o BIA.

Com o objetivo de suprir a falta de dados e informações a respeito de convulsões após cirurgia cardíaca, Sharma et al. (2014) utilizam dados coletados de 11529 pacientes. Considerando este conjunto de dados, empregam-se a análise de regressão múltipla para selecionar os possíveis preditores das convulsões pós-operatórias. Identificam-se as seguintes variáveis: idade, sexo, cirurgia cardíaca refratária, calcificação da aorta ascendente, insuficiência cardíaca congestiva, parada circulatória hipotérmica profunda, duração do agrafo aórtico e ácido tranexâmico como fatores preditores da convulsão pós-operatória. Ademais, conclui-se, também, que a única variável que pode ser modificada é a dose administrada de ácido tranexâmico.

Com a carência de estudos acerca de quais parâmetros devem ser usados para prever a imagem obtida em angiotomografia computadorizada cardíaca (ATCC), Staniak et al. (2014) analisam a medida da espessura do tecido subcutâneo como preditor de artefato de imagem ATCC em 86 pacientes por meio de modelo de regressão linear múltipla a fim de identificar o melhor modelo preditivo para estimar o artefato de ATCC. Utiliza-se, também, a correlação linear de Pearson para avaliar associação de preditores e artefato de imagem. Todos os parâmetros analisados no estudo são avaliados de forma univariada e mostram-se, significativamente, associados ao artefato na ATCC. A regressão linear múltipla considera como melhor modelo preditivo o que inclui a variável artefato do escore de cálcio e espessura do tecido subcutâneo (R^2 ajustado = 0,61).

Com o intuito de realizar uma revisão sobre remodelação cardíaca (RC), Azevedo et al. (2015) indicam a RC como sendo mudanças ocorridas no coração sejam elas moleculares, celulares ou intersticiais. Porém, nos dias de hoje, a RC caracteriza-se pelo aumento gradual que ocorre na cavidade ventricular esquerda em modelo de infarto experimental utilizando ratos. Clinicamente, a RC pode ser detectada por meio de ecocardiograma, ventriculografia e ressonância nuclear magnética, com os quais identificam-se as alterações no diâmetro da cavidade, na massa, na geometria, nas áreas com cicatriz, na fibrose e no infiltrado inflamatório. Também

é possível diagnosticar a RC com o uso de marcadores celulares. Como principais implicações clínicas relacionadas ao processo da remodelação tem-se: as disfunções cardíacas, as arritmias e as complicações do infarto do miocárdio. Os fármacos possibilitam o tratamento da remodelação cardíaca em três estágios:

1. Estratégias Consolidadas, que utilizam inibidores da enzima conversora da angiotensina, betabloqueadores e antagonistas da aldosterona que conseguem diminuir o processo da remodelação em diferentes modelos experimentais.
2. Estratégias Promissoras, que apresentam evidências capazes de diminuir a dilatação da cavidade e da fibrose miocárdica utilizando o composto LCZ696.
3. Estratégias Potenciais, que têm como principal alvo de estudo a morte celular, que pode ser diminuída por meio da administração de: ciclosporina A, neuregulina - 1, necrostatina - 1, torasemida, metformina, CXL-1020. Como resultado da administração desses medicamentos, ocorre: atenuação da apoptose, controle da degradação proteica, melhora funcional em decorrência da atenuação da hipertrofia, modulação do processo inflamatório, entre outros.

Kaplan et al. (2017) realizam um estudo de coorte transversal com indivíduos tsimane (população indígena que vive em florestas ao norte da Bolívia que tem o estilo de vida de subsistência) de idade igual ou superior a 40 anos com o objetivo de compreender a associação entre o estilo de vida pré-industrial desta população e a baixa prevalência de fatores de risco de doença arterial coronariana presentes na mesma. Coletou-se a pontuação de cálcio da artéria coronária (CAC), os lipídeos sanguíneos e os biomarcadores inflamatórios. Para verificar a associação entre os possíveis fatores de risco da doença e os escores apresentados pelos tsimanes é ajustado um modelo de regressão múltipla binomial negativo inflacionada de zero. Como resultado têm-se que os tsimanes apresentam alta carga inflamatória infecciosa, porém, exibem os menores níveis de doença arterial coronariana relatados em qualquer população. Tal fato se dá pelos tsimanes apresentarem LDL (*Low Density*

Lipoproteins) muito baixo, baixa pressão arterial, baixo nível de glicose, índice de massa corporal normal, não fumarem e praticarem muita atividade física.

2.2 Estatística Multivariada aplicada à Ciência da Saúde

A Estatística Multivariada está sendo muito bem aceita e aplicada nas mais variadas áreas do conhecimento, devido aos avanços computacionais ocorridos nas últimas décadas e ao interesse de estudar simultaneamente as relações entre muitas variáveis. Com isso a manipulação e análise de grandes conjuntos de dados e também os problemas que envolvam muitas variáveis não mais constituem desafios para os pesquisadores.

A utilização da estatística multivariada na área biológica, mais especificamente na área da saúde envolvendo pesquisas experimentais e observacionais, vem da necessidade de estudos em que haja interesse em analisar simultaneamente um grande número de variáveis e que seja levada em consideração toda a estrutura de variabilidade dos dados. Neste sentido, apresentam-se, a seguir, artigos que envolvem procedimentos estatísticos multivariados relacionados à área da saúde.

Silva & Viana (1987) salientam que estudos relacionados a variáveis ecocardiográficas usualmente são realizados de forma independente, não avaliando simultaneamente todas as variáveis, dificultando assim, uma melhor definição do dano cardíaco. Sob esta consideração, os autores analisam 12 variáveis ecocardiográficas (anatômicas e funcionais) do ventrículo esquerdo de pacientes com hipertensão arterial ($n = 42$) e de pacientes considerados controle ($n = 32$) com o objetivo de verificar associação entre as variáveis ecocardiográficas com os aspectos clínicos de cada grupo e, assim, compreender melhor a informação simultânea contida nas mesmas. A análise de componentes principais (ACP) é aplicada com a finalidade de selecionar um número menor de variáveis ecocardiográficas, capaz de caracterizar cada um dos grupos do estudo, tendo como resultado a seleção de apenas duas variáveis anatômicas e duas funcionais frente às 12 variáveis iniciais dos estudo. Os dados das quatro variáveis selecionadas são utilizados em uma análise discriminante

linear que constrói uma regra de classificação, neste caso, com probabilidades iguais de classificação em ambos os grupos, que resulta com erro de classificação de 9,4% nos controles classificados como tendo hipertensão arterial e 7,1% dos hipertensos classificados sem doença cardíaca. Com a análise simultânea das quatro medidas ecocardiográficas selecionadas pela ACP, são definidos cinco subgrupos de acometimento cardíaco em pacientes com hipertensão arterial, um com cada subtipo anatômico e características ecocardiográficas funcionais diferentes, destacando que pacientes com hipertensão arterial apresentam diferentes combinações de alterações anatômicas e funcionais cardíacas.

Milani et al. (1989) evidenciam a importância de dois momentos na construção de um modelo de dados longitudinais; o primeiro diz respeito a escolha da função matemática a ser empregada para descrever o processo de crescimento, e o segundo é a obtenção das estimativas das constantes de crescimento para os grupos a partir do modelo multivariado de crescimento de Potthoff & Roy (1964), salientando a importância de que todos indivíduos devam ter realizado as medidas nas mesmas ocasiões. Os autores utilizam dados de crescimento (comprimento) de crianças medidos no nascimento e pelo menos cinco vezes no decorrer de oito visitas entre três meses e três anos de vida (3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36 meses de vida). O modelo de dois estágios (etapas) para o crescimento é empregado devido ao fato das crianças não se apresentarem para medições exatamente na idade especificada para coleta de dados. Esse modelo no primeiro estágio consiste em ajustar a curva de crescimento para cada indivíduo e obter essas estimativas; no segundo estágio são obtidas as estimativas das constantes do grupo de indivíduos a partir das médias ponderadas das estimativas do primeiro estágio. Para o primeiro estágio testam-se os seguintes modelos: Jenns-Bayley, não-linear de quatro constantes com um componente exponencial, de contagem, linear de três constantes com um componente logarítmico e o modelo linear com três constantes. Para o 2^o estágio empregaram-se modelos com informação sobre as covariâncias. Como resultado do estudo, percebe-se que a falta de ajuste aumenta consideravelmente devido a inconsistência nas primeiras medições

sendo maior nos meninos, e também pode-se perceber que nenhuma função com três constantes é adequada para descrever o crescimento nas primeiras semanas de vida das crianças.

Macieira-Coelho et al. (1990) têm por objetivo desenvolver um protocolo para diagnosticar a presença ou ausência da doença coronária em doentes ambulatoriais com dor precordial. A função discriminante linear de Fisher por meio da técnica multivariada da análise de discriminante (AD) é utilizada nas informações clínicas e nas obtidas pelo ergômetro (teste de esforço) em 113 indivíduos. A coronariografia é usada a fim de identificar a presença da doença nos pacientes. A AD constrói uma função linear com apenas quatro variáveis clínicas (sexo, idade, fatores de risco, dor precordial) e quatro variáveis de esforço (depressão do ST, arritmias, dor precordial, variação da pressão arterial) capaz de detectar a presença da doença com sensibilidade de 95%.

Nadal & Panerai (1990) aplicam a análise de componentes principais (ACP) para a classificação de arritmias. Com as informações de 32 pacientes obtidos do *MIT-BIH* (base de dados de arritmia) e 200 segmentos de eletrocardiograma contendo onda P e o complexo QRS, que são considerados padrões representativos de diferentes tipos de batimentos cardíacos, aplica-se a ACP que seleciona 10 componentes principais que representam 99,2% da variabilidade total do conjunto de sinais. O gráfico dos dois primeiros componentes é capaz de separar complexos distintos.

Souza & Iemma (1990) estudam dados longitudinais incompletos em curvas de crescimento com resíduos autocorrelacionados. O modelo apresentado por Kleimbaum, que é uma generalização do modelo proposto por Potthoff & Roy (1964), possibilita que o conjunto de dados apresente observações faltantes. Sendo assim, os autores utilizaram medidas do comprimento de 57 crianças (29 feminino e 28 masculino) nascidas aos 280 dias de gestação com peso inferior a 2500g, medidas essas realizadas aos 2, 3, 4, 5 e 6 meses, e definiram três situações a serem avaliadas: a primeira com as 57 unidades experimentais completas (MLMC-57), a segunda conta com 17 unidades experimentais completas no delineamento incompleto (MLMC-17),

ou seja, com observações faltantes e a terceira com todas observações do delineamento incompleto considerando um modelo AR(1) (MLMCG-AR(1)). Os modelos são construídos para cada um dos sexos, e um modelo polinomial de grau dois é o selecionado para descrever o comportamento dos dados para as três situações. Assim se conclui, que as estimativas dos parâmetros polinomiais do modelo MLMCG-AR(1) são mais próximas do MLMC-57, e espera-se que essa estimativa seja fidedigna já que contém maior quantidade de dados.

Schneiderman & Kowalski (1994) objetivam viabilizar estratégias e programas computacionais para o correto emprego da análise de dados longitudinais. Os autores propõem programas que possam estimar as curvas de crescimento médio e gerar polinômios ortogonais quando os dados não são igualmente espaçados, imputar dados ausentes, prever valores para situações futuras, classificar novos indivíduos segundo as curvas de crescimento e testar hipóteses. Para verificação da aplicabilidade das estratégias e programas são utilizados dados associados ao crescimento maxilar do macaco rhesus dos sexos masculino e feminino com medições realizadas em intervalos de meio ano (0,5) a partir de 0,5 a 10 anos de idade, com dados faltantes para o ajuste das curvas de crescimento polinomial aplica-se a proposta multivariada de Potthoff & Roy (1964) que indica um polinômios de grau 3 e também a existência de paralelismo entre as curvas dos diferentes sexos.

Ribeiro et al. (2003) realizam um estudo para descrever evolutivamente características de ratos *Wistar* jovens com hipertrofia ventricular esquerda (HVE) induzida por estenose aórtica supralvar (EAo). Os 24 ratos experimentais são divididos em dois grupos (Controle e EAo) e submetidos ao ecocardiograma para avaliar a função cardíaca após 6, 12 e 21 semanas da cirurgia. Há também a avaliação morfológica e bioquímica (dosagem de hidroxiprolina) após esse período em ambos os grupos. Para avaliação das variáveis morfométricas e da concentração miocárdica de hidroxiprolina foi utilizada a técnica da análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de comparações múltiplas de *Tukey*. Já os resultados obtidos no ecocardiograma foram analisados pela técnica da análise de variância multivari-

ada dos perfis de respostas dos grupos (MANOVA) complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os animais do grupo EAo apresentam desenvolvimento precoce da HVE concêntrica, piora na disfunção diastólica a partir de 12^a semana e fibrose miocárdica. Já a redução do desempenho ventricular sistólico, ocorre após 21 semanas da indução da EAo.

Coelho et al. (2005) analisam o perfil lipídico (níveis séricos de colesterol total, fração de colesterol das lipoproteínas de baixa, alta e muito baixa densidade e triglicérides) e a sua correlação com os fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV) em 153 estudantes de medicina. Sendo, também, coletadas informações acerca de hábitos de vida e medidas antropométricas dos estudantes. Para a análise estatística dos dados consideram-se os testes de Mann-Whitney, qui-quadrado, a correlação linear de Pearson e a técnica multivariada da análise de componentes principais (ACP). Utiliza-se a técnica dos componentes principais para verificar quanto os antecedentes familiares para DCV, sedentarismo, uso de anticoncepcionais, ingestão de álcool, dislipidemia e IMC mostram-se associados ao perfil lipídico. Constata-se, por meio da estatística univariada, níveis mais elevados de LDL e reduzidos de HDL no sexo masculino.

Fukuoka et al. (2007) empregam a técnica multivariada da análise de agrupamento (AA) para identificar subgrupos de pacientes com base nos sintomas cardíacos após eventos cardíacos (infarto agudo do miocárdio (IAM) e/ou cirurgia de revascularização miocárdica (CABG)), assim avaliando se esses subgrupos apresentam diferenças na qualidade de vida e na dificuldade psicológica. Após um ano da ocorrência do evento cardíaco, uma amostra de 206 pacientes idosos (≥ 65 anos) foi obtida e esses responderam sobre alguns sintomas, como: dor, falta de ar, fadiga, palpitações, distúrbios do sono e náuseas. A AA com a abordagem hierárquica utilizando a distância euclidiana ao quadrado e o método agrupamento da ligação média não ponderada, com dois critérios de parada (índice de Calinski-Harabasz e o índice de Duda/Hart $Je(2)/Je(1)$) para seleção do número ótimo de grupos, obtém como resultado três grupos distintos identificados como: cansado (19,4%), sintoma difuso

(68,4%) e com dificuldade na respiração (12,2%). Diante dos resultados da AA, é possível realizar um tratamento mais específico para os grupos a fim de melhorar seus sintomas clínicos.

Franceschini et al. (2013) realizam um estudo transversal em uma amostra de 50 pacientes portadores de câncer no pulmão com o objetivo de identificar grupos de pacientes pautado na magnitude dos sintomas e posteriormente comparar os grupos obtidos quanto à qualidade de vida. Todos os pacientes são avaliados por três questionários (EORTC QLQ-C30, FACT-L e SF-36) a fim de aumentar o poder discriminativo dos dados para a aplicação da técnica da análise de agrupamento (AA). A AA hierárquica, com a utilização da distância euclidiana ao quadrado e o método aglomerativo do vizinho mais distante, é empregada e obtêm-se três agrupamentos (subgrupos) divididos em sintomas: leves, moderados e graves quanto aos sintomas. O subgrupo de pacientes com sintomas graves é considerado como sendo o de pior qualidade de vida.

Oliveira-Junior et al. (2013) analisam a relação existente entre macronutrientes ingeridos por ratos com obesidade por meio da análise nutricional (peso corporal e adiposidade) e de parâmetros metabólicos, hormonais e cardiovasculares, considerando ratos normotensos *Wistar - Kyoto* sob administração de dietas controle (CD, 3,2kcal/g) e hipercalórica (HD, 4,6kcal/g) por 20 semanas. A técnica multivariada da análise de correlação canônica verifica que a adiposidade do corpo dos ratos está fortemente associada a efeitos cardiovasculares, enquanto o consumo de lipídeos não saturados está inversamente correlacionado a esses efeitos.

A partir de avaliações antropométricas, de bioimpedância elétrica e análise vetorial de pacientes do sexo masculino, Soares et al. (2013) comparam a composição corporal de pacientes com doença renal crônica em hemodiálise com indivíduos saudáveis. A comparação dos grupos é realizada de forma univariada e multivariada com a utilização da estatística F e T^2 de Hotelling, respectivamente. Tanto a estatística F quanto o T^2 Hotelling indicam diferença significativa nos dois grupos segundo composição corporal por meio da bioimpedância e análise vetorial, já

nas medidas de circunferência e de área muscular de braço não é possível encontrar diferença significativa.

Assaad et al. (2014) estudam a obesidade em ratos *Sprague-Dawley* com 28 dias de idade submetidos a diferentes dietas: uma com baixo teor de gordura (LF) e outra com alto teor de gordura (HF). O gasto energético dos ratos é medido de hora em hora durante 24 horas. Um modelo de regressão linear é ajustado aos animais de acordo com a dieta ingerida, com o objetivo de prever o ganho de peso nos grupos estudados. Utiliza-se, também, a técnica multivariada da análise de componentes principais (ACP) para a redução das 24 mensurações de cada um dos ratos para cada uma das quatro variáveis consideradas: variáveis RQ (quociente respiratório), HP (produção de calor), VO_2 (volume do consumo de oxigênio) e VCO_2 (volume da produção de dióxido de carbono). Ademais, considera-se o modelo de efeito misto a fim de analisar os dados de tempo sobre o metabolismo (incluindo o gasto de energia) e a análise de agrupamento (AA) para classificar os ratos de acordo com os seus pesos. O modelo de regressão linear múltipla contendo as variáveis independentes ganho inicial de peso corporal durante a primeira semana do estudo (IGW), dieta, HP e RQ é adequadamente ajustado para prever o ganho de peso final dos animais. A AA permite classificar os 32 animais em dois grupos homogêneos, um com 12 dos animais classificados como magros (7 no grupo LF e 5 no grupo HF) e outro com 20 classificados como obesos (9 no grupo LF e 11 no grupo HF), concluindo-se, assim, que os ratos que ingeriram a dieta HF são mais pesados que os ratos alimentados com a dieta LF.

Fonseca et al. (2014) analisam características cardiorrespiratórias de um grupo de 25 voluntários (adultos jovens, não fumantes e saudáveis) a fim de construir grupos homogêneos de indivíduos para criação de um método de avaliação para a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) baseado nas características de cada indivíduo voluntário. A técnica multivariada da análise de agrupamento (AA), tendo como medida de similaridade a distância euclidiana juntamente com o método agrupamento hierárquico aglomerativo, é utilizada para identificar os grupos

semelhantes segundo as variáveis cardiorrespiratórias: intervalo RR, pressão arterial sistólica (PAS), período respiratório, relação inspiração/expiração, volume respiratório de pico, ventilação minuto, espectro de potências para VFC e PAS para a atividade do sistema autonômico simpático (LF) e do sistema parassimpático (HF). A AA corroborou que as diferenças intrínsecas ocorrem nos voluntários, e que os grupos são formados com base nas características comuns.

A fim de construir um algoritmo para formação de grupos de animais homogêneos em pesquisas experimentais, Pinto et al. (2015) desenvolvem um modelo estatístico multivariado utilizando exames ecocardiográficos considerando 31 parâmetros (variáveis biológicas) avaliados em 115 ratos *Wistar* machos submetidos à indução da estenose aórtica supravalvar. Com o emprego da técnica multivariada da análise de componentes principais (ACP), reduz-se o espaço paramétrico dos dados em oito eixos principais que retêm 88,71% de variabilidade acumulada nas variáveis ecocardiográficas. A ACP estabelece um novo sistema cartesiano onde são alocados os 115 animais e, posteriormente, constrói-se um elipsóide correspondente à região de confiança para o perfil homogêneo dos animais que possibilita a constatação de que seis animais são espúrios (*outliers*) para a formação de grupo homogêneo.

Baldan et al. (2016) investigam a eficácia da estratégia saúde da família (ESF) no tratamento diretamente observado (TDO) para o controle do abandono de tratamento para pacientes com tuberculose (TB) em 66 municípios do Mato Grosso do Sul, tendo como variáveis: o coeficiente de incidência de tuberculose (CI-TB), o percentual de cobertura por ESF, o percentual de abandono de tratamento e o percentual de oferta de TDO. A técnica da análise de agrupamento (AA), utilizando a distância euclidiana para medir a semelhança entre os municípios, seguida do método de ligação hierárquico de Ward, é empregada a fim de identificar grupos semelhantes de municípios quanto às características relacionadas a TB. Também são aplicadas técnicas de geoprocessamento para visualizar a distribuição dos grupos por meio de mapa temático. Como resultado da AA pode-se observar que há grupos de municípios nos quais a cobertura por ESF e TDO contribui para a adesão ao tratamento e

controle de casos de TB, já em outros municípios estas medidas não têm sido eficazes para a redução do CI-TB e do abandono ao tratamento. No mapa temático pode-se observar que a doença se distribui de forma heterogênea no estado.

Drozdová et al. (2016) utilizam parâmetros bioelétricos e propriedades elétricas dos tecidos de pacientes do sexo feminino separados em dois grupos, um com doenças cardiovasculares (com CDV $n = 254$) e outro sem doenças cardiovasculares (sem CDV, $n = 318$). As idades também são coletadas para se realizar o ajuste do modelo de regressão linear seguido da técnica da análise de variância (ANOVA). Após a realização da ANOVA, como resultado obtêm-se diferenças significativas nas características da composição corporal das mulheres de acordo com as suas idades. Para a comparação de grupos aplica-se o teste U de Mann-Whitney (univariado) e o teste T^2 de Hotelling (multivariado) que identificam as propriedades elétricas de tecido significativamente diferentes nos grupos de mulheres estudados. Dessa forma, é possível confirmar que as complicações da doença cardiovascular estão fortemente associadas às mudanças na composição corporal.

Trabalhos relacionados à medicina experimental e clínica usualmente são desenvolvidos com dados que apresentam uma estrutura longitudinal; porém, em muitos destes, a estrutura de dependência longitudinal não é analisada, como destaca Evangelista (2016). A autora estuda a estrutura de dependência em dados longitudinais aplicados a medidas da manobra de cálcio em remodelação cardíaca, considerando 120 ratos *Wistar* machos com 21 dias de idade, submetidos à indução estenose aórtica supraavalvar com a avaliação dos parâmetros funcionais (tensão desenvolvida - TD e tensão de repouso - TR) em diferentes manobras sequenciais de cálcio. A partir dos dados coletados, aplicaram-se procedimentos estatísticos de análise multivariada para estabelecer modelos preditivos para TD e TR em animais com diferentes dietas com a utilização do método de Potthoff & Roy (1964) para curvas de crescimento.

Um grupo de 41 crianças com idades entre 4 e 80 meses, totalizando 78 orelhas, é utilizado para construir grupos de classificação em que são considerados

o grau e a configuração de perdas auditivas. Figueiredo et al. (2016) têm interesse em verificar a existência de relação nos diferentes índices de inteligibilidade de fala (SII). A técnica multivariada da análise de agrupamento (AA), que utiliza o método de agrupamento das k-médias, é empregada para a construção de grupos com limiares auditivos nas frequências 250, 500, 1000, 2000 e 4000 Hz. Depois de definidos os grupos, a partir da AA, uma regra de classificação para novos indivíduos é construída com o emprego da análise de discriminante (AD). A AA apresenta mais sensibilidade para discriminar sujeitos quanto às características audiológicas do que a classificação tradicional utilizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que classifica sujeitos com características audiológicas diferentes pertencentes ao mesmo grau de perda. A AD constrói equações para a classificação da perda auditiva conforme grupos e também equações para a determinação de valores de SII ajustados. O SII tem relação mais forte com a associação das variáveis grau e configuração audiométrica.

As principais morbidades e gastos hospitalares com idosos associados às condições socioeconômicas e demográficas no estado do Paraná são estudadas por Kernkamp et al. (2016), por meio de técnicas de análise de componentes principais (ACP) e análise de agrupamento (AA), para identificar relações de comportamento entre variáveis e formar grupos homogêneos de comportamento em relação às diferentes variáveis consideradas. A ACP considera a matriz inicial formada por 22 linhas, em que cada uma delas representa as regionais de saúde do Paraná e 13 colunas que se referem às variáveis socioeconômicas e demográficas. A AA é realizada na matriz de escores gerados pela ACP. Os resultados mostram que as regiões com maior e menor desenvolvimento econômico e humano apresentam alta prevalência das interações e dos custos relativos às doenças do aparelho circulatório, respiratório e do coração. Já nas regiões com nível de desenvolvimento intermediário, as doenças do sistema nervoso em homens e do aparelho circulatório em mulheres se destacam com relação às morbidades e gastos hospitalares.

Leopoldo et al. (2016) aplicam a análise de agrupamento (AA) para classificar o grau de adiposidade em ratos sedentários alimentados com dois tipos

diferentes de dieta e procuram determinar grupos semelhantes em relação ao nível de adiposidade nesses ratos. Durante 15 semanas, ratos *Wistar* machos com 30 dias de idade são alimentados com uma dieta normal (ND), este grupo com 41 ratos, ou com dieta rica em gordura (HFD), com 43 ratos. Após o período experimental, os animais são eutanasiados por decapitação e coletam-se amostras de sangue. Pela análise sorológica, quantificam-se as seguintes variáveis: glicose, triglicerídeos, colesterol total, ácidos graxos não esterificados, insulina e leptina. Os animais que recebem a HFD e apresentam alterações na adiposidade semelhantes ao grupo ND ficam excluídos do estudo. O mesmo ocorre com os ratos que recebem ND e têm alterações semelhantes ao do grupo HFD. Com o uso de indicadores do grau de adiposidade dos animais, por meio da técnica AA, torna-se possível dividir os ratos que receberam a HFD em grupos com sobrepeso ($n = 22$) e obesos ($n = 9$). Destaca-se que o grupo de obesos apresenta gordura corporal e índice de adiposidade maior do que o do grupo com sobrepeso. O índice de adiposidade do grupo de ratos obesos correlaciona-se positivamente com o peso corporal final, gordura corporal total e níveis de leptina.

Nunes & Casotti (2016) procuram identificar o diagnóstico precoce e a prevenção de doenças crônicas (hipertensão e diabetes) detectando as características e padrões morfológicos dessas doenças em idosos. Das imagens da lateral esquerda do rosto obtêm-se 23 medições da morfometria geométrica de 55 indivíduos, sendo 23 com diabetes, 5 com hipertensão, 14 com ambas as enfermidades e 13 não apresentando alguma das doenças. A técnica multivariada da análise de componentes principais (ACP) é aplicada a fim de reduzir o número de medições da morfometria geométrica. A distância D^2 de Mahalanobis e a técnica de análise de agrupamento (AA), utilizando a métrica UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*) seguida da construção do dendrograma são empregadas a fim de confirmar os resultados obtidos pela ACP. A ACP seleciona as duas primeiras variáveis canônicas que acumulam 85% (62% e 23% respectivamente) da variação total dos indivíduos considerados. Um gráfico das duas primeiras variáveis canônicas é construído e observa-se que os quatro grupos de indivíduos ficam agrupados entre si,

tendo como principal separador de grupos a região auricular. Esses resultados são corroborados pela distância D^2 de Mahalanobis e pela AA. Assim, fica evidente que utilizando a morfometria geométrica lateral esquerda do rosto, identificam-se os idosos pertencentes a grupos diferentes, de modo a estabelecer estratégias distintas de promoção à saúde e ao diagnóstico precoce das doenças.

A partir da técnica de análise vetorial por bioimpedância (BIVA) que obtém a avaliação semiquantitativa do estado de hidratação de pacientes descrita por elipses de tolerância, Bouron et al. (2017) utilizam dados de 36 pacientes do sexo masculino com cardiopatia isquêmica submetidos à cirurgia corretiva sem circulação extracorpórea para identificar possíveis alterações na BIVA nas fases pré-operatório e pós-operatório. Tem-se conhecimento que as alterações ocorridas no vetor de impedância se dão pelo volume de água corporal provocado pelo estresse cirúrgico. Os dados dos pacientes são comparados a indivíduos supostamente saudáveis. Para comparação dos vetores de respostas dos grupos são realizadas análises univariadas, empregando o teste F e, multivariadas, aplicando o T^2 de Hotelling, nas quais se observam diferenças significativas no eixo principal das elipses que estão associados ao estado de hidratação e no eixo secundário associado a mudanças na estrutura. A hidratação (volume de água) é significativamente diferente entre a população tanto nos estados pré-operatório como no pós-operatório.

Ferreira et al. (2017) utilizam a análise multivariada de perfil (*profile analysis*) para avaliar a influência da ingestão de café no ganho de peso de ratos *Wistar*. Para isto, os animais do experimento são divididos em seis grupos e cada grupo recebe uma das dietas, em que se avalia a influência temporal e a interação entre dieta e tempo. Mede-se o ganho de peso dos animais semanalmente. A partir do emprego da técnica de análise de variância multivariada (MANOVA), seguida pelas estatísticas de teste lambda de Wilks, raiz máxima de Roy, traço de Hotelling-Lawley e traço de Pillai, pode-se concluir que há interação significativa entre as dietas e as semanas avaliadas.

A partir das informações de 2734 idosos (≥ 65 anos), Melo et al. (2017)

analisam a estrutura interna do miniexame do estado mental (MEEM) por meio das técnicas de análise de componentes principais (ACP), complementada com as análises paralelas para a definição do número de componentes e a análise fatorial confirmatória (AFC) precedida dos testes de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) e de esfericidade de Bartlett para avaliar a adequação dos dados. Dentre os cinco primeiros componentes do MEEM selecionados pela ACP, destacam-se o primeiro por agrupar oito itens envolvendo cálculo, leitura e reprodução visomotora com caneta chamado de Habilidades Escolares; o segundo por designar a Orientação; o terceiro com a Memória de Curto Prazo; o quarto com a Memória – Evocação e, por fim, o quinto com a Memória – Reconhecimento. A AFC testa as estruturas internas do MEEM pelo: modelo unidimensional (M1), modelo baseado na ACP deste estudo com cinco fatores e um fator de segunda ordem (M2), modelo baseado no autor Folstein com cinco fatores e um fator de segunda ordem (M3) e pelo modelo baseado em Castro-Costa et al. (2014) com cinco fatores e um fator de segunda ordem (M4), que são avaliados por meio da razão do qui-quadrado pelos graus de liberdade ($\chi^2/g.l.$) na qual o M2 é selecionado como o melhor modelo, apesar dos modelos M3 e M4 apresentarem ajustes satisfatórios, levando a crer que o MEEM é uma medida multidimensional.

Popolin et al. (2017) verificam como a incidência e a mortalidade por tuberculose (TB) se distribuem em áreas abrangidas pela estratégia saúde da família (ESF) e do programa bolsa família (PBF) nos 26 Estados Federados e no Distrito Federal. Empregando a técnica multivariada da análise de agrupamento (AA) hierárquica, a distância euclidiana e o método de Ward complementada com a construção do dendrograma, são identificados sete grupos distintos. Posteriormente, a análise espacial é realizada, com a construção de mapas temáticos, sendo possível verificar uma distribuição heterogênea entre os grupos, ou seja, altas taxas de incidência e mortalidade por TB ocorrem de forma heterogênea entre os estados e regiões do país. Constata-se que a situação do agravamento da doença, também acontece tanto em áreas com alta ou com baixa cobertura de ESF e do PBF.

Silveira et al. (2017a) utilizam 64 ratos *Wistar* machos com 60 dias

de vida para avaliar se a participação do SERCA2a (retículo sarcoplasmático de ATPase (adenosinatrifosfatases) de cálcio isoformo cardíaco do tipo 2a) atua na disfunção diastólica precoce em corações hipertrofiados induzidos à estenose aórtica supravalvular (EAo). São constituídos dois grupos cada um com 32 animais, sendo o primeiro submetido à cirurgia com a colocação do clipe na aorta (EAo) e o segundo o qual recebe exatamente os mesmos procedimentos cirúrgicos porém sem a colocação do clipe na aorta (Sham). Após seis semanas, ambos os grupos são submetidos ao ecocardiograma para a realização de análises funcionais e estruturais tendo algumas variáveis analisadas. Nesse momento são definidos dois experimentos distintos, o primeiro envolvendo o bloqueio por SERCA2a, tendo como grupos de comparação 15 animais Sham e 11 animais EAo. Quanto ao segundo experimento, que envolve o efeito da hipóxia e a reoxigenação tendo com grupos de comparação 16 animais Sham e 18 EAo. Os animais excluídos do estudo exibiam evidência clínica ou laboratorial de disfunção sistólica ou insuficiência cardíaca. O comportamento mecânico do músculo papilar foi avaliado nas condições basais, após o efeito da hipóxia e do bloqueio de SERCA2a por ácido ciclopiazônico (CPA). Além disso, os animais que receberam o bloqueio por SERCA2a foram submetidos a diferentes concentrações de cálcio de 0,5 mM, 1,5 mM e 2,5 mM e comparados quanto à respostas mecânicas nos dois grupos experimentais por meio da aplicação da técnica de análise variância multivariada (MANOVA), para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes. Esse animais também tem as médias dos seus grupos comparadas quanto a histologia e a expressão proteica via teste t de Student. Para os experimentos efeito da hipóxia e reoxigenação, esses foram avaliados pela mesma técnica das medidas repetidas, já que a hipoxia foi avaliada em dois momentos: influência da hipóxia (60 minutos) e reoxigenação (30 minutos). O estudo iniciou-se com a comparação entre as médias dos grupos Sham e EAo na sexta semana, na qual foi possível identificar diferença apenas nas variáveis peso corporal e nas relações peso seco/peso úmido nos pulmões e fígado. O teste t de Student para amostras independentes utilizados nas variáveis estruturais apresentam diferença significativa em quase todas variáveis. Para efeito

da hipóxia e reoxigenação não houve diferença nos grupos, mas em ambos grupos houve diferença nos momentos avaliados. Para os grupos do experimento SERCA2a em relação à expressão proteica e a histologia não se verifica diferença significativa, contudo em ambos os grupos ocorre um decréscimo significativo na tensão desenvolvida (TD), demonstrando assim a eficácia do bloqueio CPA, que naturalmente diminui a função contrátil. Quanto à tensão de repouso (TR), não houve diferença entre grupos em qualquer momento analisado, porém a TR foi maior dentro do grupo EAo nas concentrações de cálcio 1,5 mM e 2,5 mM.

Para avaliar o equilíbrio postural dos praticantes das diferentes modalidades esportivas, Silveira et al. (2017b) utilizam 12 atletas do sexo masculino, cada um praticante de apenas uma modalidade esportiva, podendo ser: ciclismo, futebol, futsal ou vôlei. Os atletas são avaliados pelo sistema VICON de cinemetria que registra a movimentação do seu centro de massa e calcula as amplitudes mediolateral e anteroposterior. A técnica da análise de agrupamento (AA) é aplicada para identificar grupos distintos quanto às modalidades, porém os resultados evidenciam que atletas das mesmas modalidades não pertencem ao mesmo grupo. Uma AA complementar é realizada observando-se a altura dos atletas, na qual há o agrupamento dos atletas praticantes de uma mesma modalidade, evidenciando que as características antropométricas podem ser mais distinguidoras para a construção dos grupos.

Em síntese, na revisão de literatura realizada foram encontradas algumas técnicas de análise multivariada, destacando-se a análise de componentes principais (ACP), análise de agrupamento (AA), a estatística T^2 de Hotelling para comparação de vetores de médias (T^2 de Hotelling); a técnica da análise de variância multivariada (MANOVA), análise de correlação canônica (ACC) e os modelos de curvas de crescimento para dados longitudinais. Contudo, deve ser mencionado que a ACP e a AA são as mais frequentes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, em um primeiro momento é descrito o plano experimental utilizado na obtenção dos dados que serão analisados e, posteriormente, serão apresentados os métodos multivariados aplicados na pesquisa.

3.1 Plano Experimental

Dentre os diversos grupos de pesquisa existentes na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), destaca-se o Grupo de Pesquisa em Cardiologia Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) vinculado ao Departamento de Clínica Médica. Tal grupo desenvolve pesquisas experimentais relacionadas à remodelação e insuficiência cardíaca consequente da obesidade, estenose aórtica e exercício físico com ênfase na função ventricular e miocárdica, trânsito de cálcio, sistema beta adrenérgico, regeneração cardíaca, metabolismo energético, colágeno, ultraestrutura miocárdica, entre outras.

Em especial, salienta-se um estudo oriundo deste grupo, o qual administrou em seus animais dietas do tipo Hiperlipídica e Normolipídica ricas em ácidos graxos saturados. Os animais utilizados na pesquisa foram procedentes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB, UNESP, cujos procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu-SP (CAMPOS, 2014).

O delineamento do experimento utilizou 60 ratos machos da linhagem *Wistar* com 21 dias de idade mantidos em mesmas e controladas condições de temperatura ambiente, umidade e ciclos de iluminação. Todos os animais foram submetidos

ao mesmo protocolo, primeiramente recebendo a cirurgia e, posteriormente as dietas.

Os animais que iniciaram o estudo foram divididos aleatoriamente em dois grupos e submetidos ao procedimento cirúrgico chamado de toracotomia mediana. Um grupo recebeu um clipe de prata na raiz da aorta ascendente (Figura 3.1) e o outro passou apenas pela intervenção cirúrgica, o grupo que passou pela toracotomia mediana e recebeu o clipe de prata foi denominado de Estenose Aórtica (EAo) e o grupo que sofreu apenas o procedimento cirúrgico sem o implante do clipe, de Controle Operado (Sham). Definiu-se, assim, o primeiro fator de estudo denominado de cirurgia em dois níveis (EAo e Sham).

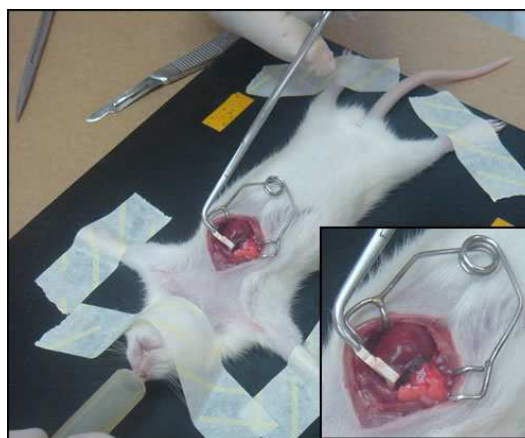


Figura 3.1: Alocação do clipe.

Fonte: Pinto et al. (2015)

Baseado em Mendes et al. (2010), estabeleceu-se que os animais do experimento receberiam as dietas na 6^a semana após a realização da cirurgia, pois, sabe-se que dietas Hiperlipídicas, nesta fase, causam hipertrofia ventricular esquerda, disfunção diastólica e melhora na função sistólica do ventrículo esquerdo.

A composição das rações para as diferentes dietas envolveram: farelo e casca de soja, milho, dextrina, óleo de soja e de palmíste e premix vitamínico e mineral. A diferenciação das composições foram observadas nas quantidades dos ingredientes utilizados e no teor de gorduras (ácidos graxos). As dietas foram adaptadas de trabalhos anteriores já publicados (LIMA-LEOPOLDO et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2008).

Para a formação dos subgrupos que receberam as diferentes dietas empregou-se a amostragem por conveniência, tendo como critério de escolha a homogeneização quanto às dietas pautado nos resultados de exames ecocardiográficos realizados na 6^a semana após o procedimento cirúrgico. Ou seja, após seis semanas da realização da intervenção cirúrgica os grupos EAo e Sham foram divididos em dois subgrupos, sendo cada um tratado com diferentes dietas uma denominada Normolipídica (Normo) e a outra Hiperlipídica (Hiper). A este segundo fator deu-se o nome de dieta. As dietas Normo e Hiper diferenciaram-se entre si quanto aos valores das quantidades de calorias e ácidos graxos; a primeira por apresentar quantidade mais baixa de caloria e ácidos graxos saturados, porém mais alta de ácidos graxos insaturados. Já, a segunda dieta Hiper apresenta maiores quantidades de calorias e ácidos graxos saturados, mas quantidade menor de ácidos graxos insaturados. Essa diferenciação é apresentada no Quadro 1.

Quadro 1: Quantidade de calorias e ácidos graxos nas dietas

Dieta	Caloria (Kcal/g)	Ácidos Graxos	
		Saturado	Insaturado
Normo	2,93	61,52	38,48
Hiper	3,64	64,81	35,19

Vale salientar que foram excluídos em qualquer fase do experimento os animais que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca como taquipneia associada a um dos sinais: edema, ascite, derrame pleuro-pericárdico, trombo em átrio esquerdo e retenção hídrica nos tecidos cardíacos, pulmonar e hepático.

Destaca-se ainda que o período de tempo experimental total foi de 18 semanas; sendo que em 12 semanas os animais ficaram ingerindo as dietas a eles designadas e mais as seis semanas relativas ao procedimento cirúrgico. Este tempo experimental total foi determinado para a possível piora na função diastólica e deterioração do sistema sistólico (CAMPOS, 2014).

As análises estruturais e funcionais do coração foram realizadas *in vivo* por meio de ecocardiograma a fim de detectar as alterações no músculo cardíaco, que podem sofrer influência das variações da pós-carga, pré-carga, frequência cardíaca, hormônios e substratos energéticos (CICOGNA et al., 2000). Estas análises ecocardiográficas foram realizadas em dois momentos, com finalidades diferentes. Na primeira situação que ocorreu na 6^a semana após a indução da EAo, objetivou-se caracterizar de forma estrutural e funcional o coração dos ratos com intento de criar grupos homogêneos para receberem as dietas. Na 18^a semana, os resultados do ecocardiograma foram utilizados para a análise da condição do animal após ter recebido a dieta.

Após a realização do ecocardiograma, na 18^a semana, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg/ip) e eutanasiados por meio de decapitação. Logo após a eutanásia, por uma análise macroscópica, pode-se identificar se há hipertrofia a nível atrial e ventricular do coração do animal. Posteriormente, o coração de cada animal é removido e dissecado e são medidos os pesos absolutos do ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD), átrio esquerdo (AE), átrio direito (AD) e do coração. São obtidas, também, as relações dos pesos coletados com o comprimento da tíbia (VE/tíbia, VD/tíbia, AE/tíbia, AD/tíbia e coração/tíbia). Todas as medidas de peso e de relações foram feitas com o intuito de indicar o grau de hipertrofia cardíaca nos animais.

Do coração de cada animal sacrificado, retira-se o músculo papilar a fim de que este seja avaliado pela técnica do músculo papilar isolado no ventrículo esquerdo quanto às funções mecânicas do miocárdio *in vitro* (CICOGNA et al., 2000). Tal técnica permite detectar se há alteração precoce na contração (sístole) e no relaxamento (diástole) do músculo cardíaco, dificilmente detectada na avaliação do coração *in vivo*.

Ao final da fase do protocolo experimental, submete-se o músculo papilar de cada animal a diferentes concentrações sequenciais de cálcio com o escopo de avaliar os mecanismos relacionados ao transporte de cálcio intracelular e à função

miocárdica do ventrículo esquerdo. As concentrações de cálcio foram administradas sequencialmente, com aumento de 0,5 mM a cada 5 minutos, iniciando-se na concentração 0,5 mM até esta atingir 3,5 mM, ou seja, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 3,5 mM (CAMPOS, 2014).

Destaca-se que, no protocolo experimental original para a obtenção das respostas biológicas de interesse, consideraram-se todas as funções mecânicas do miocárdio avaliadas a partir de curvas obtidas durante a contração isométrica, tendo como variáveis mensuradas: a tensão desenvolvida (TD, g/mm^2), a tensão de repouso (TR, g/mm^2), velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida no ventrículo esquerdo ($+dT/dt, (g/mm^2)/s$) e a velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida ($-dT/dt, (g/mm^2)/s$) no VE (Figura 3.2) visando monitorar os mecanismos de transporte de cálcio e função do miocárdio.

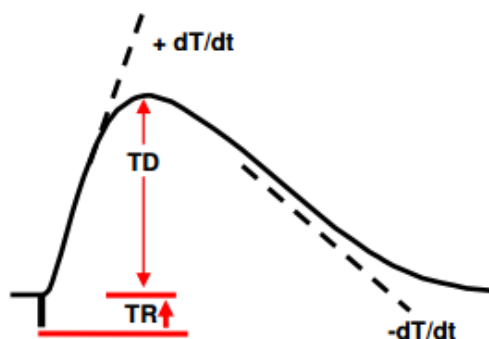


Figura 3.2: Representação esquemática da curva de contração isométrica.

Fonte: (Campos, 2014)

Com a utilização do *software* AcqKnowledge[®] MP100 da Biopac Systems (produzido em Santa Barbara, CA, EUA), torna-se possível mensurar as variáveis mecânicas representadas na curva de contração isométrica. Tais valores devem ser normalizados pela área seccional (AS) do músculo papilar a fim de poder fazer a comparação do desempenho dos músculos com diferentes tamanhos. Neste sentido, a normalização foi obtida dividindo os respectivos valores de cada uma das funções mecânicas (TD, TR, $+dT/dt$, $-dT/dt$) pela respectiva área seccional (AS) do músculo papilar.

Foram consideradas, para a presente pesquisa, apenas duas funções mecânicas do miocárdio, a tensão desenvolvida (TD) e a tensão de repouso (TR). A TD caracteriza-se como a força necessária para distender um músculo em repouso em diferentes comprimentos. Já quando um músculo é estimulado a se contrair com seu comprimento mantendo-se constante, desenvolve-se um componente adicional chamado TR ou tensão ativa (MOHRMAN & HELLER, 2008).

Pode-se resumir, então, que o plano experimental descrito utilizou-se de quatro grupos independentes provenientes da combinação de dois fatores (cirurgia e dieta), com dois níveis cada um deles, avaliados em sete diferentes concentrações de cálcio (ou sete momentos de avaliação), caracterizando uma estrutura longitudinal, podendo este ser considerado um terceiro fator com níveis dependentes.

A combinação dos dois primeiros fatores gera quatro grupos independentes que são denominados:

1. Grupo 1 (G1) - EAo e dieta Normolipídica.
2. Grupo 2 (G2) - EAo e dieta Hiperlipídica.
3. Grupo 3 (G3) - Sham e dieta Normolipídica.
4. Grupo 4 (G4) - Sham e dieta Hiperlipídica.

Torna-se interessante destacar que o terceiro fator caracterizado pelas sete diferentes concentrações de cálcio aplicadas sequencialmente no músculo papilar nos quatro grupos determinam o plano experimental formado por um esquema de dois fatores considerados sob a forma longitudinal (medidas repetidas), isto é, em uma estrutura de resposta de dados multivariados. O uso da estatística multivariada, neste estudo, justifica-se perfeitamente pelo interesse em estudar as variações existentes entre as respostas dos músculos papilares de cada animal e dentro do animal, já que fenômenos biológicos são complexos e as respostas sofrem variações.

3.2 Estatística Multivariada

Os procedimentos estatísticos utilizados nos dados experimentais coletados das funções mecânicas nos grupos de animais submetidos aos fatores dietas e a intervenção cirúrgica avaliados em diferentes concentrações sequenciais de cálcio, serão detalhados a seguir. Neste sentido, serão abordadas técnicas de análise multivariada, tanto de caráter exploratório como inferencial que atuam simultaneamente em todas as fontes de variação dos dados, levando em atenção toda a estrutura de variabilidade entre e dentro da manobra de cálcio. A fim de operacionalizar a metodologia estatística que será empregada, fez-se indispensável a estruturação de um banco de dados organizado de maneira compatível com os objetivos da pesquisa conforme minudenciado a seguir. Estabeleceu-se a estrutura matricial de um conjunto de dados em um experimento randomizado para um esquema de dois fatores independentes para medidas repetidas (longitudinais) conforme apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Descrição geral da matriz de dados de um experimento multivariado com quatro grupos em sete momentos (concentração de cálcio) de avaliação

Grupo	Cirurgia	Dieta	Unidade Experimental	Concentração de cálcio (mM)							Vetor
				0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	
G1	EAo	Normo	1	y_{1111}	y_{1112}	y_{1113}	y_{1114}	y_{1115}	y_{1116}	y_{1117}	\mathbf{Y}'_{111}
			:	:	:	:	:	:	:	:	:
			n_{11}	$y_{11n_{11}1}$	$y_{11n_{11}2}$	$y_{11n_{11}3}$	$y_{11n_{11}4}$	$y_{11n_{11}5}$	$y_{11n_{11}6}$	$y_{11n_{11}7}$	$\mathbf{Y}'_{11}n_{11}$
G2	EAo	Hiper	1	y_{1211}	y_{1212}	y_{1213}	y_{1214}	y_{1215}	y_{1216}	y_{1217}	\mathbf{Y}'_{121}
			:	:	:	:	:	:	:	:	:
			n_{12}	$y_{12n_{12}1}$	$y_{12n_{12}2}$	$y_{12n_{12}3}$	$y_{12n_{12}4}$	$y_{12n_{12}5}$	$y_{12n_{12}6}$	$y_{12n_{12}7}$	$\mathbf{Y}'_{12}n_{12}$
G3	Sham	Normo	1	y_{2111}	y_{2112}	y_{2113}	y_{2114}	y_{2115}	y_{2116}	y_{2117}	\mathbf{Y}'_{211}
			:	:	:	:	:	:	:	:	:
			n_{21}	$y_{21n_{21}1}$	$y_{21n_{21}2}$	$y_{21n_{21}3}$	$y_{21n_{21}4}$	$y_{21n_{21}5}$	$y_{21n_{21}6}$	$y_{21n_{21}7}$	$\mathbf{Y}'_{21}n_{21}$
G4	Sham	Hiper	1	y_{2211}	y_{2212}	y_{2213}	y_{2214}	y_{2215}	y_{2216}	y_{2217}	\mathbf{Y}'_{221}
			:	:	:	:	:	:	:	:	:
			n_{22}	$y_{22n_{22}1}$	$y_{22n_{22}2}$	$y_{22n_{22}3}$	$y_{22n_{22}4}$	$y_{22n_{22}5}$	$y_{22n_{22}6}$	$y_{22n_{22}7}$	$\mathbf{Y}'_{22}n_{22}$

No contexto da Tabela 3.1, $y_{i_1 i_2 j k}$ representa o valor observado para as variáveis TD ou TR na k -ésima concentração de cálcio avaliada da j -ésima unidade amostral do i_1 -ésimo nível do primeiro fator e do i_2 -ésimo nível do segundo fator, em que $i_1 = 1$ indica o animal com EAo e $i_1 = 2$ o animal Sham e i_2 mostra o fator dieta que pode ser $i_2 = 1$ para animal que recebeu a dieta Normo e $i_2 = 2$ para dieta Hiper, formando assim quatro diferentes grupos, $j = 1, \dots, n_{i_1 i_2}$ (unidade experimental) e $k = 1, \dots, p$ (no estudo, $p = 7$ níveis de concentração do cálcio).

Cada uma das linhas da matriz apresentada na Tabela 3.1 representa genericamente o vetor p dimensional de resposta da unidade experimental. Em cada linha da Tabela 3.2 apresenta-se o elemento genérico da média amostral da variável resposta em uma dada concentração quanto aos grupos, geral e fatores respectivamente.

Tabela 3.2: Descrição geral da matriz de médias das variáveis nas concentrações de cálcio de um experimento multivariado com quatro grupos nas sete concentrações de cálcio avaliadas

Cirurgia	Dieta	Tamanho dos grupos	Concentrações de cálcio (mM)							Vetor
			0,5	1,0	1,5	2	2,5	3,0	3,5	
EAo	Normo	n_{11}	$\bar{y}_{11.1}$	$\bar{y}_{11.2}$	$\bar{y}_{11.3}$	$\bar{y}_{11.4}$	$\bar{y}_{11.5}$	$\bar{y}_{11.6}$	$\bar{y}_{11.7}$	\bar{y}'_{11}
EAo	Hiper	n_{12}	$\bar{y}_{12.1}$	$\bar{y}_{12.2}$	$\bar{y}_{12.3}$	$\bar{y}_{12.4}$	$\bar{y}_{12.5}$	$\bar{y}_{12.6}$	$\bar{y}_{12.7}$	\bar{y}'_{12}
Sham	Normo	n_{21}	$\bar{y}_{21.1}$	$\bar{y}_{21.2}$	$\bar{y}_{21.3}$	$\bar{y}_{21.4}$	$\bar{y}_{21.5}$	$\bar{y}_{21.6}$	$\bar{y}_{21.7}$	\bar{y}'_{21}
Sham	Hiper	n_{22}	$\bar{y}_{22.1}$	$\bar{y}_{22.2}$	$\bar{y}_{22.3}$	$\bar{y}_{22.4}$	$\bar{y}'_{22.5}$	$\bar{y}_{22.6}$	$\bar{y}_{22.7}$	\bar{y}'_{22}
		Geral	$\bar{y}_{.1}$	$\bar{y}_{.2}$	$\bar{y}_{.3}$	$\bar{y}_{.4}$	$\bar{y}_{.5}$	$\bar{y}_{.6}$	$\bar{y}_{.7}$	$\bar{y}'_{..}$
		Cirurgia (EAo ou Sham)	$\bar{y}_{i_1.1}$	$\bar{y}_{i_1.2}$	$\bar{y}_{i_1.3}$	$\bar{y}_{i_1.4}$	$\bar{y}_{i_1.5}$	$\bar{y}_{i_1.6}$	$\bar{y}_{i_1.7}$	$\bar{y}'_{i_1.}$
		Dieta (Normo ou Hiper)	$\bar{y}_{.i_21}$	$\bar{y}_{.i_22}$	$\bar{y}_{.i_23}$	$\bar{y}_{.i_24}$	$\bar{y}_{.i_25}$	$\bar{y}_{.i_26}$	$\bar{y}_{.i_27}$	$\bar{y}'_{.i_2}$

Considerando a estrutura de dados analisados sob o ponto de vista estatístico como dados longitudinais, já que a mesma variável resposta é mensurada na mesma unidade experimental em diferentes concentrações de cálcio (medidas repetidas ao longo da elevação sequencial de cálcio), pretende-se estudar o perfil médio de respostas dos grupos formados pela combinação dos dois fatores que levam em consideração todas as concentrações de cálcio simultaneamente e a interação entre os dois fatores, com o uso de técnicas de análise estatística multivariada de dados.

Sabe-se que técnicas de análise multivariada de dados podem ser divididas em três grupos distintos (JOHNSON & WICHERN, 2007):

1. A análise inferencial sobre médias e modelos lineares que abrangem a estatística T^2 de Hotelling, a análise de variância multivariada (MANOVA) e a regressão linear multivariada.
2. A análise da estrutura de variância-covariância abrangendo análise de componentes principais, análise fatorial e análise de correlação canônica.
3. A análise de classificação e agrupamento que incluem a análise de agrupamento e análise discriminante.

Na sequência serão abordados os procedimentos multivariados que serão utilizados no estudo.

3.2.1 Análise de Variância Multivariada

A técnica da análise de variância multivariada (MANOVA) é uma extensão da análise de variância univariada (ANOVA) para casos em que existe o interesse em comparar simultaneamente várias respostas de variáveis biológicas consideradas em uma mesma unidade de observação, ou seja, o procedimento tem o intuito de verificar se há diferença entre os vetores de médias dos diferentes grupos considerando o conjunto de variáveis respostas e toda estrutura de variação existente no conjunto de dados.

A aplicação da técnica da MANOVA, no contexto de modelo linear multivariado, requer que duas pressuposições básicas sejam satisfeitas (HAIR et al., 2009): o vetor de respostas deve seguir uma distribuição normal multivariada (multinormal) e as matrizes de covariâncias não devam ser, significativamente, diferentes para os grupos estudados, ou seja, matrizes homocedásticas.

Existem alguns métodos práticos para a validação da hipótese de normalidade multivariada dos dados, dentre eles está a inspeção visual do gráfico de probabilidade qui-quadrado, também chamado de gráfico quantil-quantil ou gráfico Q-Q. O gráfico Q-Q é construído a partir da distância generalizada de Mahalanobis entre a j -ésima unidade experimental de um grupo e o respectivo centróide representado pelo vetor de médias do grupo ponderado pelo inverso da matriz de covariâncias do grupo expressa por:

$$\delta_{i_1 i_2 j}^2 = (\mathbf{y}_{i_1 i_2 j} - \bar{\mathbf{y}}_{i_1 i_2})' \mathbf{S}_{i_1 i_2}^{-1} (\mathbf{y}_{i_1 i_2 j} - \bar{\mathbf{y}}_{i_1 i_2}), \quad (3.1)$$

com $i_1 = i_2 = 1, 2$ e $j = 1 \dots n_{i_1 i_2}$, no qual $\mathbf{y}_{i_1 i_2 j}$ são os vetores observados de cada unidade experimental nos k níveis da concentração de cálcio, $\bar{\mathbf{y}}_{i_1 i_2}$ caracteriza o vetor de médias e $\mathbf{S}_{i_1 i_2}$ a matriz de covariâncias.

A distância de Mahalanobis dada por $\delta_{i_1 i_2 j}^2$ é obtida para cada um dos elementos amostrais e organizada de forma crescente ($\delta_{(1)}^2 \leq \delta_{(2)}^2 \leq \delta_{(3)}^2 \dots \leq \delta_{(n_{i_1 i_2})}^2$) em que $\delta_{(l)}^2$ caracteriza a l -ésima estatística de ordem com $l = 1, \dots, n_{i_1 i_2}$. O gráfico Q-Q é obtido a partir dos pares:

$$\left[\delta_{(l)}^2; x_l^2 \left(\frac{l - \frac{1}{2}}{n_{i_1 i_2}} \right) \right], \quad (3.2)$$

com $x_l^2 \left(\frac{l - \frac{1}{2}}{n_{i_1 i_2}} \right)$ caracteriza o quantil de ordem $100 \left(\frac{l - \frac{1}{2}}{n_{i_1 i_2}} \right)$ associado a distribuição qui-quadrado com p graus de liberdade, ou seja:

$$P \left[X_l^2 \leq x_l^2 \left(\frac{l - \frac{1}{2}}{n_{i_1 i_2}} \right) \right] = \frac{l - \frac{1}{2}}{n_{i_1 i_2}}. \quad (3.3)$$

Para que haja aderência dos dados à distribuição multinormal o gráfico precisa apresentar a dispersão dos pontos distribuída próximo a uma reta (MINGOTI, 2013).

A verificação da homogeneidade das matrizes de covariâncias dos quatro grupos estudados pode de ser efetuada a partir da generalização do teste univariado de Levene que se constitui em um teste estatístico mais robusto, isto é, pouco sensível a não normalidade dos dados (MANLY, 2004). A hipótese de homogeneidade das matrizes de covariâncias é dada por:

$$\begin{cases} \Sigma_{11} = \Sigma_{12} = \Sigma_{21} = \Sigma_{22} \\ \text{existe pelo menos um } \Sigma_{i_1 i_2} \text{ diferente dos demais para } i_1 = i_2 = 1, 2. \end{cases} \quad (3.4)$$

A extensão do teste de Levene propõe que a partir dos dados originais sejam obtidos os vetores dos desvios absolutos de cada unidade amostral em relação à mediana do seu grupo para cada um dos momentos avaliados (BROWN & FORSYTHE, 1974). Os desvios para o elemento genérico $y_{i_1 i_2 j k}$ podem ser expressos:

$$\Delta_{i_1 i_2 j} = |y_{i_1 i_2 j k} - \tilde{y}_{i_1 i_2 . k}|, \quad (3.5)$$

em que $\tilde{y}_{i_1 i_2 . k}$ é a mediana da variável resposta na k -ésima concentração de cálcio do i_1 -ésimo nível do primeiro fator e do i_2 -ésimo nível do segundo fator.

Na sequência esses desvios ($\Delta_{i_1 i_2 j}$) são empregados para o cálculo da raiz quadrada da soma dos quadrados dos desvios expressa por $d_{i_1 i_2 j}$, dada por:

$$d_{i_1 i_2 j} = \sqrt{\sum_{k=1}^p (y_{i_1 i_2 j k} - \tilde{y}_{i_1 i_2 . k})^2} = \sqrt{\sum_{k=1}^p (\Delta_{i_1 i_2 j})^2}. \quad (3.6)$$

De posse desses valores obtidos para cada um dos indivíduos, utiliza-se a técnica de análise de variância para o modelo com um fator formado pelos quatro grupos analisados, com a ideia de que se os grupos apresentarem variações consideráveis nesses valores, mostra que eles são significativamente diferentes, ou

seja, não há homogeneidade nas matrizes de variância (ANDERSON, 2006).

O resultado estatístico do teste relativo à técnica da ANOVA deve ser comparado a uma aproximação da distribuição F de Snedecor com $g - 1$ e $n.. - g$ graus de liberdade, com g designando o número de grupos ($g = 4$, ou seja, G1, G2, G3 e G4).

Verificada a normalidade dos dados e a homogeneidade das matrizes de covariâncias, a técnica da MANOVA pode ser utilizada considerando os quatro diferentes grupos oriundos da combinação dos dois fatores do estudo, que devem ser comparados quanto aos vetores de médias das respostas da TD e TR avaliadas nas diferentes concentrações de cálcio.

O modelo linear multivariado (MLM) que caracteriza a estrutura do estudo é um modelo linear de dois fatores com efeitos fixos e interação, que é representado algebricamente pela equação (3.7):

$$\mathbf{Y}_{i_1 i_2 j} = \boldsymbol{\mu} + \boldsymbol{\alpha}_{i_1} + \boldsymbol{\beta}_{i_2} + (\boldsymbol{\alpha}\boldsymbol{\beta})_{i_1 i_2} + \boldsymbol{\varepsilon}_{i_1 i_2 j}, \begin{cases} i_1 = 1, 2 \\ i_2 = 1, 2 \\ j = 1, \dots, n_{i_1 i_2} \end{cases} \quad (3.7)$$

com os elementos designados por:

- $\mathbf{Y}_{i_1 i_2 j}$ vetor de resposta da variável no j -ésimo indivíduo do i_1 -ésimo grupo de cirurgia e i_2 -ésimo dieta;
- $\boldsymbol{\mu}$ o vetor de média comum a todas as unidades experimentais;
- $\boldsymbol{\alpha}_{i_1}$ o vetor de efeito do i_1 -ésimo nível do fator cirurgia, definido como o desvio médio do nível em relação à média comum;
- $\boldsymbol{\beta}_{i_2}$ o vetor efeito i_2 -ésimo nível do fator dieta, definido como o desvio médio do nível em relação à média comum;
- $(\boldsymbol{\alpha}\boldsymbol{\beta})_{i_1 i_2}$ o vetor do efeito da interação entre cirurgia e dieta;

- $\boldsymbol{\varepsilon}_{i_1 i_2 j}$ o vetor de erros multivariados;

com

$$\boldsymbol{\varepsilon}_{i_1 i_2 j} \sim \mathbf{N}_p(\mathbf{0}, \boldsymbol{\Sigma}) \quad (3.8)$$

e

$$\mathbf{Y}_{i_1 i_2 j} \sim \mathbf{N}_p(\boldsymbol{\mu}, \boldsymbol{\Sigma}) \quad (3.9)$$

Matricialmente, o modelo ser escrito da seguinte forma geral:

$$\mathbf{Y}_{n_{..} \times p} = \mathbf{X}_{n_{..} \times q} \mathbf{B}_{q \times p} + \boldsymbol{\varepsilon}_{n_{..} \times p}, \quad (3.10)$$

em que :

- $n_{..}$ representa o total de unidade experimentais
- p a quantidade de medições ao longo do tempo
- q o número de parâmetros envolvidos no modelo experimental

Para a presente pesquisa tem-se:

$$\mathbf{Y}_{n_{..} \times 7} = \mathbf{X}_{n_{..} \times 9} \mathbf{B}_{9 \times 7} + \boldsymbol{\varepsilon}_{n_{..} \times 7} \quad (3.11)$$

em que $n_{..} = n_{11} + n_{12} + n_{21} + n_{22}$, $p = 7$ o número de concentrações de cálcio consideradas e $q = 9$ o número de parâmetros do modelo. A forma genérica da matriz de dados fica expressa como:

$$\mathbf{Y}_{n_{..} \times 7} = \begin{bmatrix} y_{1111} & y_{1112} & \cdots & y_{1117} \\ y_{1121} & y_{1122} & \cdots & y_{1127} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ y_{11n_{11}1} & y_{11n_{11}2} & \cdots & y_{11n_{11}7} \\ \hline y_{1211} & y_{1212} & \cdots & y_{1217} \\ y_{1221} & y_{1222} & \cdots & y_{1227} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ y_{12n_{11}1} & y_{12n_{11}2} & \cdots & y_{12n_{11}7} \\ \hline y_{2111} & y_{2112} & \cdots & y_{2117} \\ y_{2121} & y_{2122} & \cdots & y_{2127} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ y_{21n_{21}1} & y_{21n_{21}2} & \cdots & y_{21n_{21}7} \\ \hline y_{2211} & y_{2212} & \cdots & y_{2217} \\ y_{2221} & y_{2222} & \cdots & y_{2227} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ y_{22n_{22}1} & y_{22n_{22}2} & \cdots & y_{22n_{22}7} \end{bmatrix}, \quad (3.12)$$

A matriz $\mathbf{Y}_{n_{..} \times 7}$ representa respostas das variáveis TD e TR observadas nas sete concentrações de cálcio realizadas nas $n_{..}$ unidades experimentais. A matriz de planejamento que associa a cada uma das unidades experimentais a seu respectivo grupo apresenta-se como:

$$\mathbf{X}_{n_{..} \times 9} = \begin{bmatrix} \mathbf{1} & \mathbf{1}_{n_{11}} & \mathbf{0} & \mathbf{1}_{n_{11}} & \mathbf{0} & \mathbf{1}_{n_{11}} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{1} & \mathbf{1}_{n_{12}} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{1}_{n_{12}} & \mathbf{0} & \mathbf{1}_{n_{12}} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{1} & \mathbf{0} & \mathbf{1}_{n_{21}} & \mathbf{1}_{n_{21}} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{1}_{n_{21}} & \mathbf{0} \\ \mathbf{1} & \mathbf{0} & \mathbf{1}_{n_{22}} & \mathbf{0} & \mathbf{1}_{n_{22}} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{1}_{n_{22}} \end{bmatrix}, \quad (3.13)$$

sendo $\mathbf{1}_{n_{i_1 i_2}}$ o vetor unitário com $n_{i_1 i_2}$ elementos.

A matriz de parâmetros identificada em (3.14) apresenta cada uma das linhas correspondendo à indicação dos níveis dos fatores e possíveis interações

entre eles, com as colunas representando as concentrações de cálcio da estrutura longitudinal.

$$\mathbf{B}_{9 \times 7} = \begin{bmatrix} \boldsymbol{\mu}' \\ \boldsymbol{\alpha}'_1 \\ \boldsymbol{\alpha}'_2 \\ \boldsymbol{\beta}'_1 \\ \boldsymbol{\beta}'_2 \\ (\boldsymbol{\alpha}\boldsymbol{\beta})'_{11} \\ (\boldsymbol{\alpha}\boldsymbol{\beta})'_{12} \\ (\boldsymbol{\alpha}\boldsymbol{\beta})'_{21} \\ (\boldsymbol{\alpha}\boldsymbol{\beta})'_{22} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mu_1 & \mu_2 & \cdots & \mu_7 \\ \alpha_{11} & \alpha_{12} & \cdots & \alpha_{17} \\ \alpha_{21} & \alpha_{22} & \cdots & \alpha_{27} \\ \beta_{11} & \beta_{12} & \cdots & \beta_{17} \\ \beta_{21} & \alpha_{22} & \cdots & \beta_{27} \\ (\alpha\beta)_{111} & (\alpha\beta)_{112} & \cdots & (\alpha\beta)_{117} \\ (\alpha\beta)_{121} & (\alpha\beta)_{122} & \cdots & (\alpha\beta)_{127} \\ (\alpha\beta)_{211} & (\alpha\beta)_{212} & \cdots & (\alpha\beta)_{217} \\ (\alpha\beta)_{221} & (\alpha\beta)_{222} & \cdots & (\alpha\beta)_{227} \end{bmatrix}. \quad (3.14)$$

Cada linha da matriz $\mathbf{B}_{9 \times 7}$ é formada por sete elementos que representam as causas envolvidas nas respostas observadas em cada uma das medidas realizadas nas unidades experimentais nas diferentes concentrações de cálcio em cada um dos quatro diferentes grupos.

Na matriz (3.14) tem-se que $(\alpha\beta)_{11}$, indica o efeito da interação entre os animais submetidos a EAo e dieta Normo nas sete diferentes concentrações de cálcio, $(\alpha\beta)_{12}$, o efeito da interação dos animais submetidos a EAo e que ingeriram a dieta Hiper. Tem-se que $(\alpha\beta)_{21}$, corresponde aos animais que foram submetidos à pseudocirurgia Sham e que receberam dieta Normo nos sete diferentes, $(\alpha\beta)_{22}$, corresponde ao animal Sham que recebeu a dieta Hiper.

A matriz que representa os componentes aleatórios dos dados é apre-

sentada a seguir:

$$\boldsymbol{\varepsilon}_{n.. \times 7} = \begin{bmatrix} \varepsilon_{1111} & \varepsilon_{1112} & \cdots & \varepsilon_{1117} \\ \varepsilon_{1121} & \varepsilon_{1122} & \cdots & \varepsilon_{1127} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \varepsilon_{11n_{11}1} & \varepsilon_{11n_{11}2} & \cdots & \varepsilon_{11n_{11}7} \\ \hline \varepsilon_{1211} & \varepsilon_{1212} & \cdots & \varepsilon_{1217} \\ \varepsilon_{1221} & \varepsilon_{1222} & \cdots & \varepsilon_{1227} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \varepsilon_{12n_{11}1} & \varepsilon_{12n_{11}2} & \cdots & \varepsilon_{12n_{11}7} \\ \hline \varepsilon_{2111} & \varepsilon_{2112} & \cdots & \varepsilon_{2117} \\ \varepsilon_{2121} & \varepsilon_{2122} & \cdots & \varepsilon_{2127} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \varepsilon_{21n_{21}1} & \varepsilon_{21n_{21}2} & \cdots & \varepsilon_{21n_{21}7} \\ \hline \varepsilon_{2211} & \varepsilon_{2212} & \cdots & \varepsilon_{2217} \\ \varepsilon_{2221} & \varepsilon_{2222} & \cdots & \varepsilon_{2227} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \varepsilon_{22n_{22}1} & \varepsilon_{22n_{22}2} & \cdots & \varepsilon_{22n_{22}7} \end{bmatrix}. \quad (3.15)$$

Diante das suposições 3.9 e 3.8 associadas ao MLM, tem-se que:

$$E(\mathbf{Y}) = \mathbf{XB} \quad (3.16)$$

e

$$Var(\mathbf{Y}) = \boldsymbol{\Sigma} \otimes \mathbf{I}_n \quad (3.17)$$

em que \otimes simboliza o produto de Kronecker.

O MLM pode ser denotado por $(\mathbf{Y}, \mathbf{XB}, \boldsymbol{\Sigma} \otimes \mathbf{I}_n)$ com estimador de mínimos quadrados \mathbf{B} dado por:

$$\hat{\mathbf{B}} = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'\mathbf{Y} \quad (3.18)$$

Os testes das hipóteses dos parâmetros do modelo são destacados a seguir.

A primeira hipótese a ser testada é a que verifica se há efeito da interação entre os fatores. Tal hipótese é dada por:

$$\text{Cirurgia e Dieta} \begin{cases} H_{0(C \times D)} : (\boldsymbol{\alpha}\boldsymbol{\beta})_{i_1 i_2} = \mathbf{0} & \text{para todo } i_1 i_2 \\ H_{1(C \times D)} : (\boldsymbol{\alpha}\boldsymbol{\beta})_{i_1 i_2} \neq \mathbf{0}, & \text{para algum } i_1 i_2 \end{cases} \quad (3.19)$$

Se o resultado do teste da interação for significativo, tem-se que o efeito de um fator é modificado pelos diferentes níveis do outro fator. Caso a interação seja não significativa, há evidências de que o comportamento de um fator independe do outro e, portanto, pode-se investigar o efeito de cada um dos fatores isoladamente. Neste caso, testam-se os efeitos principais relacionados aos níveis dos fatores, cujas hipóteses são:

$$\text{Cirurgia} \begin{cases} H_{0(C)} : \boldsymbol{\alpha}_{i_1} = \mathbf{0} & \text{para todo } i_1 \\ H_{1(C)} : \boldsymbol{\alpha}_{i_1} \neq \mathbf{0}, & \text{para algum } i_1 \end{cases} \quad (3.20)$$

$$\text{Dieta} \begin{cases} H_{0(D)} = \boldsymbol{\beta}_{i_2} = \mathbf{0} & \text{para todo } i_2 \\ H_{1(D)} = \boldsymbol{\beta}_{i_2} \neq \mathbf{0}, & \text{para algum } i_2 \end{cases} \quad (3.21)$$

O Quadro 2 apresenta os componentes da MANOVA para um esquema de dois fatores em um experimento inteiramente casualizado, contendo as matrizes das somas de quadrados e produtos para o procedimento estatístico da comparação dos vetores de médias .

Quadro 2: Quadro da MANOVA para dois fatores

Fonte de Variação	Matriz da Soma de Quadrados e Produtos (<i>MSQP</i>)
Grupos	$MSQP = \mathbf{G}$
Cirurgia	$MSQP_{cirurgia} = \mathbf{C}$
Dieta	$MSQP_{dieta} = \mathbf{D}$
Interação	$MSQP_{cirurgia \times dieta} = \mathbf{CD}$
Resíduo	$MSQP_{res} = \mathbf{W}$
Total	$MSQP_{tot} = \mathbf{T} = \mathbf{B} + \mathbf{W}$

Com \mathbf{B} dado por:

$$\mathbf{G} = \mathbf{C} + \mathbf{D} + \mathbf{CD} = \sum_{i_1=1}^2 \sum_{i_2=1}^2 (\bar{y}_{i_1 i_2} - \bar{y}_{..})(\bar{y}_{i_1 i_2} - \bar{y}_{..})'. \quad (3.22)$$

Sendo assim, tem-se que:

$$\mathbf{C} = \sum_{i_1=1}^2 (\bar{y}_{i_1.} - \bar{y}_{..})(\bar{y}_{i_1.} - \bar{y}_{..})' \quad (3.23)$$

é a matriz de soma de quadrados e produtos cruzados do fator cirurgia, e

$$\mathbf{D} = \sum_{i_2=1}^2 (\bar{y}_{.i_2} - \bar{y}_{..})(\bar{y}_{.i_2} - \bar{y}_{..})' \quad (3.24)$$

é a matriz de soma de quadrados e produtos cruzados do fator dieta.

A matriz \mathbf{CD} é obtida a partir da diferença dada por:

$$\mathbf{CD} = \mathbf{G} - \mathbf{C} - \mathbf{D} \quad (3.25)$$

A matriz \mathbf{T} ($MSQP_{tot}$) é dada por:

$$\mathbf{T} = \sum_{i_1=1}^2 \sum_{i_2=1}^2 \sum_{j=1}^{n_{i_1 i_2}} (y_{i_1 i_2 j} - \bar{y}_{..})(y_{i_1 i_2 j} - \bar{y}_{..})' \quad (3.26)$$

e representa a matriz da soma de quadrados e produtos cruzados totais.

Tem-se que \mathbf{W} ($MSQP_{res}$) a matriz da soma de quadrados e produtos obtida dentro dos diferentes grupos (resíduo) e pode ser obtida a partir de:

$$\mathbf{T} = \mathbf{G} + \mathbf{W}; \quad (3.27)$$

logo

$$\mathbf{W} = \mathbf{T} - \mathbf{G} \quad (3.28)$$

Para avaliar a significância da hipótese geral de interesse entre os grupos existem quatro critérios que são os mais empregados, entre eles estão: a razão de verossimilhança generalizada de Wilks (RV) ou Λ de Wilks (Λ), o teste da raiz máxima de Roy, traço de Lawley-Hotelling e traço de Pillai. Nessa pesquisa utilizou-se a estatística Λ de Wilks (Wilks, 1932) para avaliação das hipóteses. Para cada uma das hipóteses apresentadas anteriormente tem-se:

1. Interação dos fatores

$$\Lambda_{CD} = \frac{|\mathbf{W}|}{|\mathbf{CD} + \mathbf{W}|} \quad (3.29)$$

2. Efeito do fator cirurgia

$$\Lambda_C = \frac{|\mathbf{W}|}{|\mathbf{C} + \mathbf{W}|} \quad (3.30)$$

3. Efeito do fator dieta

$$\Lambda_D = \frac{|\mathbf{W}|}{|\mathbf{D} + \mathbf{W}|} \quad (3.31)$$

Para a decisão estatística sobre as hipóteses apresentadas, o resultado da razão de verossimilhança de Wilks será avaliado pela aproximação assintótica à distribuição F ou χ^2 (REIS, 2001), como apresentado a seguir:

$$\frac{(n_{..} - g) - p + 1}{p} * \frac{1 - \Lambda}{\Lambda} \quad \text{com distribuição } F_{(p, n_{..} - g - p + 1)}, \quad (3.32)$$

em que g é o número de grupos resultantes das combinações de um esquema de dois

fatores (cirurgia e dieta).

$$-\left[(n_{..} - g) - \frac{1}{2}(p - g + 2)\right] \ln \Lambda \quad \text{com distribuição } \chi^2_{(p \times (g-1))}. \quad (3.33)$$

Após a realização dos testes de hipóteses das igualdades de médias, caso alguma das hipóteses seja rejeitada, a MANOVA deve ser complementada com os intervalos de confiança simultâneos (ICS) de Hotelling ou Bonferroni para as diferenças entre as médias dos grupos de interesse (JOHNSON & WICHERN, 2007).

Assim, define-se a matriz de médias \mathbf{M} para a construção dos ICS, que é dada por:

$$\mathbf{M} = \begin{bmatrix} \boldsymbol{\mu}'_{11} \\ \boldsymbol{\mu}'_{12} \\ \boldsymbol{\mu}'_{21} \\ \boldsymbol{\mu}'_{22} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mu_{111} & \mu_{112} & \cdots & \mu_{117} \\ \mu_{121} & \mu_{122} & \cdots & \mu_{127} \\ \mu_{211} & \mu_{212} & \cdots & \mu_{217} \\ \mu_{221} & \mu_{222} & \cdots & \mu_{227} \end{bmatrix},$$

sendo $\mu_{i_1 i_2 j}$ a média populacional da variável TD ou TR, correspondente à j -ésima concentração de cálcio no i_1 -ésimo nível do fator cirurgia e i_2 -ésimo nível do fator dieta

Diante da estrutura dos dados, é possível obter os intervalos de confiança para a interação e para os fatores cirurgia e dieta. Dessa forma, considerou-se os limites de confiança proposto por Hotelling $100(1 - \alpha)\%$ para cada um dos casos conforme está apresentado a seguir.

1. Intervalo de confiança para a diferença dos vetores de médias sob a interação dos fatores:

$$\mathbf{a}'(\boldsymbol{\mu}_{i_1 i_2} - \boldsymbol{\mu}_{i_1' i_2'}) = \mathbf{a}'(\bar{\mathbf{y}}_{i_1 i_2} - \bar{\mathbf{y}}_{i_1' i_2'}) \pm \sqrt{\frac{(n_{i_1 i_2} + n_{i_1' i_2'} - 2)p}{(n_{i_1 i_2} + n_{i_1' i_2'} - p - 1)} F_{(\alpha; p; n_{i_1 i_2} + n_{i_1' i_2'} - p - 1)} \frac{n_{i_1 i_2} + n_{i_1' i_2'}}{n_{i_1 i_2} * n_{i_1' i_2'}} \mathbf{a}' \mathbf{S}_p \mathbf{a}}. \quad (3.34)$$

O intervalo de confiança só será realizado se o resultado da interação for sig-

nificativo. Caso contrário, prossegue-se a análise para os fatores considerados isoladamente.

2. Intervalo de confiança para a diferença de médias do fator dieta:

$$\mathbf{a}'(\boldsymbol{\mu}_{.i_1} - \boldsymbol{\mu}_{.i_1'}) = \mathbf{a}'(\bar{\mathbf{y}}_{.i_1} - \bar{\mathbf{y}}_{.i_1'}) \pm \sqrt{\frac{(n_{i_1.} + n_{i_1' .} - 2)p}{(n_{i_1.} + n_{i_1' .} - p - 1)} F_{(\alpha; p; n_{i_1.} + n_{i_1' .} - p - 1)} \frac{n_{i_1.} + n_{i_1' .}}{n_{i_1.} * n_{i_1' .}} \mathbf{a}' \mathbf{S}_p \mathbf{a}}. \quad (3.35)$$

3. Intervalo de confiança para a diferença de médias do fator cirurgia:

$$\mathbf{a}'(\boldsymbol{\mu}_{.i_2} - \boldsymbol{\mu}_{.i_2'}) = \mathbf{a}'(\bar{\mathbf{y}}_{.i_2} - \bar{\mathbf{y}}_{.i_2'}) \pm \sqrt{\frac{(n_{.i_2} + n_{.i_2'} - 2)p}{(n_{.i_2} + n_{.i_2'} - p - 1)} F_{(\alpha; p; n_{.i_2} + n_{.i_2'} - p - 1)} \frac{n_{.i_2} + n_{.i_2'}}{n_{.i_2} * n_{.i_2'}} \mathbf{a}' \mathbf{S}_p \mathbf{a}}. \quad (3.36)$$

com $\mathbf{a}' = [a_1, \dots, a_p]$ formado pelos números zero e um indicando os pares de médias a serem testadas e $\mathbf{S}_p = \frac{\mathbf{W}}{n_{..} - g}$.

Para a interpretação do intervalo de confiança simultâneo (ICS) deve-se proceder da seguinte maneira: se o valor 0 (zero) estiver dentro do intervalo, conclui-se que a diferença de médias é não significativa, caso contrário, há evidências de que as médias testadas diferem entre si.

3.2.2 Modelo Linear Multivariado de Crescimento (MLMC)

Quando os dados são estruturados como dados longitudinais, o modelo pode ser estudado por meio de curvas polinomiais utilizando MLMC, a fim de descrever os perfis médios das respostas de diferentes grupos e, assim, avaliar a influência de tempo, doses de droga, observar o comportamento ou desenvolvimento de certo fenômeno, entre outras possíveis situações quantitativas.

O MLM, já descrito em 3.2.1, deu origem ao MLMC empregado para a análise multivariada dos dados quando estes estão estruturados longitudinalmente. Nesse sentido, destaca-se a proposta desenvolvida por Potthoff & Roy (1964) que consiste na generalização do MLM em um MLMC, que pode ser descrito pela equação (3.37).

$$\mathbf{Y}_{n.. \times p} = \mathbf{X}_{n.. \times g} \boldsymbol{\xi}_{g \times q} \mathbf{G}_{q \times p} + \boldsymbol{\varepsilon}_{n.. \times p}, \quad (3.37)$$

com $E(\mathbf{Y}) = \mathbf{X}\boldsymbol{\xi}\mathbf{G}$ e $Var(\mathbf{Y}) = \Sigma \otimes \mathbf{I}_{n..}$.

Tem-se que $\mathbf{Y}_{n.. \times p}$, $\mathbf{X}_{n.. \times g}$ e $\boldsymbol{\varepsilon}_{n.. \times p}$ são as mesmas matrizes do modelo linear multivariado (MLM) e $\boldsymbol{\xi}_{g \times q}$ é dada pela matriz de coeficientes (parâmetros) desconhecidos das curvas do polinômio de crescimento, ou seja:

$$\boldsymbol{\xi}_{g \times q} = \begin{bmatrix} \xi_{10} & \xi_{11} & \cdots & \xi_{1(q-1)} \\ \xi_{20} & \xi_{21} & \cdots & \xi_{2(q-1)} \\ \vdots & \vdots & \cdots & \vdots \\ \xi_{g0} & \xi_{g1} & \cdots & \xi_{g(q-1)} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \boldsymbol{\xi}'_1 \\ \boldsymbol{\xi}'_2 \\ \vdots \\ \boldsymbol{\xi}'_g \end{bmatrix}, \quad (3.38)$$

cada uma das linhas da matriz representa os coeficientes do polinômio de grau l ($l = 0, 1, \dots, q-1$) relativo ao i -ésimo grupo (BATISTELA, 2014).

A matriz $\mathbf{G}_{q \times p}$ ($q \leq p$) é a matriz de delineamento dentro de cada um dos indivíduos, cujo papel é associar as respostas de cada uma das unidades experimentais ao grau do polinômio desejado, ou seja, as colunas representam os níveis de avaliação e as linhas os graus dos polinômios a serem testados. A matriz \mathbf{G} pode ser construída de três formas:

1. Pelos valores dos níveis da estrutura longitudinal.
2. Pelos valores dos afastamentos em relação às médias dos níveis da estrutura longitudinal.
3. Pelos valores dos coeficientes dos polinômios ortogonais associados aos graus inseridos no estudo.

Para a terceira situação, os coeficientes da matriz \mathbf{G} podem ser obtidos diretamente da tabela de coeficientes ortogonais (ortonormais) disponível em Montgomery (2004) se os momentos de avaliação forem equiespaçados; caso isso não

ocorra há a necessidade da construção dos elementos da matriz \mathbf{G} , o que pode ser feito pelo processo de Gram-Schmidt.

Genericamente, para o terceiro caso, a matriz pode ser representada por:

$$\mathbf{G}_{q \times p} = \begin{bmatrix} \phi_0(t_1) & \phi_0(t_2) & \cdots & \phi_0(t_p) \\ \phi_1(t_1) & \phi_1(t_2) & \cdots & \phi_1(t_p) \\ \vdots & \vdots & \cdots & \vdots \\ \phi_{q-1}(t_1) & \phi_{q-1}(t_2) & \cdots & \phi_{q-1}(t_p) \end{bmatrix},$$

No presente estudo, houve interesse em testar alguns modelos polinomiais não convencionais que envolvessem as concentrações de cálcio transformadas, ou seja, alterações matemáticas funcionais na variável independente cálcio, a fim de se obter melhores respostas para a remodelação cardíaca frente a indicadores de Evangelista (2016). Sendo assim, testaram-se os seguintes modelos polinomiais:

1. Concentração de cálcio:

$$P(x) = a_0 C a^0 + \dots + a_q C a^q.$$

2. Raiz quadrada da concentração de cálcio:

$$P(x) = a_0 (\sqrt{C} a)^0 + \dots + a_q (\sqrt{C} a)^q.$$

3. Inverso da concentração de cálcio:

$$P(x) = a_0 \left(\frac{1}{C} a\right)^0 + \dots + a_q \left(\frac{1}{C} a\right)^q.$$

4. Inverso da raiz quadrada da concentração de cálcio:

$$P(x) = a_0 \left(\frac{1}{\sqrt{C} a}\right)^0 + \dots + a_q \left(\frac{1}{\sqrt{C} a}\right)^q.$$

5. Logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade:

$$P(x) = a_0 (\ln(Ca + 1))^0 + \dots + a_q (\ln(Ca + 1))^q.$$

6. Inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade:

$$P(x) = a_0 \left(\frac{1}{\ln(Ca+1)} \right)^0 + \dots + a_q \left(\frac{1}{\ln(Ca+1)} \right)^q.$$

Houve a necessidade da determinação dos elementos para comporem a matriz \mathbf{G} para as situações 2, 3, 4, 5 e 6 em que os valores resultantes das concentrações de cálcio tornam-se não equidistantes, uma vez que não havia valores dos coeficientes dos polinômios ortogonais disponíveis na literatura.

Para gerar os polinômios ortonormais a fim de construir a matriz \mathbf{G} utilizou-se o procedimento de Ortonormalização de Gram-Schmidt que a partir de um espaço vetorial euclidiano composto por t vetores $(\mathbf{u}_1, \mathbf{u}_2, \mathbf{u}_3, \dots, \mathbf{u}_t)$ admite uma base ortonormal também com t vetores $(\mathbf{g}_1, \mathbf{g}_2, \mathbf{g}_3, \dots, \mathbf{g}_t)$. Caso algum dos vetores do espaço seja linearmente dependente, a base ortonormal gerada irá conter um número menor de vetores se comparado ao espaço vetorial original. De maneira mais geral, o método permite transformar um conjunto de vetores linearmente independentes em um conjunto ortogonal (ou ortonormal) que gera o mesmo espaço vetorial (CALLIOLI et al., 1990; FERREIRA, 2011). O processo de Gram-Schmidt, para construção de vetores ortonormais, pode ser descrito:

1. O primeiro vetor da base ortonormal \mathbf{g}_1 é obtido por: $\mathbf{g}_1 = \frac{\mathbf{u}_1}{\|\mathbf{u}_1\|}$, em que $\|\mathbf{u}_1\|$ representa a norma do vetor \mathbf{u}_1 ;
2. $\mathbf{g}_2 = \frac{\mathbf{v}_2}{\|\mathbf{v}_2\|}$, em que $\mathbf{v}_2 = \mathbf{u}_2 - \langle \mathbf{u}_2, \mathbf{g}_1 \rangle \mathbf{g}_1$ e $\langle \mathbf{u}_2, \mathbf{g}_1 \rangle$ é o produto interno entre $\mathbf{u}_2, \mathbf{g}_1$;
3. $\mathbf{g}_3 = \frac{\mathbf{v}_3}{\|\mathbf{v}_3\|}$, em que $\mathbf{v}_3 = \mathbf{u}_3 - \langle \mathbf{u}_3, \mathbf{g}_1 \rangle \mathbf{g}_1 - \langle \mathbf{u}_3, \mathbf{g}_2 \rangle \mathbf{g}_2$;
4. o último vetor da base ortogonal é $\mathbf{g}_t = \frac{\mathbf{v}_t}{\|\mathbf{v}_t\|}$, em que $\mathbf{v}_t = \mathbf{u}_t - \langle \mathbf{u}_t, \mathbf{g}_1 \rangle \mathbf{g}_1 - \dots - \langle \mathbf{u}_t, \mathbf{g}_{t-1} \rangle \mathbf{g}_{t-1}$.

Para este trabalho define-se $t = 7$, ou seja, o espaço vetorial inicial possui sete vetores em que u_1 é definido pelas concentrações de cálcio sujeitas às transformações propostas, elevadas ao primeiro grau do polinômio, ou seja zero, até

u_7 em que se tem as concentrações de cálcio transformadas elevadas ao grau $p - 1$ do polinômio, ou seja, 6º grau. Sendo assim, salienta-se que cada concentração de cálcio transformada terá sua própria matriz de polinômios ortogonais.

A matriz definida por $\boldsymbol{\xi}\mathbf{G}$, que representa os perfis médios de respostas dos grupos nas diferentes concentrações de cálcio, será à semelhança de \mathbf{B} e pode ser escrita por:

$$\mathbf{B}_{g \times p} = \boldsymbol{\xi}\mathbf{G} = \begin{bmatrix} \beta_{11} & \beta_{12} & \cdots & \beta_{1p} \\ \vdots & \cdots & \cdots & \vdots \\ \beta_{g1} & \beta_{g2} & \cdots & \beta_{gp} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \boldsymbol{\beta}'_1 = \boldsymbol{\xi}'_1 \mathbf{G} \\ \vdots \\ \boldsymbol{\beta}'_g = \boldsymbol{\xi}'_g \mathbf{G} \end{bmatrix}. \quad (3.39)$$

Para cada uma das três situações descritas anteriormente, o termo genérico β_{ik} ($i = 1, \dots, g; k = 1, \dots, p$), denominando o i -ésimo grupo e a k -ésima concentração de cálcio:

1. Primeira situação

$$\beta_{ik} = \xi_{i0}t_k^0 + \dots + \xi_{i(p-1)}t_k^{p-1}. \quad (3.40)$$

2. Segunda situação

$$\beta_{ik} = \xi_{i0}(t_k - \bar{t})^0 + \dots + \xi_{i(p-1)}(t_k - \bar{t})^{p-1}. \quad (3.41)$$

3. Terceira situação

$$\beta_{ik} = \xi_{i0}\phi_0(t_k) + \dots + \xi_{i(p-1)}\phi_{p-1}(t_k) \quad (3.42)$$

com t_k correspondendo ao valor do k -ésimo nível de cálcio.

O MLMC é uma extensão do MLM, sendo assim, é admitida a utilização da técnica da MANOVA para os modelos de curvas de crescimento, que nesse caso será chamada de técnica da análise de variância multivariada para curvas de crescimento (GMANOVA).

Com o intuito de simplificar e obter a estimação da matriz dos parâme-

tros $\boldsymbol{\xi}$ e suas respectivas variâncias, Potthoff & Roy (1964) propõem um método de mudança de variável para o MLMC se transformar em um MLM. Tal transformação é dada pela Equação (3.43):

$$\mathbf{Y}^* = \mathbf{Y}\boldsymbol{\Delta}^{-1}\mathbf{G}'(\mathbf{G}\boldsymbol{\Delta}^{-1}\mathbf{G}')^{-1}, \quad (3.43)$$

com $\boldsymbol{\Delta}_{p \times p}$, sendo uma matriz simétrica qualquer e positiva definida ou não singular e $(\mathbf{G}\boldsymbol{\Delta}^{-1}\mathbf{G}')^{-1}$ com posto completo e de ordem $q \times q$. Empregando esta transformação proposta, tem-se que:

$$E(\mathbf{Y}^*) = \mathbf{X}\boldsymbol{\xi} \quad (3.44)$$

e sua matriz de covariâncias não singular é dada por:

$$Var(\mathbf{Y}^*) = \boldsymbol{\Sigma}^* = (\mathbf{G}\boldsymbol{\Delta}'^{-1}\mathbf{G}')^{-1}\mathbf{G}\boldsymbol{\Delta}'^{-1}\boldsymbol{\Sigma}\boldsymbol{\Delta}^{-1}\mathbf{G}'(\mathbf{G}\boldsymbol{\Delta}'^{-1}\mathbf{G}')^{-1} \otimes \mathbf{I}_n. \quad (3.45)$$

Portanto, o modelo resultante das observações transformadas será um modelo linear multivariado com $(\mathbf{Y}^*, \mathbf{X}\boldsymbol{\xi}, \boldsymbol{\Sigma}^*)$.

A matriz \mathbf{Y}^* possui linhas independentes com distribuição normal multivariada e, dessa forma, é possível utilizar diretamente os resultados da MANOVA para realizar a inferência dos parâmetros. Assim, tem-se que:

$$\hat{\boldsymbol{\xi}} = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'\mathbf{Y}^* = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'\mathbf{Y}\boldsymbol{\Delta}^{-1}\mathbf{G}'(\mathbf{G}\boldsymbol{\Delta}^{-1}\mathbf{G}')^{-1} \quad (3.46)$$

é um estimador não viciados de $\boldsymbol{\xi}$ obtidos por meio do método da máxima verossimilhança ou dos mínimos quadrados com variância dada por:

$$Var(\hat{\boldsymbol{\xi}}) = (\mathbf{G}\boldsymbol{\Delta}' - \mathbf{1}\mathbf{G}')^{-1}\mathbf{G}\boldsymbol{\Delta}'^{-1}\boldsymbol{\Sigma}\boldsymbol{\Delta}^{-1}\mathbf{G}'(\mathbf{G}\boldsymbol{\Delta}'^{-1}\mathbf{G}')^{-1} \otimes (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}. \quad (3.47)$$

Duas situações para a matriz $\boldsymbol{\Sigma}$ são descritas por Potthoff & Roy (1964):

1. Quando a matriz $\boldsymbol{\Sigma}$ for conhecida, $\boldsymbol{\Delta} = \boldsymbol{\Sigma}$ é uma escolha ótima, pois $\boldsymbol{\Sigma}$ é não

viciada e com variância mínima.

2. Quando a matriz Σ é desconhecida, mesmo que $\hat{\xi}$ obtido for não viciado, para qualquer que seja Δ , sua variância aumentará conforme Δ^{-1} se afasta de Σ^{-1} .

Como outra alternativa para a escolha de Σ , Khatri (1966) sugere que quando a matriz Σ é desconhecida e não estruturada, pode-se fazer $\Delta = \mathbf{S}$, a qual é uma estimativa de Σ obtida por meio das observações e dada por:

$$\mathbf{S} = (n.. - g)^{-1} \mathbf{Y}' [\mathbf{I} - \mathbf{X}' (\mathbf{X}' \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}] \mathbf{Y}. \quad (3.48)$$

Neste trabalho, utiliza-se o método proposto por Khatri (1966) e Singer (1977), em que o ajuste do MLMC requer que a matriz \mathbf{G}' seja particionada em \mathbf{G}'_1 e \mathbf{G}'_2 , cujas dimensões são $p \times q$ e $p \times (p - q)$, respectivamente, com postos $\mathbf{G}'_1 = q$ e $\mathbf{G}'_2 = p - q$, de forma que $\mathbf{G} \mathbf{G}_1 = \mathbf{I}_q$ e $\mathbf{G} \mathbf{G}_2 = \mathbf{0}_{q \times (p-q)}$.

Para o teste do ajuste do modelo, Grizzle & Allen (1969) sugerem a seguinte transformação:

$$[\mathbf{Y}_1 \mid \mathbf{Y}_2] = \mathbf{Y} [\mathbf{G}_1 \mid \mathbf{G}_2], \quad (3.49)$$

cujos valores esperados são:

$$E [\mathbf{Y}_1 \mid \mathbf{Y}_2] = [\mathbf{X} \boldsymbol{\xi} \mathbf{G} \mathbf{G}_1 \mid \mathbf{X} \boldsymbol{\xi} \mathbf{G} \mathbf{G}_2] = \mathbf{X} [\boldsymbol{\xi} \mid \mathbf{W}], \quad (3.50)$$

em que $\mathbf{W} = \mathbf{0}$ se o modelo ajustado for adequado.

Neste sentido, o teste estatístico de hipótese para o ajuste do polinômio tem como hipótese nula:

$$H_0 : E(\mathbf{Y}_2) = \mathbf{X} \boldsymbol{\xi} \mathbf{G} \mathbf{G}_2 = \mathbf{0}, \quad (3.51)$$

equivalentemente a

$$H_0 : \mathbf{CBU} = \mathbf{0}, \quad (3.52)$$

tendo $\mathbf{C} = \mathbf{I}_g$ e $\mathbf{U} = \mathbf{G}_2$.

Na partição da matriz \mathbf{G} , \mathbf{G}_1 fica com os coeficientes dos polinômios correlatos ao grau do polinomial resultante do ajuste, ou seja, o grau desejado para o modelo e \mathbf{G}_2 fica com os coeficientes do grau do polinômio que não se tem interesse em manter no MLMC, isto é, os polinômios que serão descartados. As estatísticas do teste são obtidas por:

$$\mathbf{E} = \mathbf{G}'_2 \mathbf{S} \mathbf{G}_2 \quad (3.53)$$

e

$$\mathbf{H} = \mathbf{G}'_2 \mathbf{Y}' \mathbf{X} (\mathbf{X}' \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}' \mathbf{Y} \mathbf{G}_2, \quad (3.54)$$

tendo sua adequação verificada pelo critério da razão de verossimilhança (RV) generalizada de Wilks obtido por:

$$\Lambda = \frac{|\mathbf{E}|}{|\mathbf{H} + \mathbf{E}|} \quad (3.55)$$

e seu teste é dado por:

$$-\left[n_{..} - g - \frac{1}{2}(p - g) \right] \ln \Lambda, \quad \text{com distribuição } \chi^2_{(g \times (p-1))}. \quad (3.56)$$

Para a decisão acerca do grau do modelo polinomial mais adequado para descrever o comportamento das variáveis respostas TD e TR, foram utilizados os seguintes passos para cada uma das classes polinomiais não usuais avaliadas:

1. O processo inicia-se com o grau polinomial mais alto que pode ser ajustado como modelo preditivo. Nesse caso, é dado por $(p - 2)$, ou seja, 5^o grau.
2. Faz-se o teste da RV para o grau do modelo que está sendo ajustado. Se o resultado for significativo, tem-se a necessidade desse grau polinomial para a predição do fenômeno e, caso contrário, passa-se para o grau $(p - 3)$, ou seja, 4^o grau para a análise de significância.
3. Este procedimento é repetido toda vez que não se verificar a significância do

resultado do teste.

4. Define-se como modelo de ajuste dos dados o modelo anterior àquele que tiver o resultado do ajuste do teste de grau polinomial mais baixo significativo e mais simples quanto à expressão matemática.

Após a definição do grau do polinômio do modelo, segundo Souza (1989), deve-se, então, obter as estimativas de ξ e $Var(\xi)$ a partir das expressões a seguir:

$$\hat{\xi} = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'\mathbf{Y}\mathbf{S}^{-1}\mathbf{G}'_1(\mathbf{G}_1\mathbf{S}^{-1}\mathbf{G}'_1)^{-1} \quad (3.57)$$

e

$$\widehat{Var}(\hat{\xi}) = \frac{n-g-1}{n-g-(p-q)-1} * \frac{1}{n-g-(p-q)} * (\mathbf{G}_1\mathbf{S}^{-1}\mathbf{G}'_1)^{-1} \otimes (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}. \quad (3.58)$$

A matriz de covariâncias de $\hat{\xi}$ é dada por:

$$\widehat{Var}(\hat{\xi}) = \begin{bmatrix} \widehat{Var}(\hat{\xi}_1) & \phi & \phi & \phi \\ \phi & \widehat{Var}(\hat{\xi}_2) & \phi & \phi \\ \phi & \phi & \ddots & \phi \\ \phi & \phi & \phi & \widehat{Var}(\hat{\xi}_g) \end{bmatrix}, \quad (3.59)$$

com $\widehat{Var}(\hat{\xi}_i)$ de ordem $g \times (q+1)$ para $i = 1, \dots, g$.

Como $\hat{\beta}_i = \hat{\xi}'_i \mathbf{G}_1$ tem-se que:

$$\widehat{Var}(\hat{\beta}_i) = \widehat{Var}(\hat{\xi}'_i \mathbf{G}_1) = \mathbf{G}'_1 \widehat{Var}(\hat{\xi}_i) \mathbf{G}_1. \quad (3.60)$$

Após selecionados os modelos utilizados para descrever o comportamento das variáveis mecânicas TD e TR via MLMC, houve interesse em construir o intervalo de confiança simultâneo de Hotelling (ICS) para as estimativas das diferenças de médias entre os grupos estudados nas sete concentrações de cálcio, a fim de identificar em quais concentrações de cálcio estas são significativas. O ICS é obtido

da seguinte maneira:

$$\mathbf{a}'(\boldsymbol{\beta}_i - \boldsymbol{\beta}_{i'}) = \mathbf{a}'(\hat{\boldsymbol{\beta}}_i - \hat{\boldsymbol{\beta}}_{i'}) \pm c\sqrt{\mathbf{a}'\mathbf{G}'_1[\widehat{Var}(\hat{\boldsymbol{\xi}}_i) + \widehat{Var}(\hat{\boldsymbol{\xi}}_{i'})]\mathbf{G}_1\mathbf{a}} \quad (3.61)$$

com $\mathbf{a}' = [a_1, \dots, a_p]$ formado apenas por números binários, no qual um indica os pares de médias que estão sendo avaliados. A constante c é dada por:

$$c = \sqrt{\frac{(n_i + n_{i'} - 2)p}{n_i + n_{i'} - p - 1} * F_{(\alpha; p; n_i + n_{i'} - p - 1)}}. \quad (3.62)$$

O ICS avalia as diferenças dos grupos nas concentrações de cálcio, ou seja, se existe a presença do valor zero dentro de cada um dos ICS estudados. Caso o valor esteja contido, conclui-se que a diferença de médias é não significativa, ou seja, as médias comparadas são estatisticamente iguais, porém, se o valor zero estiver fora do intervalo, há evidências de que as médias testadas diferem entre si.

Para a verificação da adequabilidade dos modelos selecionados, considera-se a soma de quadrados dos desvios (SQD) entre as médias amostrais e estimadas pelos modelos ajustados. Quanto menor for o valor da SQD, mais próximo do comportamento biológico das respostas estará o modelo em consideração, isto é, maior adequabilidade do preditor ao fenômeno biológico.

4 RESULTADOS

Para a realização dos procedimentos analíticos na presente pesquisa, utilizam-se quatro grupos experimentais resultante da combinação de dois fatores de interesse (cirurgia e dieta) cujas variáveis biológicas TD e TR são mensuradas em sete diferentes concentrações de cálcio tendo como vetor de resposta as medidas de cada um dos ratos considerado como a unidade experimental multivariada. O procedimentos estatísticos realizados, neste trabalho, foram executados no *software* R Core Team (2018) versão 3.4.4.

4.1 Medidas descritivas

A estrutura esquemática dos quatro grupos e os seus respectivos tamanhos amostrais para as variáveis TD e TR são apresentados no Quadro 3.

Quadro 3: Estrutura dos grupos experimentais

Grupo	Cirurgia	Dieta	Número de animais
G1	E Ao	Normolipídica	12
G2	E Ao	Hiperlipídica	13
G3	Sham	Normolipídica	13
G4	Sham	Hiperlipídica	14

Pelo Quadro 3, pode-se observar que o experimento refere-se a dados não balanceados em que G1 possui 12 animais, G2 e G3 com 13 e G4 com 14 totalizando em 52 animais, tanto para a TD quanto para a TR. Essa não igualdade de

tamanho amostral nos grupos, justifica-se pelas eventuais perdas e possíveis descartes pelo critério de inclusão do animal ao estudo.

As medidas descritivas (média e desvio padrão) são apresentadas segundo as concentrações de cálcio administradas nos quatro diferentes grupos.

Tabela 4.1: Média e desvio padrão da TD segundo a concentração de cálcio (mM) e grupos

Grupo	Medida Descritiva	Concentrações de cálcio (mM)						
		0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
G1	Média	4,465	4,717	5,153	5,385	5,618	5,811	5,930
	Desvio Padrão	0,738	0,799	0,861	0,852	0,877	0,911	0,962
G2	Média	4,414	4,757	5,212	5,491	5,701	5,873	5,987
	Desvio Padrão	1,500	1,703	1,817	1,920	1,917	1,976	2,144
G3	Média	4,666	5,193	5,713	5,978	6,193	6,350	6,423
	Desvio Padrão	1,225	1,397	1,472	1,494	1,543	1,648	1,638
G4	Média	4,087	4,693	5,259	5,665	5,903	6,071	6,188
	Desvio Padrão	1,218	1,354	1,383	1,396	1,353	1,296	1,288

É possível observar, na Tabela 4.1, que a média da variável mecânica TD para todos os grupos avaliados é crescente em valor, de acordo com o aumento das concentrações de cálcio; indicando um modelo contínuo de crescimento por unidade de cálcio, como resposta funcional da TD em relação às concentrações. O mesmo crescimento é observado para o desvio padrão em G1, G2 e G3, excetuando-se as concentrações 2,0, 2,5 e 3,5 de cada grupo respectivamente. Para o G4, o desvio padrão apresenta aumento em seu valor até a concentração 2,0 mM, tendo queda nas concentrações três últimas concentrações.

Pode-se, também, observar que ocorrem valores de média mais altos nas concentrações no G1 e G3, logo os mais baixos ocorrem em G2 e G4.

A Figura 4.1 apresenta o perfil médio de respostas da variável TD para

os grupos estudados.

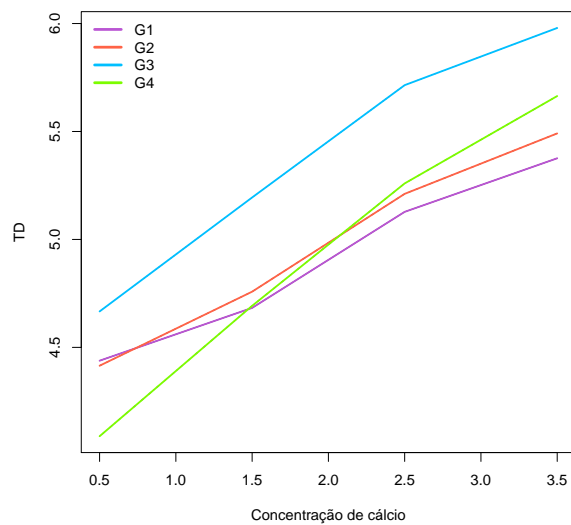


Figura 4.1: Gráfico do perfil das médias dos grupos de G1, G2, G3 e G4 para a variável TD.

A seguir são apresentadas as medidas descritivas (média e desvio padrão) da variável TR para cada um dos quatro grupos avaliados.

Tabela 4.2: Média e desvio padrão da TR segundo a concentração de cálcio (mM) e grupos

Grupo	Medida Descritiva	Concentração de cálcio (mM)						
		0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
G1	Média	0,918	0,831	0,819	0,814	0,812	0,803	0,790
	Desvio Padrão	0,408	0,386	0,382	0,380	0,373	0,373	0,360
G2	Média	0,986	0,885	0,872	0,855	0,855	0,853	0,845
	Desvio Padrão	0,296	0,255	0,256	0,269	0,255	0,243	0,245
G3	Média	0,554	0,514	0,506	0,498	0,491	0,488	0,479
	Desvio Padrão	0,131	0,122	0,112	0,112	0,122	0,124	0,122
G4	Média	0,589	0,528	0,514	0,506	0,503	0,510	0,500
	Desvio Padrão	0,216	0,182	0,177	0,174	0,176	0,184	0,195

Na Tabela 4.2 são apresentadas as medidas descritivas da variável funcional TR para os quatro grupos. Observa-se que para todos os grupos conforme aumentam os valores das concentrações de cálcio, decrescem os valores das médias da variável; com exceção de G4 na concentração 3,0 mM em que ocorre um pequeno aumento. Nesta variável, a relação funcional indica o crescimento negativo, ou seja, decrescimento à medida que há a elevação da concentração de cálcio. Verifica-se, também, que G1 e G2 apresentam médias superiores as encontradas em G3 e G4. Para o desvio padrão, pode notar pouca variabilidade nos valores de TR ao longo das concentrações dentro de cada grupo estudado.

A Figura 4.2 apresenta o perfil médio de respostas da variável TR para os grupos estudados.

Tabela 4.4: Matriz de correlação da variável TR nas concentrações de cálcio (mM)

	Ca						
Ca	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
0,5	1,000	0,984	0,984	0,986	0,986	0,985	0,962
1,0		1,000	0,998	0,997	0,997	0,995	0,990
1,5			1,000	0,998	0,998	0,996	0,991
2,0				1,000	0,997	0,995	0,989
2,5					1,000	0,997	0,994
3,0						1,000	0,986
3,5							1,000

As correlações lineares de Pearson para as variáveis TD e TR nas diferentes concentrações de cálcio, apresentaram resultados altamente significativos ($p < 0,001$) entre todos os possíveis pares analisados de concentrações.

Destaca-se que os valores são muito próximos, indicando uma certa estabilidade na associação, independente da concentração observada, tendo as matrizes aproximadamente uma estrutura de equicorrelação.

4.2 Modelo linear multivariado

Inicialmente, para o procedimento multivariado da comparação dos dois fatores foram verificadas as suposições básicas para a aplicação da técnica da MANOVA

Os gráficos Q-Q são apresentados para cada grupo formado a partir da combinação dos fatores cirurgia e dieta. A normalidade multivariada foi verificada por meio da inspeção visual do gráfico Q-Q cujo eixo da ordenada apresenta o quantil da distribuição qui-quadrado e o eixo da abscissa as distâncias de Mahalanobis em ordem crescente de valor.

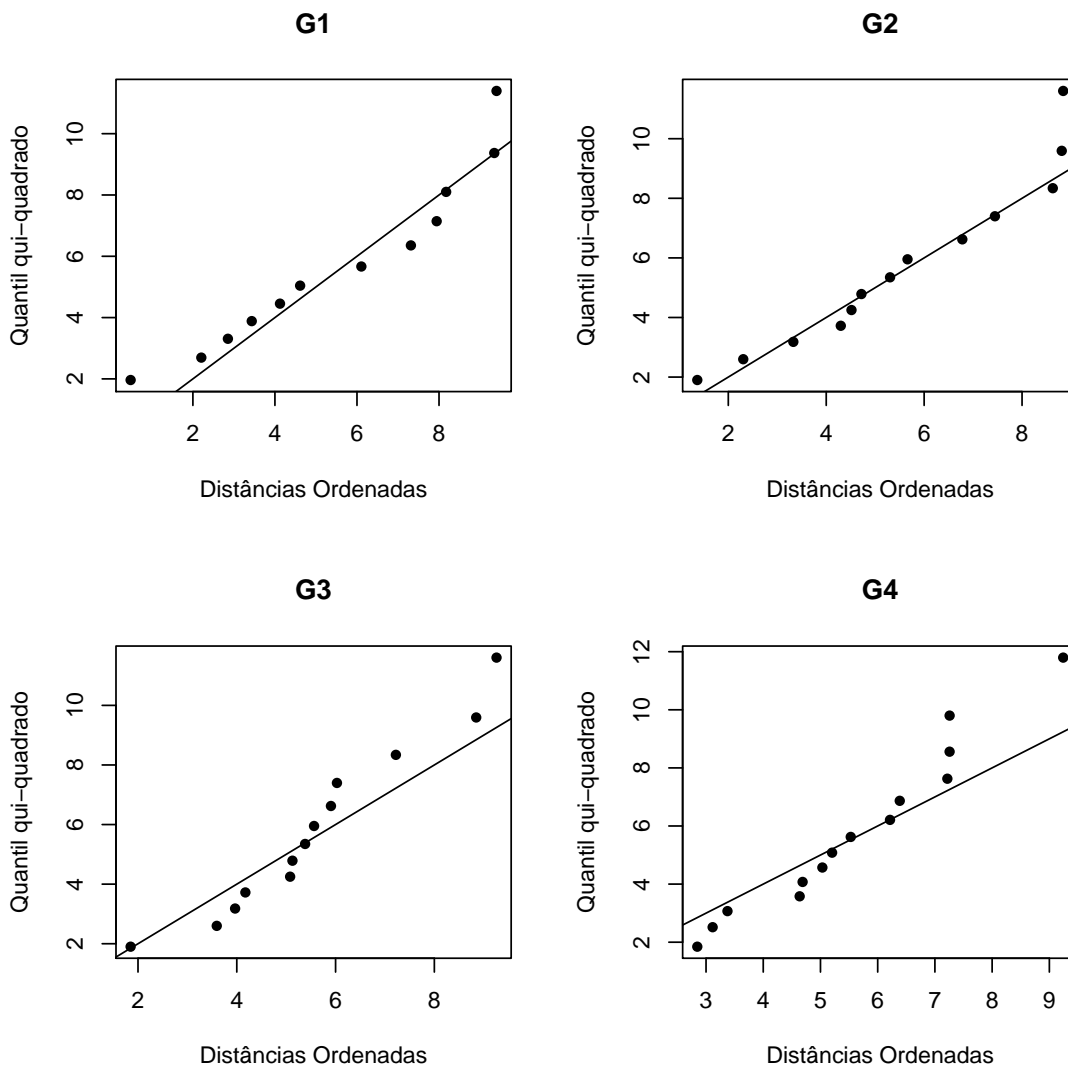


Figura 4.3: Gráfico Q-Q de G1, G2, G3 e G4 para a variável TD.

A Figura 4.3 apresenta o gráfico Q-Q da variável TD para os quatro grupos estudados, na qual é possível observar que em todos os grupos a configuração dos pontos se aproxima de uma tendência linear, indicando que a suposição de normalidade multivariada pode ser considerada satisfeita.

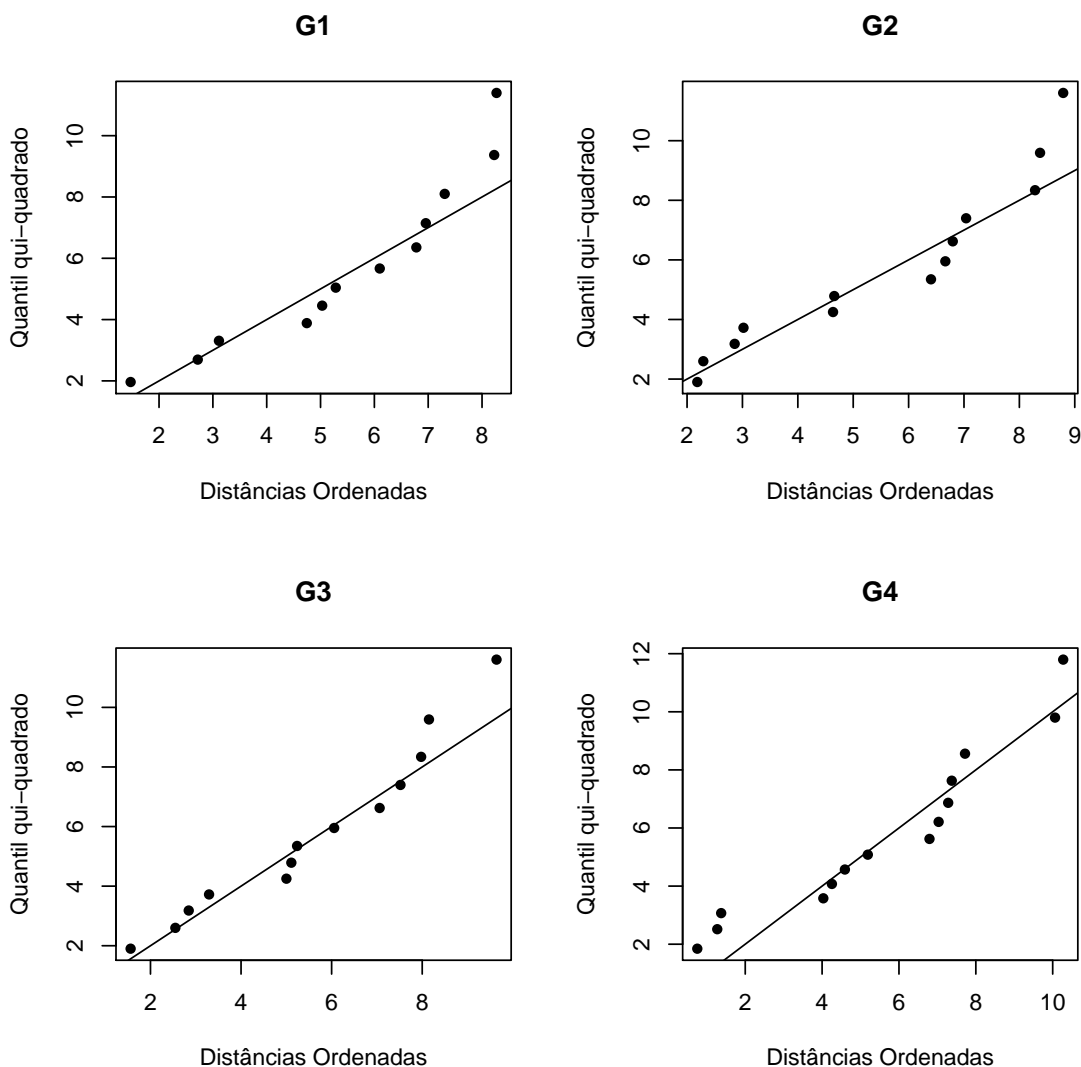


Figura 4.4: Gráfico Q-Q de G1, G2, G3 e G4 para a variável TR.

A Figura 4.4 apresenta o gráfico Q-Q para os grupos estudados considerando a variável mecânica TR, sendo possível observar um comportamento próximo a uma reta para os quatro grupos analisados, assegurando assim, a possível existência de normalidade multivariada dos dados.

A homogeneidade das matrizes de covariâncias dos grupos foi verificada pela extensão do teste univariado de Levene a partir das raízes quadradas positivas da soma das diferenças absolutas das unidades experimentais, em relação a mediana

de grupo, realizada para cada uma das variáveis mecânicas do estudo por meio da técnica ANOVA para o modelo com o fator grupo em quatro níveis.

O resultado do teste de homogeneidade para a variável TD não indicou a rejeição da hipótese nula, ou seja, é assegurada que há homogeneidade das matrizes de variâncias ao nível de 5% de significância, tendo apresentado valor da estatística $F = 2,091$ com valor- $p = 0,113$. Para a variável mecânica TR o valor obtido na estatística foi de $F = 2,368$ e valor- $p = 0,082$ havendo, assim, indicativo de que as matrizes de variância associadas aos grupos são homogêneas.

Os resultados obtidos para a técnica da MANOVA para a variável TD estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Resultado do modelo de análise de variância multivariada para a variável TD

Fonte de Variação	Valor da estatística	Valor-p
Cirurgia	0,739	0,062
Dieta	0,784	0,148
Cirurgia e Dieta	0,942	0,916

O resultado obtido para a interação apresentou-se não significativo ($p > 0,05$), o que indica que os fatores principais podem ser considerados isoladamente e os seus níveis comparados entre si. O resultado do teste para os fatores isolados dieta e cirurgia não apresentaram significâncias ($p > 0,05$), ou seja, não foi possível detectar diferenças entre os vetores de médias nas dietas administradas. Portanto, o procedimento cirúrgico com a colocação ou não do clipe não apresentou resultado significativo para a variável TD. Contudo, sob o ponto de vista prático, há indicativo biológico da evidência clínica da cirurgia ($p = 0,062$) e pouco provável para a dieta ($p = 0,148$).

Tabela 4.6: Resultado do modelo de análise de variância multivariada para a variável TR

Fonte de Variação	Valor da estatística	Valor-p
Cirurgia	0,629	0,004
Dieta	0,852	0,420
Cirurgia e Dieta	0,932	0,873

Na MANOVA apresentada na Tabela 4.6 para a variável TR, é possível observar que o resultado da interação entre cirurgia e dieta não é significativo ($p > 0,05$). O fator dieta, também, não apresentou diferença significativa em seus níveis ($p > 0,05$). Há diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para o fator cirurgia, ou seja, os animais EAO e Sham possuem perfis médios de respostas diferentes.

Com o indicativo de que existe diferença nos componentes médios vectoriais do fator cirurgia em seus níveis nas diferentes concentrações cálcio para a variável TR, realizaram-se os limites de confiança simultâneos de Hotelling apresentados na Tabela 4.7 a fim de identificar em quais pares de concentração de cálcio ocorreram as diferenças.

Tabela 4.7: Limites do intervalo de 95% de confiança simultâneo para as diferenças de médias da variável TR para o fator cirurgia em cada concentração de cálcio

Limite	Concentrações de cálcio						
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
Inferior	0,328	0,295	0,295	0,292	0,296	0,290	0,288
Superior	0,435	0,381	0,379	0,377	0,379	0,371	0,368

A partir da Tabela 4.7 constata-se que o valor zero não está contido nos intervalos de confiança para todas as concentrações, ou seja, pode-se observar os resultados significativos ($p < 0,05$) para todos os pares de comparações de médias, concluindo-se que, em todas as concentrações, as respostas médias dos animais

submetidos à EAo apresentam valores médios maiores que os animais Sham caracterizando uma situação de prejuízo em algumas funções do coração.

4.3 Modelo Linear Multivariado de Crescimento

Empregou-se a técnica de análise de variância multivariada para curvas de crescimento (GMANOVA) proposta por Potthoff & Roy (1964) para o estudo longitudinal envolvendo toda a estrutura de variabilidade nas diferentes concentrações de cálcio avaliadas ao longo da manobra proposta, como também, a obtenção de um modelo polinomial que caracterizasse as respostas biológicas das variáveis mecânicas TD e TR nos quatro grupos

As Tabelas 4.1 e 4.2 mostram respectivamente que o comportamento crescente da TD é caracterizado pelo aumento da concentração de cálcio, enquanto que para a variável TR, seu comportamento decresce com o aumento do cálcio.

Necessita-se da matriz \mathbf{G} formada pelos coeficientes dos polinômios ortogonais para a realização dos testes do ajuste do modelo para as seis relações funcionais avaliadas.

Para as concentrações de cálcio tomadas nos valores originais, com o espaçamento de 0,5 mM, foram utilizados os coeficientes dos polinômios ortogonais das concentrações de cálcio, que estão disponíveis em Montgomery (2004).

Quando as concentrações de cálcio foram algebricamente transformadas, não é possível assegurar a existência do equiespaçamento entre as doses consecutivas. Neste sentido, houve a necessidade de gerar os elementos polinomiais para comporem a matriz \mathbf{G}' , os quais foram obtidos pelo processo de ortonormalização de Gram-Schmidt. As matrizes dos coeficientes para cada uma das situações são apresentadas a seguir:

1. Concentração de cálcio (Ca)

$$\mathbf{G}' = \begin{bmatrix} 1 & -3 & 5 & -1 & 3 & -1 & 1 \\ 1 & -2 & 0 & 1 & -7 & 4 & -6 \\ 1 & -1 & -3 & 1 & 1 & -5 & 15 \\ 1 & 0 & -4 & 0 & 6 & 0 & -20 \\ 1 & 1 & -3 & -1 & 1 & 5 & 15 \\ 1 & 2 & 0 & -1 & -7 & -4 & -6 \\ 1 & 3 & 5 & 1 & 3 & 1 & 1 \end{bmatrix}.$$

2. Raiz quadrada da concentração de cálcio (\sqrt{Ca})

$$\mathbf{G}' = \begin{bmatrix} -0,3780 & -0,6462 & 0,5601 & -0,3254 & 0,1355 & -0,0399 & -0,0074 \\ -0,3780 & -0,3569 & -0,1835 & 0,5753 & -0,5305 & 0,2775 & 0,0822 \\ -0,3780 & -0,1350 & -0,4195 & 0,2288 & 0,3931 & -0,5933 & -0,3226 \\ -0,3780 & 0,0521 & -0,3930 & -0,2351 & 0,3870 & 0,3366 & 0,6178 \\ -0,3780 & 0,2170 & -0,1985 & -0,4452 & -0,1924 & 0,3744 & -0,6287 \\ -0,3780 & 0,3660 & 0,1152 & -0,2434 & -0,5089 & -0,5332 & 0,3278 \\ -0,3780 & 0,5030 & 0,5192 & 0,4451 & 0,3162 & 0,1779 & -0,0691 \end{bmatrix}.$$

3. Inverso da concentração de cálcio ($\frac{1}{Ca}$)

$$\mathbf{G}' = \begin{bmatrix} -0,3780 & 0,8479 & 0,3656 & -0,0376 & 0,0560 & -0,0036 & -0,0002 \\ -0,3780 & 0,1745 & -0,6883 & 0,2703 & -0,5093 & 0,1421 & 0,0184 \\ -0,3780 & -0,0499 & -0,3734 & -0,1073 & 0,5309 & -0,6212 & -0,1895 \\ -0,3780 & -0,1622 & -0,0911 & -0,0458 & 0,5087 & 0,6060 & 0,4409 \\ -0,3780 & -0,2295 & 0,1183 & -0,8002 & -0,3871 & -0,0156 & 0,0009 \\ -0,3780 & -0,2744 & 0,2745 & 0,2834 & 0,0168 & 0,2783 & -0,7406 \\ -0,3780 & -0,3064 & 0,3943 & 0,4372 & -0,2160 & -0,3860 & 0,4700 \end{bmatrix}.$$

4. Inverso da raiz quadrada da concentração de cálcio $\left(\frac{1}{\sqrt{Ca}}\right)$

$$\mathbf{G}' = \begin{bmatrix} -0,3780 & -0,7957 & 0,4551 & -0,1280 & 0,0218 & -0,0024 & -0,0001 \\ -0,3780 & -0,2486 & -0,5568 & 0,6316 & -0,2852 & 0,0700 & 0,0092 \\ -0,3780 & -0,0063 & -0,4342 & -0,2687 & 0,6609 & -0,3869 & -0,0992 \\ -0,3780 & 0,1382 & -0,1943 & -0,4613 & -0,0887 & 0,6537 & 0,3902 \\ -0,3780 & 0,2368 & 0,0409 & -0,2880 & -0,4725 & -0,1098 & -0,6936 \\ -0,3780 & 0,3096 & 0,2518 & 0,0518 & -0,2623 & -0,5486 & 0,5705 \\ -0,3780 & 0,3661 & 0,4375 & 0,4627 & 0,4260 & 0,3239 & -0,1768 \end{bmatrix}.$$

5. Logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade $(\ln(Ca+1))$

$$\mathbf{G}' = \begin{bmatrix} -0,3780 & -0,6573 & 0,5562 & -0,3144 & 0,1251 & -0,0344 & -0,0058 \\ -0,3780 & -0,3577 & -0,2116 & 0,5948 & -0,5147 & 0,2478 & 0,0659 \\ -0,3780 & -0,1254 & -0,4381 & 0,1879 & 0,4469 & -0,5800 & -0,2794 \\ -0,3780 & 0,0645 & -0,3839 & -0,2803 & 0,3393 & 0,4108 & 0,5858 \\ -0,3780 & 0,2250 & -0,1702 & -0,4399 & -0,2558 & 0,3016 & -0,6540 \\ -0,3780 & 0,3641 & 0,1393 & -0,1968 & -0,4762 & -0,5481 & 0,3733 \\ -0,3780 & 0,4867 & 0,5081 & 0,4486 & 0,3353 & 0,2023 & -0,0859 \end{bmatrix}.$$

6. Inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade

$$\left(\frac{1}{\ln(Ca+1)}\right)$$

$$\mathbf{G}' = \begin{bmatrix} -0,3780 & 0,8417 & 0,3783 & -0,0740 & 0,0082 & -0,0006 & 0,0000 \\ -0,3780 & 0,1839 & -0,6694 & 0,5780 & -0,1995 & 0,0366 & -0,0035 \\ -0,3780 & -0,0418 & -0,3841 & -0,4339 & 0,6539 & -0,2975 & 0,0599 \\ -0,3780 & -0,1582 & -0,1084 & -0,4574 & -0,2639 & 0,6668 & -0,3112 \\ -0,3780 & -0,2302 & 0,1060 & -0,1974 & -0,4843 & -0,2659 & 0,6699 \\ -0,3780 & -0,2796 & 0,2726 & 0,1293 & -0,1637 & -0,5085 & -0,6345 \\ -0,3780 & -0,3159 & 0,4050 & 0,4553 & 0,4491 & 0,3691 & 0,2194 \end{bmatrix}.$$

A seguir, na Tabela 4.8, são apresentados os resultados estatísticos relativos aos graus dos polinômios para os seis modelos propostos.

Tabela 4.8: Valor-p da estatística de teste (RV) para os graus do polinômio para a TD segundo o modelo polinomial proposto

Polinômio	Grau do polinômio					
	5 ^o	4 ^o	3 ^o	2 ^o	1 ^o	0 ^o
Ca	0,0143	0,0006	0,0016	0,0003	< 0,0001	< 0,0001
\sqrt{Ca}	0,5214	0,0320	0,0002	0,0001	< 0,0001	< 0,0001
$\frac{1}{Ca}$	0,6071	0,2823	0,3736	0,5766	< 0,0001	< 0,0001
$\frac{1}{\sqrt{Ca}}$	0,9845	0,7356	0,4151	0,0035	< 0,0001	< 0,0001
$\ln(Ca + 1)$	0,7180	0,0719	0,0012	0,0003	< 0,0001	< 0,0001
$\frac{1}{\ln(Ca+1)}$	0,9548	0,8706	0,5713	0,5446	< 0,0001	< 0,0001

A partir dos resultados da Tabela 4.8 é possível observar a significância dos polinômios avaliados do 5^o ao 1^o grau. Em relação à significância do polinômio que utiliza a concentração de cálcio original (Ca), este é significativo para todos os graus avaliados. Já no modelo que envolve a raiz quadrada da concentração de cálcio (\sqrt{Ca}), a significância se dá a partir do 4^o até o 1^o grau. Para o inverso da concentração de cálcio ($\frac{1}{Ca}$) e para o polinômio associado ao inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade $\frac{1}{\ln(Ca+1)}$, os valores-p foram significativos apenas para o 1^o grau. O polinômio, definido como o inverso da raiz quadrada da concentração de cálcio ($\frac{1}{\sqrt{Ca}}$), teve os ajustes dos modelos a partir do grau 2 sendo significativos; já para o logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade ($\ln(Ca + 1)$) a significância ocorre nos polinômio de 3^o, 2^o e 1^o graus. Diante deste contexto, os ajustes realizados com os polinômios inverso da concentração de cálcio ($\frac{1}{Ca}$) e inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade ($\frac{1}{\ln(Ca+1)}$) foram os de menor grau encontrados para descrever o comportamento da variável TD, sendo caracterizados por um polinômio de grau 2.

Para os modelos selecionados para a variável TD são apresentadas as

respectivas matrizes de parâmetros estimados e seus desvios padrão:

1. Matriz dos parâmetros estimados para o modelo polinomial inverso da concentração de cálcio ($\frac{1}{Ca}$):

$$\hat{\xi} = \begin{bmatrix} -13,982 & -1,167 & 0,483 \\ -14,125 & -1,285 & 0,484 \\ -15,323 & -1,520 & 0,494 \\ -14,517 & -1,797 & 0,568 \end{bmatrix}. \quad (4.1)$$

A primeira linha da matriz corresponde aos coeficientes polinomiais do modelo da resposta média da variável mecânica TD para G1, na segunda linha estão os coeficientes polinomiais de G2, na terceira de G3 e na quarta de G4, determinando assim, os polinômios de 2^o grau no inverso da concentração de cálcio.

Apresenta-se a matriz dos desvios padrão estimados das estimativas dos parâmetros:

$$\widehat{DP}(\xi) = \begin{bmatrix} 0,162 & 0,023 & 0,012 \\ 0,156 & 0,022 & 0,012 \\ 0,156 & 0,022 & 0,012 \\ 0,150 & 0,021 & 0,011 \end{bmatrix}. \quad (4.2)$$

Com base no modelo polinomial inverso da concentração de cálcio, foram estabelecidas as médias estimadas para a variável TD para cada concentração de cálcio.

Tabela 4.9: Médias da TD obtidas a partir polinômio de 2º grau em $\frac{1}{Ca}$

Grupo	Concentrações de cálcio						
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
G1	4,471	4,748	5,162	5,430	5,609	5,737	5,833
G2	4,425	4,780	5,221	5,503	5,691	5,824	5,924
G3	4,683	5,186	5,682	5,993	6,198	6,344	6,452
G4	4,170	4,782	5,364	5,726	5,966	6,136	6,261

2. Matriz dos parâmetros estimados para o modelo polinomial inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade $\frac{1}{\ln(Ca+1)}$:

$$\hat{\xi} = \begin{bmatrix} -13,949 & -1,187 & 0,494 \\ -14,094 & -1,307 & 0,496 \\ -15,267 & -1,531 & 0,494 \\ -14,487 & -1,827 & 0,580 \end{bmatrix}. \quad (4.3)$$

A primeira linha da matriz 4.3 corresponde aos coeficientes polinomiais do modelo escolhido que permite realizar a estimação da resposta média da variável mecânica TD para G1 em qualquer que seja o nível de cálcio, analogamente, na segunda linha estão os coeficientes polinomiais de G2, terceira de G3 e a quarta de G4.

Na sequência, é apresentada a matriz dos desvios padrão estimados das estimativas dos parâmetros:

$$\widehat{DP}(\xi) = \begin{bmatrix} 0,162 & 0,023 & 0,013 \\ 0,156 & 0,022 & 0,012 \\ 0,156 & 0,022 & 0,012 \\ 0,150 & 0,022 & 0,012 \end{bmatrix}. \quad (4.4)$$

A partir do modelo polinomial inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade obtido para os grupos estabeleceram-se médias estimadas para a variável TD em cada uma das concentrações de cálcio.

Tabela 4.10: Médias da TD obtidas a partir do polinômio de 2^o grau em $\frac{1}{\ln(Ca+1)}$

Grupo	Concentrações de cálcio						
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
G1	4,460	4,723	5,132	5,406	5,598	5,739	5,847
G2	4,414	4,754	5,191	5,480	5,680	5,827	5,941
G3	4,668	5,157	5,644	5,959	6,175	6,333	6,454
G4	4,157	4,750	5,328	5,701	5,957	6,144	6,288

Em prosseguimento, são apresentados os resultados das análises da variável mecânica TR quanto às curvas de crescimento.

Tabela 4.11: Valor-p da estatística de teste (RV) para os graus do polinômio para a TR segundo o modelo polinomial proposto

Polinômio	Grau do polinômio					
	5 ^o	4 ^o	3 ^o	2 ^o	1 ^o	0 ^o
Ca	0,4495	0,0032	0,0042	0,0001	< 0,001	< 0,0001
\sqrt{Ca}	0,8003	0,1066	0,0932	0,0015	0,0008	< 0,0001
$\frac{1}{Ca}$	0,1394	0,3441	0,2765	0,2437	0,1458	< 0,0001
$\frac{1}{\sqrt{Ca}}$	0,6495	0,3584	0,4469	0,1156	0,0350	< 0,0001
$\ln(Ca + 1)$	0,8066	0,1229	0,1044	0,0016	< 0,001	< 0,0001
$\frac{1}{\ln(Ca+1)}$	0,5439	0,3776	0,3961	0,2439	0,1324	< 0,0001

Pelos resultados da Tabela 4.11, pode-se notar que o valor-p, quando utilizado o modelo com a variável sem transformação (Ca), apresentou-se significativo a partir do modelo de 4^o grau.

Para os modelos com raiz quadrada da concentração de cálcio (\sqrt{Ca}) e logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade ($\ln(Ca + 1)$), os valores significativos se deram nos polinômios 1^o e 2^o graus.

Para os modelos inverso da concentração de cálcio ($\frac{1}{Ca}$) e inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade ($\frac{1}{\ln(Ca+1)}$) estes apresentaram p-valores significativos no grau zero.

Dessa forma, os modelos inverso da concentração de cálcio ($\frac{1}{Ca}$) e inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade ($\frac{1}{\ln(Ca+1)}$) são os mais indicados para descreverem o comportamento da variável TR por meio de curvas polinomiais de crescimento.

Neste sentido, o procedimento de Potthoff & Roy (1964) indica o modelo polinomial de 1^o grau como o melhor representativo para o estudo longitudinal da TR em função da manobra de cálcio.

Nos modelos de 1^o grau selecionados, para a variável mecânica TR, são apresentadas as matrizes de parâmetros estimados e seus desvios padrão nos quatro

grupos estudados, respectivamente:

1. Matriz dos parâmetros estimados para o modelo polinomial inverso da concentração de cálcio ($\frac{1}{Ca}$):

$$\hat{\xi} = \begin{bmatrix} -2,028 & 0,074 \\ -2,262 & 0,103 \\ -1,297 & 0,055 \\ -1,348 & 0,069 \end{bmatrix}. \quad (4.5)$$

Matriz dos desvios padrão estimados das estimativas dos parâmetros é dada por:

$$\widehat{DP}(\xi) = \begin{bmatrix} 0,202 & 0,012 \\ 0,194 & 0,011 \\ 0,194 & 0,011 \\ 0,187 & 0,011 \end{bmatrix}. \quad (4.6)$$

Com a utilização do modelo polinomial inverso da concentração de cálcio, obtiveram-se as médias estimadas para a variável TR em cada uma das concentrações de cálcio em cada um dos grupos.

Tabela 4.12: Média da TR obtidas a partir do polinômio de 1º grau em $\frac{1}{Ca}$

Grupo	Concentrações de cálcio						
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
G1	0,829	0,779	0,762	0,754	0,749	0,746	0,743
G2	0,943	0,873	0,850	0,838	0,831	0,826	0,823
G3	0,537	0,500	0,487	0,481	0,477	0,475	0,473
G4	0,568	0,521	0,506	0,498	0,493	0,490	0,488

2. Matriz dos parâmetros estimados para o modelo polinomial inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade $\frac{1}{\ln(Ca+1)}$:

$$\hat{\xi} = \begin{bmatrix} -2,023 & 0,073 \\ -2,257 & 0,102 \\ -1,296 & 0,055 \\ -1,344 & 0,068 \end{bmatrix}. \quad (4.7)$$

A matriz dos desvios padrão estimados das estimativas dos parâmetros é exibida como:

$$\widehat{DP}(\xi) = \begin{bmatrix} 0,202 & 0,012 \\ 0,194 & 0,011 \\ 0,194 & 0,011 \\ 0,187 & 0,011 \end{bmatrix}. \quad (4.8)$$

Utilizando o modelo polinomial inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade, estabeleceram-se as médias estimadas para a variável TR nas concentrações de cálcio estudadas.

Tabela 4.13: Média da TR obtidas a partir do polinômio de 1º grau em $(\frac{1}{\ln(Ca+1)})$

Grupo	Concentrações de cálcio						
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
G1	0,826	0,778	0,761	0,753	0,747	0,744	0,741
G2	0,939	0,872	0,849	0,837	0,829	0,824	0,820
G3	0,536	0,500	0,487	0,481	0,477	0,474	0,472
G4	0,565	0,520	0,505	0,497	0,492	0,488	0,486

Nas Tabelas 4.14, 4.15, 4.16 e 4.17 com nível de 95% de significância são apresentados os ICS de Hotelling para as diferenças entre os pares de médias dos grupos de interesse nas diferentes concentrações de cálcio.

Tabela 4.14: Intervalos de confiança simultâneo de Hotelling para as diferenças entre as médias de dois grupos para a TD no modelo inverso da concentração de cálcio ($\frac{1}{Ca}$)

[Cálcio]	EAo	Sham	Normo	Hiper
	Normo × Hiper	Normo × Hiper	EAo × Sham	EAo × Sham
Grupo	G1 × G2	G3 × G4	G1 × G3	G2 × G4
0,5	(-0,314;0,406)	(0,174;0,850)*	(-0,149;0,572)	(-0,592;0,082)
1	(-0,441;0,376)	(0,021;0,786)*	(0,029;0,846)*	(-0,380;0,384)
1,5	(-0,485;0,366)	(-0,080;0,717)	(0,093;0,946)*	(-0,256;0,541)
2	(-0,512;0,365)	(-0,144;0,677)	(0,124;1,002)*	(-0,187;0,634)
2,5	(-0,530;0,367)	(-0,187;0,651)	(0,140;1,037)*	(-0,144;0,695)
3	(-0,543;0,368)	(-0,218;0,634)	(0,150;1,062)*	(-0,115;0,738)
3,5	(-0,552;0,370)	(-0,242;0,622)	(0,157;1,080)*	(-0,094;0,770)

* $p < 0,05$

Na Tabela 4.14, a qual apresenta os ICS de Hotelling para a variável mecânica TD no modelo inverso da concentração de cálcio ($\frac{1}{Ca}$), é possível observar que quando comparado G1 × G3 (EAo Normo × Sham Normo) o zero se encontra fora dos intervalos (resultados significativos) excetuando-se a concentração 0,5 mM, ou seja, há diferença entre os pares de médias de animais EAo e Sham, quando estes receberam dieta Normo, exceto para a concentração basal (0,5 mM).

Para a comparação G3 × G4 (Sham Normo × Sham Hiper), o valor zero não está contido no intervalo apenas nas concentrações 0,5mM e 1,0mM de cálcio, ou seja, para essas duas concentrações há diferença dos animais Sham quando esses recebem diferentes dietas com respostas médias mais altas na dieta Normo.

Nas comparações G1 × G2 (EAo Normo × EAo Hiper) e G2 × G4 (EAo Hiper × Sham Hiper) não foi possível encontrar diferença estatística entre as respostas médias em todas as concentrações.

Tabela 4.15: Intervalos de confiança simultâneo de Hotelling para as diferenças entre as médias de dois grupos para a TD no modelo inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade $\frac{1}{\ln(Ca+1)}$

[Cálcio]	EAo	Sham	Normo	Hiper
	Normo × Hiper	Normo × Hiper	EAo × Sham	EAo × Sham
Grupo	G1 × G2	G3 × G4	G1 × G3	G2 × G4
0,5	(-2,452;2,544)	(-1,827;2,849)	(-2,290;2,707)	(-2,595;2,081)
1	(-2,862;2,799)	(-2,242;3,056)	(-2,396;3,265)	(-2,653;2,645)
1,5	(-3,008;2,890)	(-2,444;3,076)	(-2,436;3,461)	(-2,622;2,897)
2	(-3,109;2,962)	(-2,583;3,098)	(-2,483;3,588)	(-2,619;3,062)
2,5	(-3,187;3,021)	(-2,687;3,123)	(-2,526;3,681)	(-2,628;3,182)
3	(-3,248;3,071)	(-2,768;3,146)	(-2,565;3,754)	(-2,640;3,274)
3,5	(-3,299;3,112)	(-2,833;3,167)	(-2,599;3,813)	(-2,653;3,347)

A partir dos resultados obtidos para os ICS da Tabela 4.15 para o modelo inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade $\frac{1}{\ln(Ca+1)}$, não foi possível encontrar diferença estatística nos perfis médios dos grupos nas diferentes concentrações de cálcio em todas as comparações realizadas entre os grupos.

Tabela 4.16: Intervalos de confiança simultâneo de Hotelling para as diferenças entre as médias de dois grupos para a TR no modelo polinomial inverso da raiz quadrada da concentração de cálcio ($\frac{1}{Ca}$)

[Cálcio]	E Ao	Sham	Normo	Hiper
	Normo × Hiper	Normo × Hiper	E Ao × Sham	E Ao × Sham
Grupo	G1 × G2	G3 × G4	G1 × G3	G2 × G4
0,5	(-0,189;-0,037)*	(-1,251;1,189)	(-1,163;0,579)	(-1,255;0,506)
1,0	(-0,128;-0,058)*	(-0,583;0,539)	(-0,680;0,121)	(-0,756;0,054)
1,5	(-0,119;-0,055)*	(-0,535;0,498)	(-0,644;0,093)	(-0,717;0,029)
2,0	(-0,118;-0,049)*	(-0,572;0,537)	(-0,669;0,123)	(-0,740;0,060)
2,5	(-0,119;-0,045)*	(-0,610;0,578)	(-0,695;0,152)	(-0,766;0,091)
3,0	(-0,119;-0,041)*	(-0,641;0,610)	(-0,717;0,175)	(-0,787;0,115)
3,5	(-0,120;-0,039)*	(-0,665;0,635)	(-0,734;0,194)	(-0,804;0,134)

* p < 0,05

Com os resultados apresentados na Tabela 4.16 para a variável mecânica TR é possível observar que as comparações G1 × G2 (E Ao Normo × E Ao Hiper) apresenta o zero fora do intervalo em todas as concentrações de cálcio, salientando a existência de diferença entre os perfis médios de resposta desses grupos. Sendo possível verificar que animais com E Ao respondem de maneira diferenciada quando submetidos à dietas diferentes. O perfil médio de resposta de animais com dieta Normo apresenta valores mais baixos.

Em relação as demais comparações: G3 × G4 (Sham Normo × Sham Hiper), G1 × G3 (E Ao Normo × Sham Normo) e G2 × G4 (E Ao Hiper × Sham Hiper) não foi possível identificar diferenças entre os pares de médias testadas.

Tabela 4.17: Intervalos de confiança simultâneo de Hotelling para as diferenças entre as médias de dois grupos para a TR no modelo inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade $\frac{1}{\ln(Ca+1)}$

[Cálcio]	EAo	Sham	Normo	Hiper
	Normo × Hiper	Normo × Hiper	EAo × Sham	EAo × Sham
Grupo	G1 × G2	G3 × G4	G1 × G3	G2 × G4
0,5	(-0,123;-0,101)*	(-0,203;0,146)	(-0,415;0,165)*	(-0,499;0,247)*
1,0	(-0,098;-0,088)*	(-0,102;0,061)	(-0,336;0,219)*	(-0,410;0,292)*
1,5	(-0,091;-0,082)*	(-0,091;0,056)	(-0,326;0,220)*	(-0,397;0,290)*
2,0	(-0,088;-0,079)*	(-0,095;0,063)	(-0,328;0,214)*	(-0,397;0,282)*
2,5	(-0,087;-0,076)*	(-0,100;0,070)	(-0,331;0,209)*	(-0,399;0,275)*
3,0	(-0,086;-0,074)*	(-0,105;0,076)	(-0,334;0,204)*	(-0,401;0,270)*
3,5	(-0,085;-0,073)*	(-0,108;0,081)	(-0,336;0,201)*	(-0,402;0,265)*

* $p < 0,05$

A partir do resultados dos ICS apresentados na Tabela 4.17, é possível observar que quando comparados os grupos G1 × G2 (EAo Normo × EAo Hiper), G1 × G3 (EAo Normo × Sham Normo) e G2 × G4 (EAo Hiper × Sham Hiper) apresentaram o valor zero fora do intervalo de confiança para todas as concentrações de cálcio, ou seja, há diferença entre os perfis médios de resposta dos grupos.

Diante das comparações G1 × G3 (EAo Normo × Sham Normo) e G2 × G4 (EAo Hiper × Sham Hiper) fica evidente que a indução da EAo modifica em qualquer circunstância a resposta média do animal, sendo que os animais EAo possuem respostas médias mais altas que os animais Sham.

Na comparação G1 × G2 (EAo Normo × EAo Hiper) é possível verificar que os animais com EAo respondem de maneira diferenciada quando submetidos à dietas diferentes. O perfil médio de resposta de animais com dieta Normo apresenta valores mais baixos.

Em relação a comparação G3 × G4 (Sham Normo × Sham Hiper) não

foi possível identificar diferenças entre os pares de médias, ou seja, para os animais Sham não há diferença entre os que administraram dietas Hiper ou Normo.

Para verificar a adequacidade dos ajustes dos modelos selecionados obteve-se a SQD entre as médias observadas e estimadas para os grupos. Para a variável TD são apresentadas as SQD para os dois polinômios selecionados, como é possível observar na Tabela 4.18.

Tabela 4.18: Soma de quadrados dos desvios da variável TD para o ajuste dos modelos de 2^o grau

Grupo	Cirurgia	Dieta	Modelo Polinomial	
			$\frac{1}{Ca}$	$\frac{1}{\ln(Ca+1)}$
G1	E Ao	Normo	0,018	0,013
G2	E Ao	Hiper	0,007	0,005
G3	Sham	Normo	0,002	0,008
G4	Sham	Hiper	0,044	0,033
Total			0,071	0,059

Os valores obtidos nas SQD apresentados na Tabela 4.18 são pequenos, o que indica um bom ajuste para a variável TD, tanto para o polinômio inverso da concentração de cálcio ($\frac{1}{Ca}$), quanto para o inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade ($\frac{1}{\ln(Ca+1)}$). Esse indicativo mostra que as variações que os modelos deixaram de explicar sobre a resposta biológica da TD em função dos níveis de cálcio foram bem baixas.

Em relação à variável TR tem-se sua SQD apresentada na Tabela 4.19.

Tabela 4.19: Soma de quadrados dos desvios da variável TR para o ajuste do modelo de 1^o grau

Grupo	Cirurgia	Dieta	Modelo Polinomial	
			$\frac{1}{Ca}$	$\frac{1}{\ln(Ca+1)}$
G1	E Ao	Normo	0,0265	0,0281
G2	E Ao	Hiper	0,0046	0,0054
G3	Sham	Normo	0,0014	0,0014
G4	Sham	Hiper	0,0011	0,0015
Total			0,0337	0,0365

Na Tabela 4.19 é possível observar o resultado referente as SQD dos modelos inverso da concentração de cálcio($\frac{1}{Ca}$) e o inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade ($\frac{1}{\ln(Ca+1)}$) para variável TR para quatro grupos, cujos valores obtidos são bem pequenos, sugerindo assim um bom ajuste dos modelos selecionados.

5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento da metodologia e os resultados encontrados permitem algumas conclusões que serão detalhadas a seguir.

A revisão de literatura possibilitou verificar que há pouco uso de técnicas multivariadas em artigos científicos na área da saúde, especificamente em artigos científicos na área experimental da cardiologia, com maior escassez no uso de curvas de respostas dos fenômenos biológicos em estudos longitudinais. Quanto ao emprego de relações funcionais próprias e adequadas para dados longitudinais, via modelo linear multivariado de crescimento, como o adotado nesta pesquisa, raramente são encontradas aplicações nesta área, mesmo sendo esta uma área que utiliza frequentemente dados longitudinais e necessita de modelos estocásticos próprios para medidas repetidas na mesma unidade experimental. Ademais, quanto ao uso de polinômios não convencionais, ou seja, a variável endógena sob transformação matemática não foi possível encontrar, frente a extensa revisão realizada qualquer indicativo de uso.

Constatou-se pela técnica da análise de variância multivariada que o fato do animal ter ingerido dieta Normolipídica ou Hiperlipídica não foi um diferenciador relevante para respostas das variáveis mecânicas TD e TR. Quando identificada a diferença entre os níveis dos fatores, esta praticamente ocorreu no fator cirurgia, ou seja, no fato do animal ter recebido ou não o clipe.

Os ajustes realizados pela proposta de Potthoff & Roy (1964), indicaram que tanto a variável TD quanto a TR exigem transformações nos valores da concentração de cálcio que são: o inverso da concentração de cálcio ($\frac{1}{Ca}$) e o inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade ($\frac{1}{\ln(Ca+1)}$). Para o estudo longitudinal sequencial da manobra de cálcio para a variável mecânica TD

houve a necessidade de se utilizar polinômios de 2^o grau para a estimação do perfil de médias nos quatro grupos, enquanto para a variável TR foram os selecionados, para ambos modelos, polinômios de 1^o grau.

A partir dos intervalos de 95 % de confiança simultâneos de Hotelling para as estimativas das diferenças médias obtidas pelos modelos ajustados para a variável TD considerando o inverso da concentração de cálcio, conclui-se que os animais que ingeriram dieta Normo tiveram a resposta da EAo maior que o Sham, evidenciando que houve um agravo da doença a partir da segunda concentração de cálcio (1,0mM). Os animais Sham apresentaram a resposta da variável TD para a dieta Normo maior quando comparada a Hiper até a concentração 1,5mM de cálcio, apontando que, para as duas primeiras concentrações, há uma piora (aumento de TD) na condição do animal. O modelo inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade para a TD mostrou-se pouco robusto para identificar diferenças entre os pares de médias avaliados nos grupos.

Quando são analisados os intervalos para as diferenças de médias da variável TR para o modelo polinomial de 1^o grau no inverso da concentração de cálcio, este apenas identificou para EAo a dieta como sendo um fator modificador nas respostas médias nos animais. Para o modelo inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade, verificou-se, independentemente das dietas, que o procedimento cirúrgico foi determinante na modificação da resposta do animal elevando os valores médios da TR no grupo submetido à indução da EAo. Destaca-se que a dieta acabou sendo um fator diferenciador de respostas para os animais que foram submetidos à EAo ocasionando uma diminuição das respostas médias da TR na dieta Normo.

O modelo linear multivariado de crescimento apresentou mais sensibilidade na identificação das diferenças dos perfis médios de resposta dos animais quando comparado ao modelo linear multivariado. Este apenas identificou diferença na variável TR para o fator cirurgia, enquanto o outro, além da diferença já encontrada, também apontou diferenças nos animais Normo e Hiper quando estes foram

submetidos à EAo. Para a variável TD, nos animais Sham foram encontrados valores médios mais elevados nos animais que receberam a dieta Normo nas duas primeiras concentrações de cálcio. Em relação aos animais que receberam a dieta Normo verificaram-se, excetuando-se o nível mais baixo de cálcio, valores médios mais elevados nos animais Sham.

A partir dos resultados encontrados, de forma geral, a para os procedimentos estatísticos utilizados foi possível notar que as dietas não se mostraram expressivas para identificar completamente diferenciação entre os perfis médios de resposta dos animais nas variáveis mecânicas estudadas. Contudo, deve ser destacado que em relação às diferenças significativas encontradas entre as comparações de interesse realizadas entre os grupos de estudo, o modelo linear multivariado de crescimento sempre comportou-se com maior número de significância quando comparado ao modelo linear multivariado.

Em relação a opção por um dos modelos, conclui-se que para a variável TR o mais indicado consiste na utilização da transformação inverso da concentração de cálcio, enquanto que para a variável TD utiliza-se a transformação inverso do logaritmo natural adicionado a unidade.

Como indicativo dos resultados obtidos para o estrutura longitudinal das funções mecânicas TD e TR avaliadas em diferentes concentrações de cálcio, para estudos futuros, recomenda-se a alteração dos componentes valor calórico e quantidade de ácidos graxos, a fim de obter dietas que possibilitem diferenciar a condição cardíaca do animal, ou seja, dietas que tenham como proposta elucidar a melhora/piora da função cardíaca do animal, cabendo, também, avaliar a necessidade da inclusão de outros fatores, como por exemplo, a atividade física.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, M. J. Distance-Based Tests for Homogeneity of Multivariate Dispersions. **Biometrics**, v.62, p.245–253, 2006.

ASSAAD, H.; YAO, K.; TEKWE, C. D.; FENG, S.; BAZER, F. W.; ZHOU, L.; CARROLL, R.; MEININGER, C. J.; WU, G. Analysis of energy expenditure in diet-induced obese rats. **Frontiers in Bioscience**, v.19, p.967–985, 2014.

AZEVEDO, P. S.; POLEGATO, B. F.; MINICUCCI, M. F.; PAIVA, S. A. R.; ZORNOFF, L. A. M. Remodelação Cardíaca: Conceitos, Impacto Clínico, Mecanismos Fisiopatológicos e Tratamento Farmacológico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.106, n.1, p.62–69, 2015.

BALDAN, S. S.; FERRAUDO, A. S.; ANDRADE, M. A eficácia da Estratégia Saúde da Família e do Tratamento Diretamente Observado no controle da Tuberculose. **Revista de Epidemiologia e Controle Infecção**, v.6, n.4, p.169–174, 2016.

BAN, S. J.; W.RICO, C.; UM, I. C.; KANG, M. Y. Antihyperlipidemic effects of hydroxyethyl methylcellulose with varying viscosity in mice fed with high fat diet. **Food Research International**, v.48, n.1, p.1–6, 2012.

BATISTELA, G. C. Uso do modelo linear multivariado de crescimento no estudo da densidade básica da madeira de eucaliptos. Faculdade de Ciências Agronômicas - Botucatu, 2014. 74p. Thesis(Ph.D.) - Universidade Estadual Paulista.

BOURON, A. I. N.; LAFARGUE, A. L.; RODRÍGUEZ, R. R.; DÍAZ, M. E. M.; ÁLVAREZ, R. G. Modificación del volumen de los compartimentos líquidos corporales

en pacientes tratados con cirugía correctora por cardiopatía isquémica. **MEDISAN**, v.21, n.1, p.34–42, 2017.

BREGAGNOLLO, E. A.; MESTRINEL, M. A.; OKOSHI, K.; CARVALHO, F. C.; BREGAGNOLLO, I. F.; PADOVANI, C. R.; CICOGNA, A. C. Papel relativo do remodelamento geométrico do ventrículo esquerdo e do remodelamento miocárdico morfológico e funcional na transição de hipertrofia compensada para insuficiência cardíaca em ratos com estenose aórtica supravalvar. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.88, n.2, p.225–233, 2007.

BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust tests for equality of variances. *Journal of the American Statistical Association*. **Journal of the American Statistical Association**, v.69, n.346, p.364–367, 1974.

CALLIOLI, C. A.; DOMINGUES, H. H.; COSTA, R. C. F. **Álgebra Linear e aplicações**. 6. ed. São Paulo: Editora Atual, 1990. 352p.

CAMPOS, D. H. S. Influência da dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados sobre o metabolismo, estrutura e função cardíaca de ratos com estenose aórtica supravalvar. Botucatu, 2014. 80p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CASTRO-COSTA, .; DEWEY, M. E.; UCHÔA, E.; FIRMO, J. O.; LIMA-COSTA, M. F.; STEWART, R. Construct validity of the mini mental state examination across time in a sample with low-education levels: 10-year follow-up of the Bambuí Cohort Study of Ageing. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v.29, n.12, p.1294–1303, 2014.

CICOGNA, A. C.; PADOVANI, C. R.; OKOSHI, K.; ARAGON, F. F.; OKOSHI, M. P. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. **The American Journal of the Medical Sciences**, v.320, n.4, p.244–248, 2000.

COELHO, V. G.; CAETANO, L. F.; LIBERATORE-JÚNIOR, R. D. R.; CORDEIRO, J. A.; SOUZA, D. R. S. Perfil Lipídico e Fatores de Risco para Doenças Cardiovasculares em Estudantes de Medicina. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.85, n.1, p.57–62, 2005.

COHN, J. N.; FERRARI, R.; SHARPE, N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. **Journal of the American College of Cardiology**, v.35, n.3, p.562–582, 2000.

DENIPOTE, F. G.; PAIVA, S. A. R.; ZORNOFF, L. A. Influence of taurine on cardiac remodeling. **Nutrire Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v.34, n.1, p.211–223, 2009.

DINIZ, Y. S.; CICOGNA, A.; PADOVANI, C. R.; SANTAN, L. S.; FAINE, L. A.; NOVELLI, E. L. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. **Nutrition**, v.20, n.2, p.230–234, 2004.

DROZDOVÁ, D.; DANKOVÁ, Z.; ČERŇANOVÁ, V.; SIVÁKOVÁ, D. Body composition of Slovak midlife women with cardiovascular complications. **Anthropological Review**, v.79, n.2, p.169–180, 2016.

EVANGELISTA, M. C. Construção de curvas polinomiais para a resposta funcional do músculo papilar isolado em diferentes concentrações de cálcio. Botucatu, 2016. 79p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista.

FARAH, E.; FUSCO, D. R.; OKUMOTO, P. R. R.; MINICUCCI, M. F.; AZEVEDO, P. S.; MATSUBARA, B. B.; OKOSHI, K.; ZANATI, S. G.; PAIVA, S. A. R.; ZORNOFF, L. A. M. Impacto do Padrão Geométrico Ventricular na remodelação cardíaca após o infarto do miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.100, n.6, p.518–523, 2013.

FERREIRA, D. F. **Estatística Multivariada**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2011. 676p.

FERREIRA, W. L.; SILVA-JUNIOR, F. V.; MOREIRA, J. M.; GONZALEZ, G. G. H.; BORTOLINI, J.; MELO, A. F. Análise multivariada da influência da ingestão de café no peso de animais. **PUBVET**, v.11, n.9, p.935–939, 2017.

FIGUEIREDO, R. S. L.; MENDES, B.; CAVANAUGH, M. C. V.; NOVAES, B. Classificação de perdas auditivas por grau e configuração e relações com Índice de Inteligibilidade de Fala (SII) amplificado. **CoDAS**, v.28, n.6, p.687–696, 2016.

FONSECA, D. S.; SÁ, A. M. F. L. M.; BEDA, A.; SIMPSON, D. M. Análise das características interindividuais no estudo da variabilidade da frequência cardíaca. In: XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, SBEB, UFU, 2014. ; resumos. Uberlândia: , 2014. 2632.

FRANCESCHINI, J.; JARDIM, J. R.; FERNANDES, A. L. G.; JAMNIK, S. S.; SANTORO, I. L. Relação entre a magnitude de sintomas e a qualidade de vida: análise de agrupamentos de pacientes com câncer de pulmão no Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.39, n.1, p.23–31, 2013.

FUKUOKA, Y.; LINDGREN, T. G.; RANKIN, S. H.; COOPER, B. A.; CARROLL, D. L. Cluster analysis: a useful technique to identify elderly cardiac patients at risk for poor quality of life. **Quality of Life Research**, v.16, n.10, p.1655–1663, 2007.

GRIZZLE, J. E.; ALLEN, D. M. Analysis of growth and dose response curves. **Biometrics**, v.25, n.2, p.357–381, 1969.

HAIR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise Multivariada de Dados**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 688p.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied Multivariate Statistical Analysis**. 6. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2007. 773p.

KAPLAN, H.; THOMPSON, R. C.; TRUMBLE, B. C.; WANN, L. S.; ALLAM, A. H.; BEHEIM, B.; FROHLICH, B.; SUTHERLAND, M.; SUTHERLAND, J. D.;

STIEGLITZ, J.; RODRIGUEZ, D. E.; MICHALIK, D. E.; ROWAN, C. J.; LOMBARDI, G. P.; BEDI, R.; GARCIA, A. R.; MIN, J. K.; NARULA, J.; FINCH, C. E.; GURVEN, M.; THOMAS, G. S. Coronary atherosclerosis in indigenous South American Tsimane: a cross-sectional cohort study. **Lancet**, v.389, p.1730–1739, 2017.

KERNKAMP, C. L.; COSTA, C. K. F.; MASSUDA, E. M.; SILVA, E. S.; YAMAGUCHI, M. U.; BERNUCI, M. P. Perfil de morbidade e gastos hospitalares com idosos no Paraná, Brasil, entre 2008 e 2012. **Cadernos de Saúde Pública**, v.32, n.7, p.1–14, 2016.

KHATRI, C. G. A note on a MANOVA model applied to problem in growth curve. **Annals of the Institute of Statistical Mathematics**, v.18, p.75–86, 1966.

LEÃO, R. D.; SATO, J. R.; THOMAZ, C. E. Comparação entre as análises estatísticas univariada e multivariada para extração de informação discriminante em imagens de ressonância magnética do cérebro humano. **Relatório Técnico - Departamento de Engenharia Elétrica - FEI**, 2009.

LEOPOLDO, A. S.; LIMA-LEOPOLDO, A. P.; NASCIMENTO, A. F.; LUVIZOTTO, R. A. M.; SUGIZAKI, M. M.; CAMPOS, D. H. S.; SILVA, D. C. T.; PADOVANI, C. R.; CICOONA, A. C. Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v.49, n.4, p.1–9, 2016.

LIMA-LEOPOLDO, A. P.; SUGIZAKI, M. M.; LEOPOLDO, A. S.; CARVALHO, R. F.; NOGUEIRA, C. R.; NASCIMENTO, A. F.; MARTINEZ, P. F.; LUVIZOTTO, R. A.; PADOVANI, C. R.; CICOONA, A. C. Obesity induces upregulation of genes involved in myocardial Ca²⁺ handling. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v.41, n.7, p.615–620, 2008.

MACIEIRA-COELHO, E.; OLIVEIRA, M. F.; TURKMAN, M. A. A. Diagnóstico de cardiopatia isquêmica no doente ambulatorio - Análise Multivariada de Dados Clínicos e Electrocardiográficos. **Acta Médica Portuguesa**, v.3, p.277–282, 1990.

MANLY, B. J. F. **Multivariate Statistical Methods: A primer**. 3. ed. Londres: CHAPMAN & HALL, 2004. 214p.

MELO, D. M.; BARBOSA, A. J. G.; NERI, A. L. Miniexame do Estado Mental: evidências de validade baseadas na estrutura interna. **Avaliação Psicológica**, v.16, n.2, p.161–168, 2017.

MENDES, O. C.; CAMPOS, D. H. S.; DAMATTO, R. L.; SUGIZAKI, M. M.; PADOVANI, C. R.; OKOSHI, K.; CICOGNA, A. C. Remodelamento cardíaco: análise seriada e índices de detecção precoce de disfunção ventricular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.94, n.1, p.62–70, 2010.

MILANI, S.; BOSSI, A.; MARUBINI, E. Individual Growth Curves and Longitudinal Growth Charts between 0 and 3 Years. **Acta Paediatrica**, v.78, n.s350, p.95–104, 1989.

MINGOTI, S. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. 1. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2013. 297p.

MOHRMAN, D. E.; HELLER, L. J. **Fisiologia cardiovascular**. 6. ed. São Paulo: McGraw Hill, 2008. 258p.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 6. ed. New York: John Wiley & Sons, 2004. 660p.

MOZAFFARI, M. S.; PATEL, C.; BALLAS, C.; SCHAFFER, S. W. Effects of excess salt and fat intake on myocardial function and infarct size in rat. **Life Sciences**, v.78, n.16, p.1808–1813, 2006.

MUNIZ, M. T. C.; SIQUEIRA, E. R. F.; FONSECA, R. A.; DALMEIDA, V.; HOTTA, J. K.; SANTOS, J. E.; CAVALCANTI, M. S. M.; SAMPAIO, C. A. M. Avaliação da relação entre o polimorfismo C677T no gene para MTHFR e a concentração plasmática de homocisteína na doença arterial coronariana. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabologia**, v.50, n.6, p.1059–1065, 2006.

NADAL, J.; PANERAI, R. B. Estudo preliminar da classificação de arritmias cardíacas utilizando análise de componentes principais. **Revista Brasileira de Engenharia – Caderno de Engenharia Biomédica**, v.07, n.1, p.37–45, 1990.

NASCIMENTO, A. F.; SUGIZAKI, M. M.; LEOPOLDO, A. S.; LIMA-LEOPOLDO, A. P.; LUVIZOTTO, R. A.; NOGUEIRA, C. R.; CICOGNA, A. C. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabologia**, v.52, n.6, p.968–974, 2008.

NUNES, L. A.; CASOTTI, C. A. MORFOMETRIA GEOMÉTRICA DA CABEÇA COMO INDICATIVO PARA DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS EM IDOSOS. In: CONGRESSO NACIONAL DE ENVELHECIMENTO HUMANO, CEMEP, 2016. ; resumos. Natal: , 2016.

OLIVEIRA-JUNIOR, S. A.; PADOVANI, C. R.; RODRIGUES, S. A.; SILVA, N. R.; MARTINEZ, P. L.; CAMPOS, D. H. S.; OKOSHI, M. P.; OKOSHI, K.; PAI, M. D.; CICOGNA, A. C. Extensive impact of saturated fatty acids on metabolic and cardiovascular profile in rats with diet-induced obesity: a canonical analysis. **Cardiovascular Diabetology**, v.12, n.1, p.65, 2013.

OSHIIWA, M.; PADOVANI, C. R. O uso de procedimentos estatísticos univariado e multivariado em ensaios agrônômicos com delineamento em blocos completos casualizados. **Energia na Agricultura**, v.17, n.2, p.58–68, 2002.

PAES, A. T. Análise univariada e multivariada. **Educação Continuada em Saúde**, v.8, n.1, p.1–2, 2010.

PINTO, R. M. Componentes principais na seleção de animais em pesquisas experimentais. Botucatu, 2014. 71p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

PINTO, R. M.; CAMPOS, D. H. S.; PADOVANI, C. R.; TOMASI, L. C.; CICOGNA, A. C.; OKOSHI, K.; PADOVANI, C. R. Análise multivariada na seleção de animais em pesquisas experimentais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.104, n.2, p.97–103, 2015.

POPOLIN, M. P.; GARCIA, M. C. C.; ARROYO, L. H.; YAMAMURA, M.; SANTOS-NETO, M.; RODRIGUES, L. B. B.; QUEIROZ, A. A. R.; FRONTEIRA, I.; ARCÊNCIO, R. A. Tuberculose: desigualdade de renda e interação da Estratégia Saúde da Família e Bolsa Família. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v.19, 2017.

POTTHOFF, R. F.; ROY, S. N. A generalized multivariate analysis of variance model useful especially for growth curve problems. **Biometria**, v.51, n.1, p.313–326, 1964.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018.

REIS, E. **Análise multivariada aplicada**. 2. ed. Lisboa: Edições Sílabo, 2001. 343p.

RIBEIRO, H. B.; OKOSHI, K.; CICOGNA, A. C.; BREGAGNOLLO, E. A.; RODRIGUES, M. A. M.; PADOVANI, C. R.; ARAGON, F. F.; JAMAS, E.; OKOSHI, M. P. Estudo Evolutivo da Morfologia e Função Cardíaca em Ratos Submetidos a Estenose Aórtica Supraaórtica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.81, n.6, p.562–568, 2003.

ROCKETT, B. D.; HARRIS, M.; SHAIKH, S. R. High dose of an n-3 polyunsaturated fatty acid diet lowers activity of C57BL/6 mice. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.86, n.3, p.137–140, 2012.

SCHNEIDERMAN, E. D.; KOWALSKI, C. J. Analysis of Longitudinal Data in Craniofacial Research: Some Strategies. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.5, n.3, p.187–202, 1994.

SHARMA, V.; KATZNELSON, R.; JERATH, A.; GARRIDO-OLIVARES, L.; CARROLL, J.; RAO, V.; WASOWICZ, M.; DJAIANI, G. The association between tranexamic acid and convulsive seizures after cardiac surgery: a multivariate analysis in 11 529 patients. **Anaesthesia**, v.69, n.2, p.124–130, 2014.

SILVA, N. A. S.; VIANA, M. A. G. O ecocardiograma na avaliação de pacientes com hipertensão arterial. Aspectos anatômicos, funcionais e clínicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.48, n.1, p.21–28, 1987.

SILVEIRA, C. F. S. M. P.; CAMPOS, D. H. S.; FREIRE, P. P.; DEUS, A. F.; OKOSHI, K.; PADOVANI, C. R.; CICOGNA, A. C. Importance of SERCA2a on early isolated diastolic dysfunction induced by supravalvular aortic stenosis in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.50, n.5, p.5742, 2017a.

SILVEIRA, M. C.; PIVETTA, F. M.; MOTA, C. B. Atletas de diferentes esportes não apresentam padrões distintos de equilíbrio. **Revista Perspectiva: Ciência e Saúde**, v.2, n.1, p.43–49, 2017b.

SINGER, J. M. Análise de curvas de crescimento. São Paulo, 1977. 113p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo.

SOARES, V.; AVELAR, I. S.; ANDRADE, S. R. S.; VIEIRA, M. F.; SILVA, M. S. Composição corporal de pacientes renais crônicos em hemodiálise: antropometria e

análise vetorial por bioimpedância. **Revista Latino Americana Enfermagem**, v.21, n.6, p.1240–1247, 2013.

SOUZA, L. Curvas de crescimento: Análise de Dados Longitudinais Incompletos com Resíduos Autocorrelacionados. Esalq - Piracicaba, 1989. 84p. Thesis(Ph.D.) - Universidade de São Paulo.

SOUZA, L.; IEMMA, A. F. Curvas de crescimento: Análise de Dados Longitudinais Incompletos com Resíduos Autocorrelacionados. **Revista de Matemática e Estatística**, , n.8, p.45–55, 1990.

STANIAK, H. L.; SHAROVSKY, R.; PEREIRA, A. C.; AN I M BENSEÑOR, C. C. C.; LOTUFO, P. A.; BITTENCOURT, M. S. Espessura do Tecido Subcutâneo como Preditor Independente de Ruído em Imagem de TC Cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.102, n.1, p.86–92, 2014.

SUSSENBACH, C. P.; GUARAGNA, J. C.; CASTAGNINO, R. S.; PICCOLI, J.; ALBUQUERQUE, L. C.; GOLDANI, M. A.; PETRACCO, J. B.; BODANESE, L. C. Angina instável não aumenta mortalidade em cirurgia de revascularização miocárdica. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v.28, n.3, p.391–400, 2013.

VANZELLI, A. S.; MEDEIROS, A.; SIRVENTE, R. A.; SALEMI, V. M. C.; MADY, C.; BRUM, P. C. Associação de betabloqueadores e treinamento físico na insuficiência cardíaca de camundongos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.95, n.3, p.373–380, 2010.

WILKS, S. S. Certain generalizations in the analysis of variance. **Biometrika**, v.24, p.471–494, 1932.

ZORNOFF, L. A. M.; SPADARO, J. Remodelação ventricular após infarto agudo do miocárdio. Conceitos, fisiopatologia e abordagem terapêutica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.68, n.6, p.453–460, 1997.