

## Análise Multivariada na Seleção de Animais em Pesquisas Experimentais

*Multivariate Analysis for Animal Selection in Experimental Research*

Renan Mercuri Pinto<sup>1</sup>, Dijon Henrique Salomé de Campos<sup>2</sup>, Loreta Casquel Tomasi<sup>2</sup>, Antonio Carlos Cicogna<sup>2</sup>, Katashi Okoshi<sup>2</sup>, Carlos Roberto Padovani<sup>1</sup>

Departamento de Bioestatística - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista (Unesp)<sup>1</sup>; Departamento de Clínica Médica - Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista (Unesp)<sup>2</sup>, Botucatu, São Paulo - Brasil

### Resumo

**Fundamento:** Muitos pesquisadores buscam métodos para a seleção de grupos homogêneos de animais em pesquisas experimentais, fato que se justifica por ser a homogeneidade pré-requisito indispensável à casualização de tratamentos. A ausência de métodos robustos, que atendam a princípios estatísticos e biológicos, faz com que os pesquisadores utilizem métodos empíricos ou subjetivos, influenciando seus resultados.

**Objetivo:** Desenvolver modelo estatístico multivariado para a seleção de grupo homogêneo de animais para pesquisas experimentais e elaborar pacote computacional que o operacionalize.

**Métodos:** O conjunto de dados ecocardiográficos de 115 ratos Wistar, machos, com estenose aórtica (EAO) supravalvular foi utilizado para exemplificar o desenvolvimento do modelo. Inicialmente, os dados foram padronizados, tornando-se adimensionais. Em sequência, submeteu-se a matriz de variabilidade do conjunto à análise de componentes principais (ACP) buscando-se reduzir o espaço paramétrico e conservar a variabilidade relevante. Essa técnica estabeleceu um novo sistema cartesiano em que os animais foram alocados e, finalmente, construiu-se a região de confiança (elipsoide) para o perfil de respostas homogêneas dos animais. Os que se situaram no interior do elipsoide foram considerados pertencentes ao grupo homogêneo; caso contrário, espúrios ao grupo.

**Resultados:** A ACP estabeleceu oito eixos descritores que representaram a variabilidade acumulada dos dados em 88,71%. A alocação dos animais no novo sistema e a construção da região de confiança revelou a presença de seis espúrios ao lote homogêneo formado por 109 animais.

**Conclusão:** O critério biométrico proposto mostra-se eficiente, pois considera o animal como um todo, analisando conjuntamente todos os parâmetros mensurados, além de apresentar pequena frequência de descartes. (Arq Bras Cardiol. 2015; 104(2):97-103)

**Palavras-chave:** Análise Multivariada; Animais; Epidemiologia Experimental; Estenose da Válvula Aórtica.

### Abstract

**Background:** Several researchers seek methods for the selection of homogeneous groups of animals in experimental studies, a fact justified because homogeneity is an indispensable prerequisite for casualization of treatments. The lack of robust methods that comply with statistical and biological principles is the reason why researchers use empirical or subjective methods, influencing their results.

**Objective:** To develop a multivariate statistical model for the selection of a homogeneous group of animals for experimental research and to elaborate a computational package to use it.

**Methods:** The set of echocardiographic data of 115 male Wistar rats with supravalvular aortic stenosis (AoS) was used as an example of model development. Initially, the data were standardized, and became dimensionless. Then, the variance matrix of the set was submitted to principal components analysis (PCA), aiming at reducing the parametric space and at retaining the relevant variability. That technique established a new Cartesian system into which the animals were allocated, and finally the confidence region (ellipsoid) was built for the profile of the animals' homogeneous responses. The animals located inside the ellipsoid were considered as belonging to the homogeneous batch; those outside the ellipsoid were considered spurious.

**Results:** The PCA established eight descriptive axes that represented the accumulated variance of the data set in 88.71%. The allocation of the animals in the new system and the construction of the confidence region revealed six spurious animals as compared to the homogeneous batch of 109 animals.

**Conclusion:** The biometric criterion presented proved to be effective, because it considers the animal as a whole, analyzing jointly all parameters measured, in addition to having a small discard rate. (Arq Bras Cardiol. 2015; 104(2):97-103)

**Keywords:** Multivariate Analysis; Animals; Epidemiology, Experimental; Aortic Valve Stenosis.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

**Correspondência:** Renan Mercuri Pinto •

Rua Thomaz Ceneviva, 117, Vila Anita. CEP 13484-295, Limeira, SP - Brasil

E-mail: renanmp@usp.br; renanmp@icloud.com

Artigo recebido em 26/06/14; revisado em 27/09/14; aceito em 30/09/14.

DOI: 10.5935/abc.20140219

## Introdução

Devido à falta de conhecimento estatístico, muitos pesquisadores optam por utilizar métodos empíricos ou subjetivos para a tomada de decisão, ignorando o processo de casualização, princípio básico para a fidedignidade dos achados, e, conseqüentemente, influenciando seus resultados.

Exemplo de influência muito comum ocorre no processo de homogeneização de amostras, que é importante para a randomização em pesquisas envolvendo animais como unidade experimental. Nesse processo, muitos pesquisadores têm o hábito de fazê-la de maneira fragmentada ou intencional, ou seja, utilizando apenas um parâmetro conveniente para classificar o grupo como homogêneo, fator que, além de resultar em homogeneização viesada e inadequada, favorece a possibilidade de descartar animais por um simples valor espúrio do que por dessemelhança biológica.

O processo de homogeneização mais interessante sob o ponto de vista biológico deve considerar conjuntamente todos os parâmetros avaliados na unidade experimental porque esses são, na sua maioria, correlacionados, e a melhor forma de compreender o comportamento do animal está expressa em um conjunto de informações numéricas que represente todas as suas características biológicas. Dessa forma, há necessidade de métodos estatísticos que considerem o animal como um todo e não de maneira fragmentada, já que o organismo reage de maneira conjunta a qualquer intervenção ou tratamento.

Cabe destacar que, quando se tem uma estrutura de dependência entre variáveis, deve-se utilizar a análise multivariada de dados porque, dessa forma, na estatística inferencial não se tem o índice de significância inflacionado, problema ocorrente quando são realizadas várias análises univariadas simultaneamente<sup>1</sup>.

O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo estatístico multivariado para a seleção de grupo homogêneo de animais para pesquisas experimentais que atenda a princípios biológicos e estatísticos, e elaborar pacote computacional que o operacionalize.

Para exemplificar o desenvolvimento e a aplicação do critério, foi utilizado o conjunto de dados ecocardiográficos de animais submetidos à cirurgia de indução de estenose aórtica (EAo) supra-avalvular, cedido pelo grupo de pesquisa em cardiologia experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Unesp, buscando-se responder as suas dificuldades em selecionar um grupo homogêneo de animais por simples processo de casualização, para posterior submissão a tratamentos de interesse.

## Métodos

### Animais e protocolo experimental

O conjunto de dados ecocardiográficos foi obtido de ratos Wistar machos submetidos à cirurgia para indução de EAo supra-avalvular, sendo este estudo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Experimentação da FMB–Unesp sob o número 850/2010, disponibilizado pelo grupo de pesquisa em cardiologia experimental da

referida instituição. Do conjunto, composto por 115 unidades experimentais, foram utilizados 31 parâmetros referentes à massa corporal e às variáveis estruturais e funcionais obtidas pela ecocardiografia transtorácica (Tabela 1).

Na literatura, encontra-se número considerável de estudos experimentais para o desenvolvimento da remodelação cardíaca por sobrecarga pressórica<sup>2-6</sup>. O modelo de EAo tem sido muito utilizado por promover o desenvolvimento gradual de hipertrofia ventricular esquerda em ratos<sup>5</sup>. Nesse modelo, a sobrecarga pressórica se instala e acentua-se progressivamente à medida que os animais crescem, assemelhando-se, em parte, à EAo no homem. Destacam-se como algumas vantagens, nesse procedimento experimental, a ausência de lesões anatômicas no miocárdio e o baixo custo operacional<sup>4</sup>.

### Indução de estenose aórtica supra-avalvular

A EAo foi induzida de acordo com o método previamente descrito<sup>4-7</sup>. Os animais com três a quatro semanas de vida e pesando 70-90 g, após anestesia com cloridrato de quetamina (60 mg/kg) e cloridrato de xilidino (10 mg/kg), via intraperitoneal (ip), foram submetidos à toracotomia mediana. A aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata com 0,6 mm de diâmetro interno foi colocado a aproximadamente 3 mm da sua raiz (Figura 1). A parede torácica foi fechada, sendo o esterno, as camadas musculares e a pele suturados com fio mononáilon 5.0. Durante a cirurgia, os animais foram ventilados manualmente com pressão positiva, oxigênio a 100%. Concluído o ato cirúrgico, os ratos receberam, por via subcutânea, 1 ml de soro fisiológico aquecido e foram colocados em superfície aquecida até retornarem da anestesia.

### Avaliação ecocardiográfica

A análise ecocardiográfica foi realizada após seis semanas da indução de EAo. Para a realização do exame, os ratos foram anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/kg/ip) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip), e posicionados em decúbito lateral esquerdo. Utilizou-se o ecocardiógrafo modelo Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Israel), equipado com transdutor eletrônico de 12 MHz. Para medir as estruturas cardíacas, foram utilizadas imagens em modo M com o feixe de ultrassom orientado pela imagem bidimensional com o transdutor na posição paraesternal eixo menor. A imagem monodimensional do ventrículo esquerdo (VE) foi obtida posicionando o cursor do modo M logo abaixo do plano da válvula mitral entre os músculos papilares<sup>8</sup>. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição paraesternal eixo menor com o cursor do modo M posicionado ao nível da válvula aórtica. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro em pelo menos cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico do VE (DDVE) e a espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do VE (DSVE) e a espessura sistólica da parede posterior do VE (ESPP) e do septo interventricular (ESSIV) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro mínimo da cavidade. Para avaliar

Tabela 1 – Identificação dos parâmetros mensurados nos animais

Índice	Identificação	Descrição
X <sub>1</sub>	MC (g)	Massa corporal
X <sub>2</sub>	FC (bpm)	Frequência cardíaca
X <sub>3</sub>	DDVE (mm)	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE)
X <sub>4</sub>	DSVE (mm)	Diâmetro sistólico do VE
X <sub>5</sub>	EDPP (mm)	Espessura diastólica da parede posterior do VE
X <sub>6</sub>	ESPP (mm)	Espessura sistólica da parede posterior do VE
X <sub>7</sub>	EDSIV (mm)	Espessura diastólica do septo interventricular
X <sub>8</sub>	ESSIV (mm)	Espessura sistólica do septo interventricular
X <sub>9</sub>	AO (mm)	Diâmetro da aorta
X <sub>10</sub>	AE (mm)	Diâmetro do átrio esquerdo
X <sub>11</sub>	AE/AO	Relação do diâmetro do átrio esquerdo pela aorta
X <sub>12</sub>	DDVE/MC (mm/kg)	Relação de DDVE por MC
X <sub>13</sub>	AE/MC (mm/kg)	Relação de AE por MC
X <sub>14</sub>	DC (ml/min)	Débito cardíaco
X <sub>15</sub>	IndCard (ml/min/kg)	Índice cardíaco
X <sub>16</sub>	PEE	Porcentagem de encurtamento endocárdico
X <sub>17</sub>	PEM	Porcentagem de encurtamento mesocárdico
X <sub>18</sub>	MVE (g)	Massa do VE
X <sub>19</sub>	IMVE (g/kg)	Índice de massa do VE
X <sub>20</sub>	Onda E (cm/s)	Velocidade diastólica inicial do fluxo transvalvular mitral
X <sub>21</sub>	Onda A (cm/s)	Velocidade diastólica final do fluxo transvalvular mitral
X <sub>22</sub>	E/A	Relação onda E pela onda A
X <sub>23</sub>	ERVE	Espessura relativa do VE
X <sub>24</sub>	VEPP (mm/s)	Velocidade de encurtamento da parede posterior do VE
X <sub>25</sub>	TRIV (ms)	Tempo de relaxamento isovolumétrico do VE
X <sub>26</sub>	R-R (seg)	Intervalo entre dois ciclos cardíacos consecutivos
X <sub>27</sub>	TRIVn	TRIV normalizado para a frequência cardíaca
X <sub>28</sub>	Tei-a (ms)	Tempo de contração isovolumétrica + tempo de ejeção + TRIV
X <sub>29</sub>	Tei-b (ms)	Tempo de ejeção
X <sub>30</sub>	IPM	Índice de <i>performance</i> miocárdica
X <sub>31</sub>	FEVE	Fração de ejeção do VE

a função sistólica do VE foram calculadas a porcentagem de encurtamento mesocárdico (PEM),  $\{[(DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV) - (DSVE + \frac{1}{2} ESPP + \frac{1}{2} ESSIV)] / (DDVE + \frac{1}{2} EDPP + EDSIV)\}$  e a velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (VEPP), tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior. No estudo da função diastólica do VE foram medidos os picos das velocidades do fluxo transvalvular mitral correspondentes à fase de enchimento inicial (onda E) e à fase de enchimento tardio, conseqüente à contração atrial (onda A), bem como o cálculo da relação onda E/onda A. Para a obtenção dos fluxos relacionados à função diastólica, o transdutor foi posicionado na região correspondente à ponta do coração na imagem denominada quatro câmaras; a medida dos fluxos foi realizada no monitor do ecocardiógrafo.

### Modelo estatístico

O modelo estatístico desenvolvido para estabelecer o procedimento de análise exploratória multivariada de dados e verificar a homogeneidade do lote envolve simultaneamente todas as variáveis mensuradas e leva em consideração toda a estrutura de variação existente nos dados, ou seja, a variação dentro das variáveis (intravariabilidade) e a variação entre as variáveis (intervariabilidade). Destaca-se que a estrutura global de variação pode ser bem representada por medidas descritivas de variabilidade dos dados, mais especificamente, variâncias e covariâncias.

Além disso, o modelo é elaborado tendo em vista aproveitar todos os animais incluídos na pesquisa do grupo



Figura 1 - Alocação do clipe de prata na válvula aórtica.

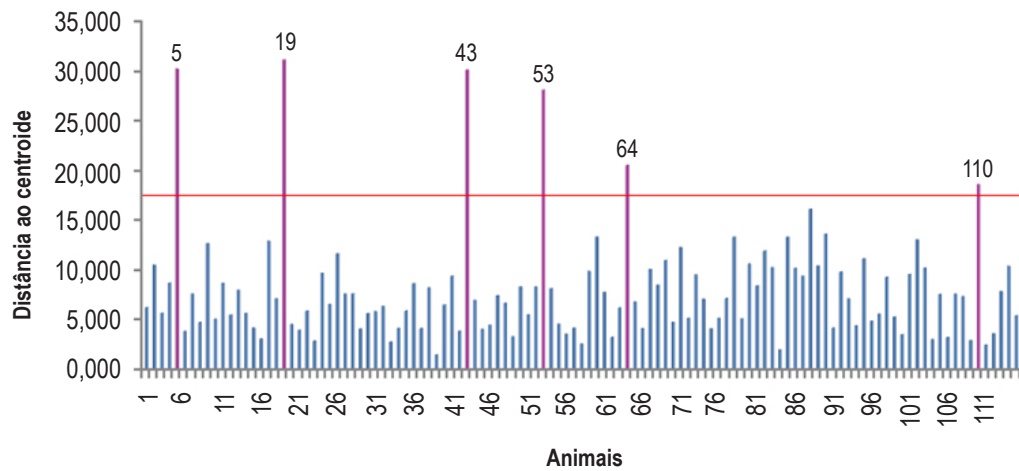


Figura 2 - Distância de Mahalanobis entre os animais e o centroide do grupo.

de remodelação cardíaca que sobreviveram ao processo cirúrgico descrito anteriormente. Dessa forma, não houve critério específico para determinação do número de animais que deveriam participar do estudo.

Inicialmente, pelo fato de os parâmetros se apresentarem em unidades de medida diferentes, os dados foram padronizados, tornando-se adimensionais, ou seja, cada medida foi apresentada como um valor que representa o quanto ela se afasta da média no respectivo parâmetro. Em seguida, para construção do modelo estatístico, intitulado critério *multihomogen*, tomou-se a estrutura matricial de variâncias e covariâncias dos dados padronizados (matriz de variabilidade), que equivale à matriz de correlação (R) do conjunto inicial<sup>9</sup>.

A técnica multivariada empregada na sequência para a análise dos dados consiste na análise dos componentes principais (ACP), cujo princípio básico fundamenta-se na redução do espaço paramétrico sem perda da estrutura de variabilidade conjunta dos dados (no presente estudo, características biológicas do animal) e prejuízo da informação biológica geral do animal. Essa técnica estatística, proposta por Karl Pearson em 1901, consiste em transformar um conjunto inicial de variáveis correlacionadas entre si em outro conjunto de variáveis não correlacionadas, que são combinações lineares ortogonais do inicial<sup>10</sup>.

Os componentes principais (CP) são apresentados por ordem decrescente de importância para a estrutura conjunta de variabilidade dos dados, isto é, o primeiro explica o máximo possível dessa variabilidade, o segundo, o máximo da variabilidade ainda retida no conjunto após o desconto do efeito do primeiro, e assim sucessivamente, até o último componente. Quanto maior for a retenção da variação total em um número menor de combinações lineares, melhor será a aplicação prática desse procedimento aos dados experimentais, embora essa condição não seja fator impeditivo para a utilização do critério para identificar valores espúrios<sup>11</sup>.

Uma propriedade matemática interessante dos CP consiste em todos serem mutuamente não correlacionados e, portanto, no que se refere à aderência à normalidade dos dados, independentes entre si. Esse fato assegura um sistema de eixos ortogonais para a representação gráfica dos animais (unidades experimentais) e que pode ser complementado com inferência estatística para identificar os que podem ser descartados por apresentarem alta probabilidade de ocorrência de valores espúrios à população de origem.

Nesse sentido, existem diversos critérios para determinar o número de eixos descritores (CP) considerados relevantes para o sistema ortogonal. No presente estudo adotou-se o critério de Kaiser, também conhecido como critério da raiz latente, no qual se toma como representativo o CP que contém informação acumulada no respectivo autovalor superior à unidade. Trata-se de componentes que condensam uma considerável variabilidade dos dados<sup>12</sup>.

Para conduta da prática metodológica de homogeneização em pesquisas experimentais ou observacionais, a situação desejável para a informação biológica, principalmente para

a visualização gráfica do procedimento, consiste em ser o número de CP (também denominados eixos descritores), no máximo, três. Porém, para dimensões acima de três (situação comum quando se tem um número considerável de características avaliadas na unidade experimental), a técnica permanece exatamente a mesma, salvo a visualização gráfica, que se torna inviável.

Após alocação dos animais no sistema cartesiano, determinado pelos eixos descritores selecionados, constrói-se a região (elipsoide) de confiança para o perfil médio de resposta homogênea dos animais. A construção da região de 100 (1 -  $\alpha$ )% de confiança fica determinada com a utilização da estatística  $T^2$  de Hotelling transformada na distribuição F de Fisher-Snedecor<sup>13</sup>. Deve também ser considerado que a técnica estatística utilizada para estabelecer a região de confiança envolve a construção de intervalos de inclusão, considerando um nível de confiança conjunto para todas as variáveis, que possibilita verificar se os animais estão ou não dentro do elipsoide<sup>10</sup>.

Nesse sentido, se o vetor de respostas do animal em estudo situar-se no interior do elipsoide de confiança construído (isto é, se a distância generalizada de Mahalanobis do animal ao centroide do elipsoide for menor que a distância do contorno), o animal é classificado como pertencente ao lote homogêneo; caso contrário (distância maior), é identificado como espúrio e, conseqüentemente, não participa do processo de casualização simples dos tratamentos<sup>14</sup>.

Por meio dos procedimentos estatísticos abordados nesta seção, desenvolveu-se o algoritmo generalizado e, conseqüentemente, o pacote computacional, facilitando a operacionalização do critério proposto. Elaborado para o programa estatístico Rstudio (disponibilizado gratuitamente on-line: <http://www.R-project.org>), foi intitulado pacote *multihomogen* e pode ser obtido diretamente (sem custo financeiro) com os autores via e-mail<sup>15</sup>.

## Resultados

A título de operacionalizar o *software* desenvolvido e caracterizar a homogeneidade de um grupo experimental de animais, o critério *multihomogen* foi aplicado ao conjunto de dados relativos aos parâmetros avaliados nos ratos Wistar submetidos à EAo do estudo mencionado anteriormente. A partir da matriz quadrática de variabilidade (de ordem 31), envolvendo as correlações, foram estabelecidos oito eixos descritores, correspondentes aos oito CP selecionados pelo critério de Kaiser, que representaram a variância acumulada do conjunto de dados em 88,71% (Tabela 2).

A partir da nova estrutura dos dados, no sistema gerado pelos oito eixos descritores foram determinadas as distâncias de Mahalanobis de cada animal em relação ao centroide do conjunto de todos os 115 animais. O procedimento estatístico multivariado estabeleceu o valor máximo da distância de um animal ao centroide para que ele se localize no interior do elipsoide, construído para o nível de 95% de confiança, como sendo 17,419. Portanto, os animais cujos valores das distâncias apresentaram-se superiores a esse, destacados na Figura 2, foram considerados fora do

Tabela 2 – Autovalores correspondentes aos componentes selecionados pelo critério de Kaiser

	Autovalor	Variância explicada (%)	Variância acumulada (%)
$\lambda_1$	9,400	30,32	30,32
$\lambda_2$	5,121	16,52	46,84
$\lambda_3$	3,995	12,89	59,73
$\lambda_4$	2,541	8,20	67,93
$\lambda_5$	2,094	6,75	74,68
$\lambda_6$	1,839	5,93	80,61
$\lambda_7$	1,456	4,70	85,31
$\lambda_8$	1,055	3,40	88,71

elipsoide de confiança e, conseqüentemente, apontados como especiais (espúrios) em relação aos situados no interior.

Dessa forma, foram considerados animais espúrios ao grupo os registrados sob os números 5, 19, 43, 53, 64 e 110, ficando então o lote homogêneo formado pelos 109 animais inseridos na região de confiança, que podem ser submetidos a modelos experimentais por simples processo de casualização. Nos animais não incluídos para a homogeneização, o registrado sob número 19 consiste no mais dessemelhante do grupo total, enquanto o 110 é o menos dessemelhante.

## Discussão

Avaliando a quantidade de CP necessários para reter a variabilidade relevante deste estudo, conclui-se que o conjunto de dados referente aos animais induzidos à EAo é uma estrutura complexa do ponto de vista estatístico. Embora seu espaço paramétrico tenha se reduzido substancialmente, foram necessários oito eixos descritores para compor o novo sistema cartesiano, impossibilitando a visualização gráfica do método.

Apesar dessa limitação encontrada, o gráfico representado pela Figura 2 consegue traduzir visualmente o comportamento de cada animal em relação ao grupo. O eixo das ordenadas apresenta a distância de Mahalanobis de cada animal ao centroide do conjunto. Dessa forma, conhecendo a distância do centroide à casca do elipsoide de confiança (representada pela linha horizontal vermelha), fica confortável apontar os animais com comportamento discrepante. A eles cabe um aprofundamento para verificar características não homogêneas ao grupo.

Quanto ao desenvolvimento do modelo estatístico para detecção de animais não homogêneos ao grupo de

estudos, não há qualquer limitação para a aplicação do procedimento na busca por animais espúrios. Sob o aspecto prático da utilização dos resultados do modelo proposto em novos estudos, deve ser considerado que o processo se limita a estudos de animais submetidos à EAo em condições experimentais semelhantes à descrita. Dessa forma, seriam necessários mais estudos/testes para corroborar a confiabilidade do modelo para outras amostras.

No processo de seleção de grupos homogêneos em pesquisas experimentais, ao utilizar procedimentos sem qualquer preocupação com a estrutura geral de variabilidade, o número de descartes de unidades experimentais (animais) tem relevância quando comparado à quantidade de animais espúrios apontados pelo critério proposto neste trabalho. Isso pode ser entendido pelo fato de o método proposto caracterizar o descarte considerando o animal, enquanto os despreocupados com a estrutura geral de variabilidade consideram o descarte fragmentado por variável.

A contribuição do método explica-se pelo melhoramento na qualidade de homogeneização, por assegurar maior fidelidade às características biológicas da inclusão de animais semelhantes e, por conseqüência, motivar pequena frequência de descartes, maximizando o lote homogêneo, para posterior submissão aos tratamentos por processo simples de casualização dos animais.

## Conclusões

O critério apresentado, intitulado critério *multihomogen*, mostra-se eficiente para a seleção de grupos homogêneos de animais em pesquisas experimentais, pois considera a situação biológica do animal como um todo, analisando conjuntamente todos os parâmetros mensurados, além de apresentar pequena frequência de descarte.

Dessa forma, a presente ferramenta biométrica serve de subsídio a pesquisadores das áreas biológicas e da saúde. Especificamente dentro da linha de remodelação cardíaca, em que os animais são submetidos à EAO, os resultados do presente estudo corroboraram as expectativas apresentadas inicialmente nas discussões envolvendo os experimentos previamente realizados pelo Grupo de Pesquisa em Cardiologia Experimental da FMB - Unesp.

### Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Pinto RM, Padovani CR. Obtenção de dados: Campos DHS, Tomasi LC, Cicogna AC, Okoshi K. Análise e interpretação dos dados: Pinto RM, Campos DHS, Tomasi LC, Cicogna AC, Okoshi K, Padovani CR. Análise estatística: Pinto RM, Padovani CR. Obtenção de financiamento: Pinto RM, Padovani CR. Redação do manuscrito: Pinto RM, Campos DHS, Tomasi LC, Padovani CR. Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Pinto RM, Cicogna

AC, Okoshi K, Padovani CR. Orientação/ Supervisão: Padovani CR.

### Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado por Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O presente estudo foi parcialmente financiado por Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de Dissertação de Mestrado de Renan Mercuri Pinto pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

### Referências

- Mesetti AV, Padovani CR. Estudo da divergência genética em girassol por meio de técnicas multivariadas. *Energ Agric Botucatu*. 2009;24(2):14-28.
- Rodrigues MA, Bregagnollo EA, Montenegro MR, Tucci PJ. Coronary vascular and myocardial lesions due to experimental constriction of the abdominal aorta. *Int J Cardiol*. 1992;35(2):253-7.
- Okoshi K, Ribeiro HB, Okoshi MP, Matsubara BB, Gonçalves G, Barros R, et al. Improved systolic ventricular function with normal myocardial mechanism compensated cardiac hypertrophy. *Jpn Heart J*. 2004;45(4):647-53.
- Bregagnollo EA, Mestrinel MA, Okoshi K, Carvalho FC, Bregagnollo IF, Padovani CR, et al. Relative role of left ventricular geometric remodeling and of morphological and functional myocardial remodeling in the transition from compensated hypertrophy to heart failure in rats with supravalvar aortic stenosis. *Arq Bras Cardiol*. 2007;88(2):225-33.
- Bregagnollo EA, Zornoff LA, Okoshi K, Sugizaki M, Mestrinel MA, Padovani CR, et al. Myocardial contractile dysfunction contributes to the development of heart failure in rats with aortic stenosis. *Int J Cardiol*. 2006;117(1):109-14.
- Mendes OC, Sugizaki MM, Campos DS, Damatto RL, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, et al. Exercise tolerance in rats with aortic stenosis and ventricular diastolic and/or systolic dysfunction. *Arq Bras Cardiol*. 2013;100(1):44-51.
- Mendes Ode C, Campos DH, Damatto RL, Sugizaki MM, Padovani CR, Okoshi K, et al. Remodelamento cardíaco: análise seriada e índices de detecção precoce de disfunção ventricular. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94(1):62-70.
- Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell HB, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure overload hypertrophy chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation*. 1995;91(10):2642-54.
- Mingoti SA. Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada. Belo Horizonte: Editora UFMG; 2007.
- Morrison DF. Multivariate statistical methods. 3<sup>rd</sup> ed. New York: McGraw Hill, Inc; 2004.
- Silva NR, Padovani CR. Utilização de componentes principais em experimentação agrônoma. *Energ Agric Botucatu*. 2006;21(4):98-113.
- Hair JF Jr, Black WC, Babin BJ, Anderson RE. Multivariate data analysis. 7<sup>th</sup> ed. New Jersey: Prentice Hall; 2010.
- Johnson RA, Wichern DW. Applied multivariate statistical analysis. 6<sup>th</sup> ed. New Jersey: Prentice Hall; 2007.
- Mahalanobis PC. Historic note on the D<sup>2</sup> statistic. *Sankhya*. 1948;9:237-40.
- The R Core Team. R: a language and environment for statistical computing: reference index. Viena: Foundation for Statistical Computing; 2013.