

BIOESTADISTICA APLICADA: SOFTWARE DL50

Marta Ofelia Rivero¹, Acosta Nelson³, Kornuta Carlos Antonio^{2,3,4}

¹ Cátedra de Bioestadística. Dpto. Matemática, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones; Posadas

²Departamento de Informática, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones; Posadas.

³Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil.

⁴Becario Doctoral CONICET.

morivero@fceqyn.unam.edu.ar, nacosta@exa.unicen.edu.ar ckornuta@exa.unicen.edu.ar

Resumen

Este trabajo presenta un software para el estudio de la supervivencia a través del método probit; el cual es utilizado en diversos trabajos de investigación y en tesis de grado.

El software fue desarrollado para estimar los valores de la dosis letal 50, es una herramienta que permite en pocos pasos obtener el cálculo de la Dosis Letal 50 (DL50) por el método probit. Este indicador, representa la dosis de una sustancia o radiación, que es mortal para la mitad de los individuos de la prueba. En la fase de programación del mismo trabajaron alumnos de la carrera licenciatura en Sistemas de Información de la FCEQyN de la UNaM.

Palabras clave: Bioestadística, DL50, Aplicación, software

Contexto

Este proyecto se encuentra inserto dentro de los proyectos prioritarios del departamento de matemática, como fortalecimiento inter-facultad, es decir el trabajo cooperativo entre distintas carreras de la misma unidad académica. Así surge este proyecto entre la carrera de Farmacia y la Licenciatura en Sistemas de Información.

Introducción

Una de las problemáticas con la que se enfrentan los investigadores en ciencias de la salud es el manejo de datos estadísticos de las muestras trabajadas en el laboratorio. Estas muestras en general son grandes y la mayoría de los software son complejos para ellos dada la diversidad de pasos u opciones a tener en cuenta.

Desde esta inquietud un grupo de investigadores de la carrera de Farmacia solicitó la colaboración de la cátedra de Bioestadística con el fin de hallar un software lo más sencillo de manejar para las investigaciones de supervivencia.

Por lo que se diseñó un software a medida, que cumpla con los requerimientos de este tipo de usuarios.

Se comenzó por determinar los pasos para la obtención del indicador DL50.

El primer paso es el conteo de las plantas muertas en cada extracto y cada blanco, luego, se corrigen las mortalidades mediante la fórmula de Abbott y paralelamente se utiliza otra corrección que se basa en el porcentaje de supervivencia de los individuos. Las fórmulas de estas correcciones son las siguientes:

$$M = \frac{m_e - m_b}{1 - m_b}$$

(Formula de Abbott) (Eq. 1)

Donde:

M = Mortalidad.

m_e = mortalidad en el extracto.

m_b = mortalidad en el blanco.

$$m_e = \frac{r}{n} \text{ (Eq.2)}$$

$$m_b = \frac{r'}{n} \text{ (Eq.3)}$$

r = plantas muertas en el extracto.

r' = plantas muertas en el blanco.

n = Número de individuos.

Como el número de individuos es constante (10 en este caso), la fórmula se expresa:

$$\%M = \frac{(m_e - m_b)}{(10 - m_b)} \times 100 \text{ (Eq. 4)}$$

La segunda corrección utilizada es la siguiente:

$$S = \frac{(S' - r)}{S'} \text{ (Eq. 5)}$$

Donde:

S = supervivencia

S' = plantas vivas en el blanco

Mortalidad = 1 - Supervivencia (Eq. 6)

Igualando las dos ecuaciones anteriores:

$$\%M = \frac{r}{S'} \times 100 \text{ (Eq. 7)}$$

A continuación, se determina el DL50 mediante la ecuación de la gráfica Ldp por el método de los mínimos cuadrados. Para verificar la linealidad se realiza una prueba mediante el estadístico de prueba t de Student bilateral (de dos colas) y n-2 grados de libertad, utilizando el valor del factor de correlación lineal (r_c), donde la hipótesis nula es que no existe correlación entre Probit y el Log10 dosis. Para ello se utiliza la siguiente ecuación:

$$t = \frac{\sqrt{r_c(n-2)}}{\sqrt{1-r_c^2}} \text{ (Eq. 8)}$$

Para probar la adecuación de la gráfica se realiza el test de bondad de ajuste mediante el estadístico Ji - cuadrado (c^2), en este caso la hipótesis nula es que la línea Ldp es un modelo que se ajusta a los datos.

Para el cálculo del c^2 se utiliza la mortalidad esperada de las larvas (P), la cual se halla con los Probit esperados, calculados a partir de la adecuación de la gráfica Ldp. La ecuación es la siguiente:

$$c^2 = S \frac{(r - n.P)^2}{n.P.(1 - P)}$$

(Eq. 9)

El último paso del método gráfico consiste en establecer los límites de confianza para la DL50, para ello se utilizan los coeficientes de ponderación (W) para cada Probit, que se encuentran tabulados. Las ecuaciones necesarias son las siguientes:

$$S_{\log DL50} = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{1}{\sum^N W} + \frac{(\log DL50 - X_{media})^2}{\sum^N W \cdot (X - X_{media})^2}}$$

(Eq. 10)

Donde:

$$X_{media} = \frac{\sum^N W \cdot X}{\sum^N W}$$

(Eq. 11)

$$\begin{aligned} \sum^N W \cdot (x - x_{media})^2 \\ &= \sum^N W \cdot X^2 \\ &= \frac{(\sum^N W \cdot X)^2}{\sum^N W} \end{aligned}$$

(Eq. 12)

El intervalo de confianza es entonces representado como:

$$\log DL50 \pm 1,96 \cdot S_{\log DL50}$$

(Eq. 13)

El valor de 1,96 corresponde a un nivel del 95% de confianza para una distribución normal. Para realizar

estos cálculos se elaboraron tablas en Infostat.

Una vez realizado el método gráfico, se procede a emplear el método de la máxima verosimilitud, que consiste en la suposición de normalidad de la población estudiada, así, se pueden plantear una serie de funciones que denominan los valores de P (Probit) y W (coeficiente de ponderación), con los cuales se pueden hallar los estimativos más próximos para a y b (intercepto en las ordenadas y pendiente), denominados A y B respectivamente, en una línea recta.

1. Con el efecto obtenido, mortalidad en este caso, se encuentra el respectivo valor de Probit (denominado Probit observado o empírico).

2. Se realiza la gráfica de los Probits observados y las dosis metamétricas (X), es decir el Log10 de las dosis.

3. Usando esta línea recta o su ecuación se encuentran los Probits esperados para cada valor de X.

4. Se obtienen los Probits de "trabajo", utilizando para ello las tablas de Probit de trabajo para cada valor de Probit esperado y porcentaje de efecto (% mortalidad).

5. Para cada valor de Probit de trabajo se encuentra el correspondiente valor del coeficiente de ponderación (W).

6. Con estos valores es posible encontrar los estimativos de a y b, correspondientes a los valores A y B, empleando el método de los mínimos cuadrados:

$$\begin{aligned} B &= \frac{\sum W(X - X_{media}) \cdot (Y - Y_{media})}{\sum^N W \cdot (X - X_{media})^2} \\ &= \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \end{aligned}$$

(Eq. 14)

$$A = Y_{media} - B_{xmedia}$$

(Eq. 15)

Donde:

$$X_{media} = \frac{\sum^N W \cdot X}{\sum^N W}$$

(Eq. 16)

$$Y_{media} = \frac{\sum^N W \cdot Y}{\sum^N W}$$

(Eq. 17)

$$S_{xx} = \sum^N W \cdot X^2 - \frac{(\sum^N W \cdot X)^2}{\sum^N W}$$

(Eq. 18)

$$S_{yy} = \sum^N W \cdot Y^2 - \frac{(\sum^N W \cdot Y)^2}{\sum^N W}$$

(Eq. 19)

$$S_{xy} = \sum^N W \cdot XY - \frac{(\sum^N W \cdot X) \cdot (\sum^N W \cdot Y)}{\sum^N W}$$

(Eq. 20)

7. Con estos valores para cada X se puede encontrar una segunda aproximación a la línea de regresión.

8. Utilizando esta línea se puede encontrar un segundo grupo de Probitsesperados para cada X y se repite el ciclo desde el paso 3, este procedimiento se repite hasta que no ocurra cambio significativo en la línea. Se puede comprobar la adecuación de la línea mediante el estadístico de prueba c 2.

$$X^2 = S_{yy} - \frac{(S_{xy})^2}{S_{xx}}$$

(Eq. 21)

9. Para la línea final se obtiene el estimativo de la DL50, resolviendo para $Y = 5$, $\text{Log}_{10}DL50 = (5 - A)/B$, o simplemente interpolando en la gráfica lineal final para $Y = 5$. Para hallar la SLogDL50, utilizada para expresar el intervalo de confianza, se utiliza la ecuación:

$$S \log DL50 = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{1}{\sum^N W} + \frac{(\log DL50 - X_{media})^2}{S_{xx}}}$$

(Eq. 22)

El intervalo de confianza se expresa igual que en el método gráfico (Eq. 13).

Una vez organizadas las formulas y diseñado los algoritmos, correspondientes a la fase de “análisis del sistema”, del ciclo de vida de un producto software, se procedió a la programación o implementación.

Líneas de Investigación, Desarrollo e Innovación

Dentro de este proyecto se integran las siguientes líneas de Investigación y Desarrollo:

- Bioestadística
- Matemática computacional
- Computación
- Análisis de sistemas

En este sentido, nuestro trabajo tiene como eje resolver a través del empleo de un software de manejo sencillo los problemas que se les presentan a los investigadores del área de ciencias de la salud para el manejo de datos de laboratorio.

Resultados y Objetivos

Este software es utilizado en trabajos de investigación de supervivencia que se basan en el método probit con dosis letal 50.

En las tesinas el software es utilizado para estimar los valores de DL_{50} en las pruebas de toxicidad aguda con múltiples concentraciones por el método Probit (método paramétrico).

El Objetivo General, consiste en evaluar la toxicidad a partir del bioensayo homologado y la determinación de la dosis letal 50 (DL_{50}) y como objetivos específicos, se analizan los resultados obtenidos del bioensayo a partir del programa DL_{50} por el método Probit; además, este software se utiliza para determinar muchos tipos específicos de dosis-respuesta o experimentos de tipo binomial, en una diversidad de campos.

Una vez que se ejecuta una regresión, el investigador puede usar la salida del análisis probit con la finalidad de comparar la cantidad de producto químico necesario para crear la misma respuesta en cada uno de los diversos productos químicos. Existen muchos criterios de valoración utilizados para comparar la toxicidad de las sustancias químicas diferentes, pero el LC_{50} (líquidos) o DL_{50} (sólidos) son los resultados más ampliamente utilizados de los modernos experimentos dosis-respuesta. Este software nos permite a partir de la concentración de las dosis suministradas obtener en simples pasos el valor del probit.

Esta herramienta, además de realizar los cálculos necesarios, a partir del ingreso de los datos de la concentración de la dosis administrada y el número de sujetos muertos, obtiene determinados valores estadísticos como ser: la media, la

desviación estándar, los límites de confianza y el probit.

En este contexto, el software se sigue utilizando en tareas de investigación sobre la Lesmaniasis y en las tesis de grado de los alumnos de la carrera Farmacia, correspondiente a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones.

Formación de Recursos Humanos

El equipo de trabajo está conformado por un director (categoría III, del programa de incentivos SPU), profesor de bioestadística, un becario Doctoral CONICET de la Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires, doctorando en Matemática Computacional e Industrial, dos auxiliares informáticos, y alumnos de la carrera licenciatura en sistemas de Información y dos tesistas de grado de la carrera en Farmacia. Las tesis han sido presentadas y aprobadas. Una de ellas versa sobre la determinación de la dosis letal 50 del Glifosato bajo el modelo de ensayo de toxicidad aguda de *Lactuca Sativa* y la otra sobre el Cálculo de la DL_{50} de deltametrina, aplicación de protocolo de bioensayo agudo de letalidad sobre *Artemia Salina*.

Bibliografía

- Finney, D.J, (1952) Probit Analysis. Cambridge University Press
- Greenberg, B.G (1980) Chester Bliss, 1899-1979, International Statistical Review/ revue Internationale de statistique 8 (1) 135-136.
- Hahn, E.D and R Soyer (2008). Probit and logit models: Differences in a multivariate Realm.

- Arregui, María Cristina y otros. (2010). Informe a cerca del grado de toxicidad del glifosato. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé. Capítulo 2, p.17-27. Disponible en: <http://www.unl.edu.ar/noticias/media/docs/Informe%20Glifosato%20UNL.pdf>. Capturado el: 10/10/12.
- Repetto Jiménez, Manuel; Repetto Kuhn, Guillermo. (2009). Toxicología Fundamental. Cuarta edición. Editorial Diaz de Santos. Capitulo 2, p. 23-32