

FANNI PETRONA RUIZ SAMUDIO

**MODELO DE FRAGILIDADE GAMA E REGRESSÃO QUANTÍLICA
EM ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DE ABELHAS MELÍFERAS
EXPOSTAS À PROTEÍNA Cry1Ac**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Estatística Aplicada e Biometria, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S193m
2014

Ruiz Samudio, Fanni Petrona, 1977-

Modelo de fragilidade gama e regressão quantílica em
análise de sobrevivência de abelhas melíferas expostas à proteína
Cry1Ac / Fanni Petrona Ruiz Samudio. – Viçosa, MG, 2014.
xvi, 54f. : il. ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Sebastião Martins Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Abelha - Criação. 2. Abelhas Melíferas. 3. Apis
Mellifera. 4. Proteína Cry1Ac. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Estatística. Programa de
Pós-graduação em Estatística Aplicada e Biometria. II. Título.

CDD 22. ed. 638.1

FANNI PETRONA RUIZ SAMUDIO

**MODELO DE FRAGILIDADE GAMA E REGRESSÃO QUANTÍLICA
EM ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DE ABELHAS MELÍFERAS
EXPOSTAS À PROTEÍNA Cry1Ac**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Estatística Aplicada e Biometria, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2014.

Ana Carolina Campana Nascimento

Fabyano Fonseca e Silva

Moysés Nascimento
(Coorientador)

Maria Augusta Lima Siqueira
(Coorientadora)

Sebastião Martins Filho
(Orientador)

Dedico, a minha FAMÍLIA AMADA,
em especial para meus pais
PETRONA e LORENZO.

AGRADECIMENTOS

Agradecer por meio destas palavras é apenas um gesto da minha mais sincera gratidão àqueles que colaboraram direta, ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

A DEUS por sobre todas as coisas, que me conduziu até aqui e me acompanhou sempre.

Aos meus pais LORENZO e PETRONA, os verdadeiros responsáveis por eu ter chegado até aqui, obrigado pelo grande amor incondicional e o sacrifício pela minha formação; à minha irmã LURDES e meus irmãos ABEL e FABIO, pelo amor incondicional, apoio e compreensão.

A todos os demais membros de minha família, minhas tias, meus tios, primas, sobrinhas, meus afilhados, vizinhos, pelo carinho e apoio de sempre.

Ao Prof. Dr. Sebastião Martins Filho, pela orientação na realização deste trabalho, pela amizade, pelo apoio e grande paciência.

Ao Prof. Dr. Moysés Nascimento, pelo ensinamento, paciência e pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Dra. Maria Augusta Lima Siqueira, pelo apoio e colaboração com os dados da dissertação, pelas sugestões durante a realização deste trabalho.

A todos meus professores do programa, por haver ajudado para minha formação; a todos meus colegas do programa de pós-graduação, pelo companheirismo e paciência desde o início até a finalização do curso, quero mencionar Gabi, Laís, Édimo e em especial a Eliângela pelo carinho.

A todos meus grandes amigos do Paraguai pelo carinho e apoio mesmo à distância; aos novos amigos que fiz em Viçosa, em especial Graciela, Magally,

Johana e Adam, que estiveram sempre de meu lado nesses momentos difíceis dando uma palavra de apoio.

A meus amigos William e Laura, pelo carinho e pela ajuda na correção deste trabalho; a minha querida amiga Nildita pela ajuda na tradução e o apoio de sempre.

As autoridades, colegas e companheiros da Facultad de Ciencias Agrarias da Universidad Nacional de Asunción, pelo apoio na realização deste curso de pós-graduação, em especial ao Dr. Gilberto Páez† pelo incentivo e apoio para fazer uma pós-graduação fora do meu país.

Ao programa de pós-graduação em Estatística Aplicada e Biometria da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade. Igualmente agradeço à Carla, secretaria do programa, pela paciência e ajuda de sempre.

À CAPES e ao PAEC OEA/GCUB, pela bolsa de estudo concedida para a realização deste mestrado e do trabalho de final de curso; e ao CONACYT-Paraguay, pelo aporte complementar para conclusão do mestrado.

A todos muito obrigado.

BIOGRAFIA

FANNI PETRONA RUIZ SAMUDIO, filha de Petrona Samudio de Ruiz e Lorenzo Ramón Ruiz, nasceu em Luque, Paraguai, no dia 6 de março de 1977.

Em 1997, iniciou o curso de Licenciatura em Ciencias Estadística na Facultad de Ciencias Exactas y Naturales da Universidad Nacional de Asunción, Paraguai, o qual concluiu no ano 2000.

No ano 2002, ingressou no corpo docente da Facultad de Ciencias Agrarias da Universidad Nacional de Asunción. Atualmente é Docente-Investigador do Departamento de Investigación da mesma facultade.

Em março 2012 ingressou no programa de Pós-Graduação em Estatística Aplicada e Biometria, da Universidade Federal de Viçosa, em nível de Mestrado, submetendo-se a defesa no dia 28 de fevereiro de 2014.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELA.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xii
RESUMEN.....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS.....	5
CAPÍTULO I - MODELO DE FRAGILIDADE GAMA EM SOBREVIVÊNCIA DE ABELHAS MELÍFERAS EXPOSTAS À PROTEÍNA Cry1Ac.....	7
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
RESUMEN.....	9
INTRODUÇÃO.....	11
METODOLOGIA.....	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
CONCLUSÕES.....	19
REFERÊNCIAS.....	19
CAPÍTULO II - REGRESSÃO QUANTÍLICA EM SOBREVIVÊNCIA DE ABELHAS MELÍFERAS EXPOSTAS À PROTEÍNA Cry1Ac.....	21
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
RESUMEN.....	24
INTRODUÇÃO.....	25
METODOLOGIA.....	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
CONCLUSÕES.....	36
REFERÊNCIAS.....	36
CONCLUSÕES GERAIS.....	39
APÊNDICE.....	41

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I - MODELO DE FRAGILIDADE GAMA EM SOBREVIVÊNCIA DE ABELHAS MELÍFERAS EXPOSTAS À PROTEÍNA Cry1Ac7

Figura 1. Curvas de sobrevivência obtidas a partir do modelo de fragilidade Gama, para abelhas coletadas em duas colônias diferentes (colônia 2: de maior fragilidade e colônia 5: de menor fragilidade) que foram submetidas à ingestão de dieta artificial pura, dieta artificial diluída em água com Cry1Ac e dieta artificial diluída em água. A linha horizontal indica a sobrevivência de 75% (quantil 0,75) e as linhas verticais indicam tempos de vida (dias) nesse quantil.....18

CAPITULO II- REGRESSÃO QUANTÍLICA EM SOBREVIVÊNCIA DE ABELHAS MELÍFERAS EXPOSTAS À PROTEÍNA Cry1Ac21

Figura 1. Curvas de taxas de falha de larvas de diferentes colônias testadas com três diferentes dietas: D0= dieta artificial pura, D1= dieta diluída em água com Cry1Ac e D2=dieta artificial diluída em água.....31

Figura 2. Curvas da regressão quantílica para o efeito das dietas. Coeficientes estimados pelo método Portnoy (Coef) para 1:99/100 quantis (Q), dos $\log(t)$ de sobrevivência de larvas de diferentes colônias testadas com três diferentes dietas: (a) $\beta_1(\tau)$ =D1 (dieta diluída em água com Cry1Ac) vs. D0 (artificial pura) e (b) $\beta_2(\tau)$ =D2 (artificial diluída em água) vs. D0 (artificial pura). A região sombreada refere-se a uma faixa de confiança pontual de 90% para o coeficiente correspondente. A linha horizontal em 0 representa a hipótese nula de nenhum efeito para cada covariável.....34

LISTA DE TABELA

CAPITULO I - MODELO DE FRAGILIDADE GAMA EM SOBREVIVÊNCIA DE ABELHAS MELÍFERAS EXPOSTAS À PROTEÍNA Cry1Ac.....7

Tabela 1. Teste associado às estimativas do modelo de fragilidade Gama dos tempos de sobrevivência de *A. mellifera*. Larvas da espécie coletadas em cinco colônias diferentes e criadas “in vitro” submetidas à ingestão de três diferentes dietas ao longo do desenvolvimento: dieta artificial pura (padrão de comparação), dieta artificial diluída em água com Cry1Ac (D1), dieta artificial diluída em água (D2). Em cada tratamento (dieta) foram observadas 200 abelhas, 40 larvas de cada colônia, totalizando 600 indivíduos em estudo.....16

Tabela 2. Teste de significância dos valores preditos (z_j) de fragilidade das cinco colônias de *A. mellifera* estudadas. Larvas da espécie criadas “in vitro” submetidas à ingestão de três diferentes dietas ao longo do desenvolvimento: dieta artificial pura (padrão de comparação), dieta artificial diluída em água com Cry1Ac (D1), dieta artificial diluída em água (D2). Em cada tratamento (dieta) foram observadas 200 abelhas, 40 larvas de cada colônia, totalizando 600 indivíduos em estudo17

CAPITULO II - REGRESSÃO QUANTÍLICA EM SOBREVIVÊNCIA DE ABELHAS MELÍFERAS EXPOSTAS À PROTEÍNA Cry1Ac.....21

Tabela 1. Coeficientes da regressão quantílica para o efeito das dietas. Coeficientes estimados pelo método Portnoy (Coef) para 1:19/20 quantis (Q) e 1000 reamostragem *Bootstrap*, dos $\log(t)$ de sobrevivência de larvas de diferentes colônias testadas com três diferentes dietas: (a) $\beta_1(\tau)$ =D1 (dieta diluída em água com Cry1Ac) vs. D0 (artificial pura) e (b) $\beta_2(\tau)$ =D2 (artificial diluída em água) vs. D0 (artificial pura)32

RESUMO

RUIZ SAMUDIO, Fanni Petrona. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Modelo de fragilidade gama e regressão quantílica em análise de sobrevivência de abelhas melíferas expostas à proteína Cry1Ac.** Orientador: Sebastião Martins Filho. Coorientadores: Moysés Nascimento e Maria Augusta Lima Siqueira.

As abelhas são seres indispensáveis para a manutenção da biodiversidade e além disso, são responsáveis por grande porcentagem da produção mundial de alimentos. A *Apis mellifera* é considerada espécie de grande valor econômico, devido a seus produtos para o consumo humano. Atualmente, com a criação de transgênicos resistentes a insetos, aumentou a possibilidade das abelhas entrarem em contato com as proteínas Cry derivada da bactéria *Bacillus thuringiensis*, que pode ser tóxica às abelhas, tornando o estudo dos riscos de toxicidade importante. Portanto, o estudo dessas proteínas nas abelhas pode ser realizada por meio das técnicas da análise de sobrevivência. Nestas técnicas a variável resposta é o tempo até a ocorrência do evento de interesse, denominado tempo de falha, e se a falha não ocorrer, o tempo é denominado censura, que é uma informação parcial. O principal interesse é estimar parâmetros para descrever a sobrevivência ou riscos, num certo tempo determinado. Usualmente quando existem covariáveis que possam influir no tempo de sobrevivência o ajuste pode ser realizado pelo Modelo Regressão de Cox, também conhecido como de modelo de riscos proporcionais, pela suposição dos riscos proporcionais entre os indivíduos ao longo do tempo. No Capítulo I deste trabalho é realizada uma adaptação da Regressão de Cox conhecida como Modelo de Fragilidade, que além de explicar o risco do indivíduo falhar por influência de covariáveis, também descreve a existência de alguma variável aleatória não observada que agrupa indivíduos em conglomerados naturais ou artificiais. Os tempos de sobrevivência foram modelados para explicar o risco de falhar das operárias imaturas de *A. mellifera* sob o efeito de covariáveis, sendo a colônia utilizada como variável aleatória e a ingestão da proteína Cry1Ac como variável explicativa fixa. Para avaliar a

toxicidade de Cry1Ac sobre *A. mellifera*, foram testadas três diferentes dietas: artificial pura (D0), artificial diluída em água com Cry1Ac (D1) e artificial diluída em água (D2). Os indivíduos foram coletados de cinco colônias diferentes mantidas em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. A variável aleatória colônia (fragilidade) foi significativa, indicando diferenças estatísticas nos tempos de vida das abelhas provenientes de diferentes colônias. Dentro dessa diversidade de fragilidade, a dieta artificial diluída em água apresentou risco maior de falhar, significativamente diferente do efeito da dieta controle (artificial pura). Portanto, a sobrevivência das larvas de abelhas foi diminuída em virtude da adição de água na dieta, pela diluição do alimento. No entanto, a dieta baseada na proteína Cry1Ac não mostrou risco de falha significativo quando comparado com o controle. Uma técnica alternativa ao Modelo de Cox é apresentada no Capítulo II deste trabalho. Quando se verifica que os riscos dos indivíduos, ao longo do tempo dentro da amostra, não são proporcionais, é necessário estratificar ou realizar um outro procedimento na análise. Uma alternativa que pode ser utilizada é a Regressão Quantílica, que estuda a relação entre a variável dependente e as variáveis explicativas nos quantis condicionais, por meio da minimização de erros absolutos ponderados. Esta técnica possui propriedades de equivariância, invariância para transformações monotônicas e robustez na presença de *outlier*. Assim, pela equivariância podem ser aplicados aos dados com censura. Foi verificado que no mesmo conjunto de dados de biossegurança da proteína Cry1Ac em abelhas denominadas *A. mellifera* que os riscos de falhar dos indivíduos não são proporcionalidades para as diferentes dietas estudadas. Os tempos de sobrevivência das abelhas foram ajustados pela regressão quantílica, utilizando o estimador de Portnoy para 14 quantis. Nos quantis {0,10; 0,15; 0,30; 0,40} os coeficientes $\beta_1(\tau)$ são valores negativos significativamente diferentes de zero. Por tanto, nestes quantis os indivíduos alimentados com a dieta pura (D0) tiveram maior tempo de sobrevivência, que aqueles que têm incorporado à proteína Cry1Ac na dieta (D1), isto aconteceu entre os indivíduos mais novos, já que nesses quantis os tempos de vida das larvas são inferiores ao tempo de vida mediano. Os coeficientes $\beta_2(\tau)$ para os quantis {0,35; 0,50; 0,60} apresentaram efeito negativo estatisticamente significativos, por tanto a incorporação da água

na dieta influiu na sobrevivência das larvas aproximadamente nos tempos medianos de vida.

ABSTRACT

RUIZ SAMUDIO, Fanni Petrona. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2014. **Gamma frailty model and quantile regression in the survival analysis of honeybees exposed to Cry1Ac protein.** Advisor: Sebastião Martins Filho. Coauthors: Moysés Nascimento and Maria Augusta Lima Siqueira.

Bees are essential for the maintenance of biodiversity. They are also responsible for a large percentage of world food production. The species *Apis mellifera* is considered of great economic value due to its products for human consumption. The creation of insect-resistant transgenic products has increased the chances for the contact between bees and the Cry proteins derived from the bacterium *Bacillus thuringiensis*, which can be toxic to bees. Therefore, it is very important to study the hazards of toxicity. The study of these proteins in bees can be conducted by using survival analysis techniques, in which the response variable is the time until the occurrence of the event of interest, called failure time. If failure does not occur, time is called censoring, which is some partial information. The main interest is to estimate parameters to describe the survival or hazards, at a given time. In general, when there are covariates that may affect the survival time, adjustment can be performed by the Cox Regression Model, also known as proportional hazards model, through the assumption of proportional hazards among individuals over time. Chapter I, which deals with an adaptation of the Cox Regression model known as Fragility Model, not only explains the hazard of failure from individuals due to the effect of covariates, but also describes the existence of an unobserved random variable that groups individuals in natural or artificial conglomerates. The survival times were modeled to explain the hazard of failure by immature workers of *A. mellifera* under the effect of covariates; the colony was used as a random variable; and the ingestion of Cry1Ac protein, as fixed explanatory variable. Three different diets were tested to evaluate the toxicity of Cry1Ac on *A. Mellifera*: pure artificial (D0), artificial diluted in water with Cry1Ac (D2) and artificial diluted in water (D2). The individuals were collected from five different colonies maintained in

Viçosa, Minas Gerais, Brazil. The random variable colony (frailty) was significant, which indicates statistical differences in the lifespans of bees from different colonies. Considering this diversity of frailty, the artificial diet diluted in water showed a higher hazard of failure, significantly different from the effect of the control diet (artificial pure). Therefore, the survival of the bee larvae was decreased due to the addition of water to the diet, which diluted the feed. However, the Cry1Ac-protein-based diet showed no significant hazard of failure when compared with the control. An alternative technique to the Cox model is presented in Chapter II of this work. When no proportional hazards of the individuals over time are observed within the sample, it is necessary to stratify or perform some other weakening of the proportional hazard condition. It can be used the Quantile Regression, which studies the relationship between the dependent variable and the explanatory variables in the conditional quantiles by minimizing the weighted mean absolute errors. This technique has properties of equivariance, invariance for monotonic transformations and robustness in the presence of outliers. Thus, by means of equivariance, they can be applied to data with censoring. It was found that, in the same set of biosafety data from the Cry1Ac protein, in honeybees called *A. Mellifera*, the hazards of failure by individuals are not proportionalities for the different diets studied. The survival times of bees were adjusted by quantile regression, by using the Portnoy estimator for 14 quantiles. In quantiles $\{0.10; 0.15; 0.30; 0.40\}$, the $\beta_1(\tau)$ coefficients are negative values significantly different from zero. For such, in these quantiles, the individuals fed with pure diet (D0) had longer survival time compared to those fed with a diet containing Cry1Ac protein (D1). This was observed among younger individuals, since the lifespan of the larvae lifespans in these quantiles are below the average time of life. The $\beta_2(\tau)$ coefficients for the quantiles $\{0.35; 0.50; 0.60\}$ presented statistically significant negative effect. Therefore, water addition to the diet affected the survival of larvae approximately at the average lifespans.

RESUMEN

RUIZ SAMUDIO, Fanni Petrona. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, febrero de 2014. **Modelo de fragilidad gamma y regresión cuantílica en análisis de supervivencia de abejas melíferas expuestas a proteína Cry1Ac.** Director: Sebastião Martins Filho. Consejeros: Moysés Nascimento y Maria Augusta Lima Siqueira.

Las abejas son seres esenciales para el mantenimiento de la biodiversidad, además, son responsables, en gran porcentaje, de la producción mundial de alimentos. La especie *Apis mellifera* se considera de gran valor económico, debido a sus productos para el consumo humano. Actualmente, con la creación de transgénico resistente a los insectos, aumenta la posibilidad de que las abejas entren en contacto con las proteínas Cry derivados de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, que puede ser tóxico para las abejas, por eso el estudio de riesgo de toxicidad es importante, específicamente la proteína Cry1Ac para el control de Lepidópteros. Una herramienta útil para el estudio del efecto de las proteínas en las abejas es a través de las técnicas de análisis de supervivencia. En estas técnicas de la variable de respuesta es el tiempo hasta la ocurrencia del evento de interés, denominado tiempo de falla, y si no se produce la falla, el tiempo se llama la censura, que es una información parcial. El interés principal es estimar parámetros para describir el riesgo de supervivencia en un momento dado. Por lo general, cuando hay covariables que pueden influir sobre la respuesta, el ajuste del tiempo de supervivencia puede ser realizada por el modelo de regresión de Cox, también conocido como modelo de riesgos proporcionales, este asume que los riesgos entre los individuos son proporcionales a través del tiempo. En el Capítulo I de este trabajo se trata de una adaptación del modelo de regresión de Cox conocido como modelo de Fragilidad, que además de explicar el riesgo de la influencia individual de covariables, también describe la existencia de alguna variable no observada directamente que agrupa a los individuos en conglomerados naturales o artificial. Los tiempos de supervivencia se modelaron para explicar el riesgo de falla de las operarias inmaduras de *A. mellifera* bajo el

efecto de dos covariables, la colonia se utiliza como una variable aleatoria y la ingestión de proteína Cry1Ac como variable fija explicativa. Para evaluar la toxicidad de Cry1Ac en *A. mellifera* se probaron tres dietas diferentes: artificial pura (D0), artificial diluida en agua con Cry1Ac (D1) y artificial diluida en agua (D2). Los individuos fueron recolectados de cinco colonias distintas de la ciudad de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. La variable aleatoria colonia (fragilidad) fue significativa, lo que indica que existen diferencias significativas en la duración de la vida de las abejas de diferentes colonias. Dentro de esta diversidad de fragilidad, la dieta artificial diluida en agua (D2) mostró un mayor riesgo de fallar, significativamente diferente del efecto de la dieta de control (artificial pura). Por lo tanto, la supervivencia de las larvas de las abejas se redujo debido a la adición de agua en la dieta, por dilución de la alimentación. Sin embargo, la dieta a base de proteínas Cry1Ac no mostró un riesgo significativo de fallar cuando se compara con el control. Una técnica alternativa para el modelo de Cox se presenta en el capítulo II de este trabajo. Cuando los riesgos de los individuos dentro de la muestra no son proporcionales, es necesario estratificar o flexibilizar alguna otra condición acerca del supuesto de riesgo proporcional. Como alternativa se puede utilizar la regresión cuantílica, que estudia la relación entre la variable dependiente a través de cuantiles condicionales por minimización de los errores absolutos ponderados. Esta técnica tiene propiedades de equivarianza, invariancia de transformaciones monótonas y robustez en presencia de valores atípicos. Por lo tanto, por la equivarianza se puede aplicar a los datos con la censura, ya que no modifica la interpretación de los datos originales. Los resultados del estudio de bioseguridad de la proteína Cry1Ac en abejas mostraron que los riesgos de fracaso de los individuos no son proporcionalidades para diferentes dietas estudiadas. Los tiempos de supervivencia abejas fueron ajustados por regresión cuantílica, utilizando el estimador de Portnoy fueron calculados 14 cuantiles. En los cuantiles 0.10, 0.15, 0.30, 0.40 los coeficientes β_1 (τ) son valores negativos significativamente diferentes de cero. Por lo tanto, en estos cuantiles los individuos alimentados con la dieta pura (D0) tuvieron mayor supervivencia que aquellos que han incorporado la proteína Cry1Ac en la dieta (D1), esto sucedió entre los individuos más jóvenes, desde los tiempos de vida de

las larvas de estos cuantiles se encuentran por debajo del promedio de tiempo de vida. Los coeficientes $\beta_2(\tau)$ para los cuantiles 0.35, 0.50, 0.60 presento efecto negativo, estadísticamente significativo, por lo tanto la incorporación de agua en la dieta influye en la supervivencia de las larvas, en estos cuantiles, que se encuentran aproximadamente cerca de los tiempos de vida mediano.

INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas são seres indispensáveis para o processo de polinização de várias espécies de plantas com flores, o que resulta em grande variabilidade genética vegetal na formação de frutos. Estes organismos estão associados a várias culturas, e na maioria dos ecossistemas terrestres, são os principais polinizadores (BIESMEIJER; SLAA, 2006). Estudos sobre a ação das abelhas no meio ambiente evidenciam a extraordinária contribuição desses insetos na preservação da vida vegetal e também na manutenção da variabilidade genética (NOGUEIRA-COUTO, 1998).

Nos últimos anos, populações de várias espécies de abelhas têm entrado em declínio em todo o mundo e as causas dessa diminuição ainda são desconhecidas. Este declínio é denominado CCD (*colony collapse disorder*) (POTTS *et al.*, 2010b). Ainda não foi detectada a principal causa do CCD, mas entre as hipóteses levantadas estão o aumento da suscetibilidade a doenças e inimigos naturais, estresse causado pelo transporte a longas distâncias, ausência de recursos alimentares e exposição a compostos tóxicos. Acredita-se que existe uma complexa interação entre vários fatores e um efeito sinérgico entre eles que resultam no colapso ou desaparecimento das colônias (IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 2012)

Na agricultura são utilizados vários compostos tóxicos para tratamento de pragas, os quais poderiam contribuir para o declínio das colônias de *A. mellifera* (HENRY *et al.*, 2012). Uma das alternativas ao uso desse tipo de inseticida consiste na criação de plantas transgênicas resistentes a insetos (DE MAAGD *et al.*, 2001)

As plantas modificadas geneticamente contendo toxinas Cry são utilizadas como alternativa aos inseticidas convencionais desde a década de 40, como inseticidas microbiológicos exclusivos para algumas espécies (ROMEIS *et al.*, 2006). No entanto, devido à síntese de proteínas entomotóxicas acarretou a possibilidade de que artrópodes não-alvo, como as abelhas, possam entrar em contato com as proteínas inseticidas e diminuir a sua sobrevivência (LIMA, *et al.*, 2012).

O algodão geneticamente modificado, por exemplo, sintetiza a toxina Cry1Ac do *Bacillus thuringiensis*, que poderia ser tóxica às abelhas. Até o momento, poucas espécies de abelhas foram utilizadas em avaliações de toxicidade de produtos transgênicos inseticidas. Devido ao grande valor como polinizador, além da importância econômica da produção de mel, pólen, própolis e geleia real, vários trabalhos verificaram se essas toxinas oferecem riscos à abelha *A. mellifera* (MALONE; PHAM-DELÈGUE, 2001). Esta espécie é considerada o polinizador mais importante do algodão em diversas partes do mundo, devido à sua abundância nas flores (ARPAIA *et al.*, 2006).

Foram desenvolvidas várias pesquisas para avaliar a ocorrência de efeitos de diferentes culturas geneticamente modificadas (GM) sobre insetos não-alvo e a maior parte desses estudos concluiu que culturas Bt apresentam baixo risco para os artrópodes não-alvo, como as abelhas (O'CALLAGHAN *et al.*, 2005). A *United States Environmental Protection Agency* (2001) relatou que a proteína purificada Btk cristal HD-73 (Cry1Ac) não apresentou toxicidade para as larvas de abelhas quando expostas a concentrações de 1.700 e 10.000 vezes os níveis encontrados em pólen e néctar, respectivamente, de algodão transgênico resistente a insetos plantas. No entanto, existem vários exemplos documentados de efeitos adversos de toxinas Cry sintetizadas nas plantas GM sobre diferentes táxons de artrópodes (HILBECK; SCHMIDT, 2006).

Os riscos podem ser avaliados por métodos específicos, como a técnica de Análise de Sobrevivência utilizada nos estudos nos quais o interesse é avaliar o tempo de vida de indivíduos. Nesta análise o principal interesse é ajustar funções para descrever a sobrevivência. Um procedimento muito utilizado quando existem variáveis explicativas, é o modelo de Regressão de Cox (COLOSIMO; GIOLO, 2006).

Existem situações e objetivos que precisam de modelos mais específicos como alternativas para os Modelos de Cox. No Capítulo I, está apresentado o Modelo de Fragilidade que pode ser considerado em situações quando os tempos de sobrevivência são observados em agrupamentos naturais ou artificiais de indivíduos, porque tais tempos podem não atuar de forma independente,

existindo uma possível associação entre os tempos observados dentro dos grupos (DUCHATEAU; JANSSEN, 2008).

Uma análise de sobrevivência com modelos de fragilidade, além de explicar o risco do indivíduo de falhar sob o efeito de covariáveis, visa descrever a existência de alguma variável aleatória não observada que agrupa determinados indivíduos (COLOSIMO; GIOLO, 2006). Nesse contexto, a ideia de Modelos de Fragilidade para os dados de sobrevivência é de considerar a variabilidade nos tempos de vida como provenientes de duas fontes separadas. Uma fonte é, naturalmente, a aleatoriedade simples, que é descrita por uma função de risco. Outra fonte é descrita por um efeito aleatório chamado fragilidade, que é uma variável aleatória, e que pode ser individual, ou comum a vários indivíduos (HOUGAARD, 1995).

Diversas distribuições têm sido sugeridas para estudos de fragilidade, mas a distribuição Gama é a mais utilizada pela conveniência matemática (TOMAZELLA, 2003).

As variáveis de fragilidade são aquelas latentes, ou seja, a observação delas é indireta, sendo, geralmente, os fatores genéticos ou ambientais associados a cada indivíduo (DUCHATEAU; JANSSEN, 2008). Na aplicação desta técnica foram utilizados dados de sobrevivência de abelhas imaturas, considerando a grande importância ambiental e econômica desses organismos. Com essa motivação, o objetivo do Capítulo I foi ajustar os tempos de sobrevivência utilizando Modelos de Fragilidade Gama para explicar o risco de falha de operárias imaturas de *A. mellifera* sob o efeito de covariáveis, adotando a colônia como variável aleatória e a ingestão da proteína Cry1Ac como variável explicativa fixa.

No Capítulo II, esta apresentado um método de análise de dados de sobrevivência alternativo ao Modelo de Cox, para quando a pressuposição de proporcionalidade do modelo é as vezes inadequada, necessitando de estratificação do risco de base ou algum outro enfraquecimento da condição de risco proporcional. Desta forma, um modelo mais flexível pode ser adotado por meio da modelação de quantis condicionais da distribuição do tempo de evento (KOENKER, 2009)

O mesmo autor propôs o uso da Regressão Quantílica para dados censurados, que possui importantes propriedades como robustez e equivariância, pela qual a escala da variável original pode ser alterada, sem que tenha perda de coerência nas conclusões e, portanto, poderá ser utilizada em análise de sobrevivência (KOENKER; BASSETT, 1978).

A Regressão Quantílica oferece uma abordagem flexível para análise de sobrevivência semiparamétrica, já que ao invés de fazer suposições globais sobre como as covariáveis influenciam os tempos de sobrevivência transformados, a regressão quantílica permite concentrar-se na estimativa de particularidades locais da distribuição de sobrevivência condicional (KOENKER, 2005)

Enquanto o modelo de regressão linear especifica mudanças na média condicional, o modelo de regressão quantílica especifica mudanças no quantil condicional. É possível obter entendimento mais completo de como a distribuição da resposta é afetada pelos preditores, incluindo informação sobre mudança da forma, além da locação central (HAO; NAIMAN, 2007).

A Regressão Quantílica é uma extensão da análise de regressão clássica usual, a qual se baseia em médias condicionais. No entanto, os métodos de regressão lineares clássicos baseiam-se na minimização da soma de quadrado dos resíduos e permitem estimar uma classe geral de modelos para as funções médias condicionais, enquanto o método da regressão quantílica oferece um mecanismo para estimar modelos para a função mediana condicional e também toda a gama de outras funções quantis, utilizando minimização dos erros absolutos ponderados (KOENKER; GELING, 2001).

Por outro lado, enquanto os procedimentos clássicos requerem a hipótese prévia de normalidade dos erros a regressão quantílica não precisa dessa hipótese para inferir sobre os parâmetros (KOENKER; BASSETT, 1978).

O objetivo deste Capítulo II foi ajustar os tempos de sobrevivência de operárias imaturas de *A. mellifera* utilizando modelos de Regressão Quantílica, para verificar o efeito da ingestão da proteína Cry1Ac e da colônia sobre o tempo de vida (sobrevivência) dos indivíduos em diferentes quantis.

REFERÊNCIAS

- ARPAIA, S.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; PIRES, C.S.S.; SILVEIRA, F.S. Non-target and biodiversity impacts on pollinators and flower visiting insects. In: Hilbeck, A., Andow, D., Fontes, E. (eds). **Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms Series**. Methodologies for Assessing Bt cotton in Brazil. Cambridge, CABI Publishing, v. 2, p.155-174, 2006.
- BIESMEIJER, J.C.; SLAA, E.J. The structure of eusocial bee assemblages in Brazil. **Apidologie**, n. 37, p. 240-258, 2006.
- COLOSIMO, E.A.; GIOLO, S.R. **Análise de sobrevivência aplicada**. ABE - Projeto Fisher. 1 ed. São Paulo: Edgar Blücher, 2006. 372 p.
- DE MAAGD, R. A., BRAVO, A. & N. CRICKMORE. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, p. 193-199. 2001.
- DUCHATEAU, L; JANSSEN, P. **The Frailty Model. Statistics for Biology and Health**. Springer Science Business Media, LLC. New York. 2008. 317 p.
- ISSAES, R.; KIRK, A.K. Pollination services provided to small and large highbush blueberry fields by wild and managed bees. **Journal of Applied Ecology**, v. 47, p. 841–849. 2010.
- HOUGAARD, P. Frailty Models for Survival Data. **Lifetime Data Analysis**, n. 1, p. 255-273. 1995.
- HENRY, M.; BÉGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J.F.; AUPINEL, P.; APTEL, J.; TCHAMITCHIAN, S.; DECOURTYE, A. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. **Science**, v. 336, p. 348-350. 2012.
- LIMA, M.A.; PIRES, C.; GUEDES, R.; NAKASU, E.; LARA, M.; FONTES, E.; SUJII, E.R.; DIAS, S.; CAMPOS, L. Does Cry1Ac Bt-toxin impair development of worker larvae of Africanized honey bee? **J. Appl. Entomol.**, v. 135, p. 415-422. 2012.
- MALONE, L. A.; M. H. PHAM-DELÈGUE. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees. **Apidologie**, v. 32, p. 287-304. 2001.
- NOGUEIRA-COUTO, R. H. As abelhas na manutenção da biodiversidade e geração de rendas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, n.12, 1998, Salvador-BA. **Anais...** Salvador: 1998, p. 101.

KOENKER, R. **Quantile Regression**. Econometric Society Monographs. 1 ed. New York: Cambridge University Press. 2005. 349 p.

KOENKER, R. Censored Quantile Regression Redux. **J. of Statistical Software**, v. 27, n.6, p.1-29. 2009.

KOENKER, R.; BASSETT, G. Regression Quantiles. **Econometrica**, v. 46, n.1, p.33-50. 1978.

KOENKER, R.; GELING, O. Reappraising Medy Longevity: A Quantile Regression Survival Analysis. **J. of Am. Stat. Assoc.**, v. 96, p. 458-468. 2001.

O'CALLAGHAN, M.; GLARE, T.R.; BURGESS, E.P.J.; MALONE, L.A. Effects of plants genetically modified for insect resistance on no target organisms. **Annual Review of Entomology**, v.50, p.292. 2005.

POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W. E. Global Pollinator declines: trends, impacts and drives. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 25, p. 345-353. 2010b.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Versão 3.0.2. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 22 de setembro de 2013.

ROMEIS J., BARTSCH D., BIGLER F. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to non-target arthropods. **Nat. Biotechnol.**, n. 26. p. 203-208. 2008.

TOMAZELLA, V.L.D. **Modelagem de dados de eventos recorrentes via Processo de Poisson com termo de fragilidade**. Tese (Doutorado)-Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação. São Paulo, 2003.

USEPA. Bt Plant-Incorporated Protectants October 15, 2001 Biopesticides Registration Action Document. **United States Environmental Protection Agency (USEPA)**, Washington D. C. Disponível: http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/bt_brad.htm. Consultado: 18/10/ 2013.

CAPÍTULO I

MODELO DE FRAGILIDADE GAMA EM SOBREVIVÊNCIA DE ABELHAS MELÍFERAS EXPOSTAS À PROTEÍNA Cry1Ac

RESUMO

As abelhas são seres muito importantes no processo de produção de alimento, por ser considerada responsável pela maior parte da polinização das plantas. Nos últimos anos houve um declínio na quantidade de abelhas em todo o mundo e o desaparecimento de colônias completas, sem que seja ainda descoberta a causa principal. Desta forma, há importância em estudar fatores que podem influir na sobrevivência desses organismos. Entre as hipóteses levantadas estão o aumento da suscetibilidade a doenças e inimigos naturais, estresse causado pelo transporte a longas distâncias, ausência de recursos alimentares e exposição a compostos tóxicos. Com os avanços da tecnologia foram criados os OGM, por exemplo, o algodão Bt sintetiza a proteína Cry1Ac, tóxica para várias espécies de artrópodes. Então à *Apis mellifera* sendo espécie polinizadora mais abundante no algodão, está exposta a essa proteína e a ingestão dessa supostamente pode ser tóxica para elas. Além disto, esta toxicidade pode variar entre diferentes colônias, devido à variabilidade genética entre elas. Com os modelos de fragilidade podem ser explicados o risco do indivíduo de falhar por influência de covariáveis e também descrevem a existência de alguma variável aleatória não observada que agrupa indivíduos em conglomerados naturais ou artificiais. As variáveis de fragilidade que poderiam influenciar sobre os indivíduos são, por exemplo, os fatores genéticos ou ambientais. Com o objetivo de ajustar um modelo de fragilidade Gama empregando tempos de sobrevivência, foram utilizados os efeitos da proteína Cry1Ac sobre a abelha *A. mellifera*. Os tempos de sobrevivência foram modelados para explicar o risco de falhar das operárias imaturas de *A. mellifera* sob o efeito de covariáveis, sendo a colônia utilizada como variável aleatória e a ingestão da proteína Cry1Ac como variável

explicativa fixa. Assim sendo, para avaliar a toxicidade de Cry1Ac sobre *A. mellifera*, foram testadas três diferentes dietas: artificial pura, artificial diluída em água e artificial diluída em água com Cry1Ac. Os indivíduos foram coletados de cinco colônias diferentes mantidas em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. A variável aleatória colônia (fragilidade) foi significativa, indicando diferenças estatísticas nos tempos de vida das abelhas provenientes de diferentes colônias. Dentro dessa diversidade de fragilidade, a dieta pura diluída em água apresentou risco maior de falhar, significativamente diferente do efeito da dieta controle (artificial pura). Neste caso a sobrevivência das abelhas foi diminuída em virtude da adição de água na dieta. No entanto, a dieta baseada na proteína Cry1Ac não mostrou risco de falhar significativo quando comparado com o controle.

Palavras chave: *Apis mellifera*, colônias, toxicologia, funções de risco

ABSTRACT

GAMMA FRAILTY MODEL EFFECT ON THE SURVIVAL OF HONEYBEES EXPOSED TO Cry1Ac PROTEIN

Bees are very important in the food production process, it is considered responsible of most of the pollination of plants. In recent years, there has been a decline in the number of bees around the world and complete disappearance of colonies, without having discovered the main cause yet. Therefore the importance of studying factors that could influence the survival of these organisms. Among the hypotheses include increased susceptibility to diseases and natural enemies, stress caused by long transportation distances, lack of food resources and exposure to toxic compounds. With advances in technology of OGM Bt cotton, for example summarizes the Cry1Ac protein, toxic to several species of arthropods were created. So the *Apis mellifera*, being the most abundant pollinator species in cotton, is exposed to this protein intake and this can supposedly be toxic for them. Moreover, this toxicity can vary between different colonies due to genetic variability between them. With frailty models, it

can be explained the risk of failure for the individual influence of covariates, it also describes the existence of some random unobserved variable that groups individuals in natural or artificial conglomerates. Variables that might influence the fragility of individuals are, for example, genetic or environmental factors. In order to fit a model using range frailty survival times, the effects of the Cry1Ac protein on bee *A. mellifera* were used. Survival times were modeled to explain the risk of failure of immature workers of *A. mellifera* under the covariates effect, the colony is used as a random variable and ingestion of Cry1Ac protein as fixed explanatory variable. Therefore, to evaluate the toxicity of Cry1Ac on *A. mellifera* were tested three different diets: artificial diluted in water and artificial diluted with water Cry1Ac. Individuals were collected from five different colonies in Viçosa, Minas Gerais, Brazil. The colony random variable (frailty) was significant, indicating significant differences in lifespans of bees from different colonies. Within this diversity of fragility, pure diet diluted in water showed a higher risk of failure, significantly different from the effect of the control diet (pure artificial). Therefore, bees' survival was decreased due to the addition of water in the diet, by dilution. However, the Cry1Ac protein -based diet showed a significant risk of failure when compared with the control diet.

Keywords: *Apis mellifera* , colonies , toxicology , risk functions

RESUMEN

MODELO DE FRAGILIDAD GAMMA EN SUPERVIVENCIA DE ABEJAS MELÍFERAS EXPUESTAS A PROTEÍNA Cry1Ac

Las abejas son seres muy importantes en el proceso de producción de alimentos, se considera responsable de la mayor parte de la polinización de las plantas. En los últimos años se ha producido un descenso en el número de abejas en todo el mundo y la completa desaparición de las colonias, sin haber descubierto hasta ahora la causa principal. Por lo tanto la importancia del estudio

de los factores que podrían influir en la supervivencia de estos organismos. Entre las hipótesis se resaltan, el aumento de la susceptibilidad a las enfermedades y enemigos naturales, el estrés causado por las largas distancias de transporte, la falta de recursos alimenticios y la exposición a compuestos tóxicos. Con los avances en la tecnología fueron creados de los OGM. O algodón Bt, por ejemplo, sintetiza la proteína Cry1Ac tóxico para varias especies de artrópodos. La especie *Apis mellifera* siendo la más abundante de las especies de polinizadores en el algodón, está expuesto a la ingesta de esta proteína y esto supuestamente puede ser tóxica para ellas. Por otra parte, esta toxicidad puede variar entre diferentes colonias debido a la variabilidad genética entre ellas. Por lo tanto con los modelos de fragilidad se puede explicar el riesgo de falla por influencia de covariables y también describir la existencia de alguna variable no observada que agrupa a los individuos en conglomerados naturales o artificiales. Las variables que podrían influir en la fragilidad de las abejas son, por ejemplo, los factores genéticos o ambientales. Los tiempos de supervivencia se modelaron por fragilidad gamma para explicar el riesgo de fracaso de las operarias inmaduras de *A. mellifera* bajo el efecto de dos covariables, la colonia se utiliza como una variable aleatoria y la ingestión de proteína Cry1Ac como variable explicativa fija. Para evaluar la toxicidad de Cry1Ac en *A. mellifera* se probaron tres dietas diferentes: artificiales artificial diluidas en agua y artificial se diluyó con agua Cry1Ac. Los individuos fueron recolectados de cinco colonias distintas mantenidas en Viçosa, Minas Gerais, Brasil. La variable aleatoria colonia (fragilidad) fue significativa, lo que indica diferencias significativas en la duración de la vida de las abejas de diferentes colonias. Dentro de esta diversidad de fragilidad, la dieta pura diluida en agua mostró mayor riesgo de falla, significativamente diferente del efecto de la dieta de control (artificial pura). Por lo tanto, la supervivencia de abejas se redujo debido a la adición de agua en la dieta, es decir por dilución del alimento. Sin embargo, la dieta a base de proteínas Cry1Ac no mostró un riesgo significativo de falla cuando se compara con el control.

Palabras clave: *Apis mellifera* , colonias , toxicológicos , Funciones de riesgo

INTRODUÇÃO

As abelhas estão entre os principais artrópodes benéficos associados a culturas agrícolas e, na maioria dos ecossistemas mundiais, são os polinizadores mais importantes (BIESMEIJER; SLAA, 2006). A abelha melífera, *A. mellifera* L., é utilizada como polinizadora de diversas culturas, aumentando a produção de alimentos em grande parte do mundo (ISAACS; KIRK, 2010). Apesar da sua importância, populações da espécie estão em declínio em vários países e as causas desse fenômeno, denominado “*colony collapse disorder*” (CCD) ainda não estão esclarecidas (BECHER *et al.*, 2013).

Produtos utilizados na agricultura como os inseticidas sintéticos, podem contribuir para o declínio das colônias de *A. mellifera* (HENRY *et al.*, 2012). Uma das alternativas ao uso desse tipo de inseticida consiste na criação de plantas transgênicas resistentes a insetos. Algumas variedades dessas plantas expressam a proteína Cry1Ac, derivada da bactéria *Bacillus thuringiensis*, utilizada para o controle de lagartas de Lepidoptera (DE MAAGD *et al.*, 2001). O uso dessas plantas pode supostamente expor artrópodes não-alvo, como as abelhas, ao contato com as proteínas inseticidas, o que pode implicar num risco para a sua sobrevivência (MALONE; PHAM-DELÈGUE, 2001). Assim, os efeitos da ingestão desses compostos, sobre abelhas melíferas, principalmente durante o estágio larval, devem ser investigados para nortear o uso seguro desses produtos presentes nas plantas transgênicas, sobre os polinizadores (LIMA, *et al.* 2012).

Em estudos como este, em que há interesse em avaliar o tempo de vida dos indivíduos, a análise de sobrevivência é uma técnica estatística que pode auxiliar na interpretação ajustando funções de risco e de sobrevivência com os tempos de falha (morte) e/ou de censura dos indivíduos em estudo (COLOSIMO; GIOLO, 2006). Em certas situações, os tempos de sobrevivência são observados em agrupamentos naturais ou artificiais de indivíduos e tais tempos podem não atuar de forma independente, existe uma possível associação entre os tempos observados dentro dos grupos (DUCHATEAU; JANSSEN, 2008).

Uma análise de sobrevivência com modelos de fragilidade, além de explicar o risco do indivíduo de falhar sob o efeito de covariáveis, visa descrever a existência de alguma variável aleatória não observada que agrupa determinados indivíduos (COLOSIMO; GIOLO, 2006). Nesse contexto, a ideia de modelos de fragilidade para os dados de sobrevivência é de considerar a variabilidade nos tempos de vida como provenientes de duas fontes separadas. Uma fonte é, naturalmente, a aleatoriedade simples, que é descrita por uma função de risco. Outra fonte é descrita por um efeito aleatório chamado fragilidade, que é uma variável aleatória que pode ser individual, ou comum a vários indivíduos (HOUGAARD, 1995).

Diversas distribuições têm sido sugeridas para estudos de fragilidade, mas a distribuição Gama é a mais utilizada pela conveniência matemática (TOMAZELLA, 2003). As variáveis de fragilidade são aquelas latentes, ou seja, a observação delas é indireta, sendo, geralmente, os fatores genéticos ou ambientais associados a cada indivíduo (DUCHATEAU; JANSSEN, 2008).

Na aplicação desta técnica foram utilizados dados de sobrevivência de abelhas melíferas imaturas, considerando a grande importância ambiental e econômica desses organismos. O objetivo foi avaliar os tempos de sobrevivência utilizando o modelo de fragilidade Gama para explicar o risco de falhar de operárias imaturas de *A. mellifera* sob o efeito de covariáveis.

METODOLOGIA

Os procedimentos para a obtenção dos dados utilizados para a aplicação deste trabalho estão detalhados em Lima *et al.* (2012). Nesta publicação estão descritos os passos para a coleta dos dados, manutenção e criação dos indivíduos de *A. mellifera* utilizados nos bioensaios.

A amostra total foi de 600 larvas criadas “*in vitro*”, 120 indivíduos advindos de cada uma das cinco colônias consideradas no experimento, do apiário da Universidade Federal de Viçosa. Um terço das larvas de cada colônia foi submetido a um dos tratamentos (dieta) a seguir:

Dieta 0 (D0): 164µl de dieta artificial pura (tratamento controle);

Dieta 1 (D1): 164µl de dieta artificial pura + 50µg de proteína Cry1Ac diluída em água destilada e autoclavada;

Dieta 2 (D2): 164µl de dieta artificial pura+ água destilada e autoclavada.

As formas imaturas das abelhas foram mantidas em estufa e observadas diariamente até a emergência das adultas, cujo ciclo é entre 20 e 22 dias.

A variável resposta $t = \min(T, C)$, em que T foi definido como o tempo até a ocorrência da falha (morte), que é o evento de interesse neste estudo. Para o caso em que não houve falha ao término do experimento, foi denominado C (Censura). Esta variável resposta foi quantificada adotando a colônia como variável aleatória uma vez que as abelhas desta espécie são insetos sociais que vivem em comunidade (colônias) e a ingestão da proteína Cry1Ac como variável explicativa fixa.

Os tempos de sobrevivência foram ajustados pelo Modelo de Fragilidade Gama, que é expresso como segue:

$$\lambda_{ij}(t) = z_j \lambda_0(t) \exp\{x'_{ij} \beta\} \quad (1.1)$$

para $i=1,2,\dots,n_j$, β um vetor de dimensão $p=2$ de coeficientes de regressão desconhecidos associados às covariáveis x_{ij} (dietas=D1 e D2 em relação D0), $\lambda_0(t)$ uma função de risco de base desconhecido que corresponde ao risco do indivíduo de falhar quando todas as covariáveis são zero, $z_j = \exp\{w_j\}$ ($j=1,\dots,5$) são fragilidades assumidas serem uma amostra independente e identicamente distribuída da variável aleatória Z (colônias) com distribuição de probabilidade Gama, tal que $E(Z)=1$ e $\text{Var}(Z)=\xi$, isto é, $Z \sim \Gamma(1/\xi, 1/\xi)$ (DUCHATEAU; JANSSEN, 2008). Nesta formulação, os w_j 's são uma amostra independente de alguma distribuição com media 0 e variância θ .

Similarmente, a função de sobrevivência, com a incorporação do termo de fragilidade é expressa por:

$$S(t|x_{ij}) = [S_0(t)]^{(z_j \exp\{x'_{ij} \beta\})}, \quad t \geq 0, \quad (1.2)$$

em que $S_0(t)$ corresponde à sobrevivência de base (COLOSIMO; GIOLO, 2006).

O modelo de fragilidade Gama utiliza no processo de estimação, a função de verossimilhança parcial penalizada (THERNEAU; GRAMBSCH, 2000). Para testar a existência de heterogeneidade ou associação entre as observações, com a hipótese nula sobre a variância $H_0: \text{Var}(Z) = \xi = 0$, foi utilizada a estatística de Wald que assintoticamente têm uma distribuição χ_1^2 ; a variância da variável de fragilidade é uma maneira de quantificar a fragilidade. Se $\xi = 0$ indica que todas as fragilidades serão iguais a 1, ficando reduzido no Modelo de Cox e valores grandes de ξ indicam um alto grau de heterogeneidade entre os grupos e forte associação dentro dos grupos (COLOSIMO; GIOLO, 2006).

Colosimo e Giolo (2006) ressaltam que uma vez constatada que foi rejeitada a nulidade da variância da variável aleatória, torna-se necessário identificar quais grupos tem o valor de fragilidade significativamente diferente de 1 ($z_j = 1$ indica fragilidade nula, $z_j < 1$ indica baixa fragilidade e $z_j > 1$ fragilidade alta).

Foram calculadas também as razões de risco (RR), de acordo com Klein (1992), que pode ser aplicado no caso de $\xi \neq 0$, expresso como:

$$RR(t) = \exp(\beta), \quad (1.3)$$

comparando indivíduos das dietas D1= artificial diluída em água com proteína Cry1Ac e D2= artificial diluída em água, em relação ao controle, D0= artificial pura). A interpretação pode ser feita como uma razão geométrica, quando $RR=1$ os riscos são iguais, quando $RR < 1$ o risco do tratamento é menor que o controle e quando $RR > 1$ o risco do tratamento é maior que o controle. Foram construídos ainda intervalos assintóticos de $(1 - \alpha)100\%$ de confiança, para as estimativas da razão de risco (RR) por (COLOSIMO; GIOLO, 2006):

$$\widehat{RR} \pm z_{\alpha/2} \sqrt{\widehat{Var}(\widehat{RR})}, \quad (1.4)$$

Para descrever o comportamento da sobrevivência relacionado a cada dieta, dentro de cada colônia, foram calculados os tempos quantil ($Q_{0,75}$) referente à Colônia como maior fragilidade (Colônia 2) vs. Colônia de menor fragilidade (Colônia 5), utilizando o método da interpolação linear (COLOSIMO *et al.*, 2002).

Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas no *software* R, pacotes *survival* e *frailty* (R Development Core Team, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos do ajuste do modelo de fragilidade Gama, que incorpora no modelo o efeito do fator dieta mais o efeito da colônia como variável de fragilidade, encontram-se na Tabela 1. Como padrão de comparação foi utilizado o tratamento controle (D0: artificial pura).

A partir da Tabela 1 é possível observar que a estimativa do efeito da dieta artificial diluída em água (D2) em relação à dieta artificial pura (D0, controle), é valor positivo e significativo ao nível de 5%, o que indica que as abelhas alimentadas com dieta artificial diluída em água tiveram uma sobrevivência menor em relação ao controle, poderia ser interpretado que a ingestão de água na dieta afetou negativamente o tempo de vida das larvas de abelhas, pela diluição do alimento. No entanto, a incorporação da proteína Cry1Ac na alimentação (D1) não diferiu significativamente da dieta pura, com relação ao tempo de vida das abelhas.

Com base nos resultados obtidos (Tabela 1), pode-se afirmar que o risco de morte em abelhas tratadas com D2 (artificial diluída em água) é 1,4 vezes o risco das abelhas alimentadas com a D0 (artificial pura), encontrando-se com 95% de confiança dentro do intervalo 1,032 e 1,840, indicando que a alimentação das abelhas com dieta artificial diluída em água diminuiu significativamente a sobrevivência, quando comparado com a dieta controle.

Tabela 1. Teste associado às estimativas do modelo de fragilidade Gama dos tempos de sobrevivência de *A. mellifera*. Larvas da espécie coletadas em cinco colônias diferentes e criadas “in vitro” submetidas à ingestão de três diferentes dietas ao longo do desenvolvimento: dieta artificial pura (padrão de comparação), dieta artificial diluída em água com Cry1Ac (D1), dieta artificial diluída em água (D2). Em cada tratamento (dieta) foram observadas 200 abelhas, 40 larvas de cada colônia, totalizando 600 indivíduos em estudo

Covariável	Coefficiente	E. Padrão	χ^2	RR	IC _{95%} (RR)
D1	0,1980 ^{ns}	0,1500	1,74	1,2190	(0,908;1,640)
D2	0,3200*	0,1470	4,73	1,3780*	(1,032;1,840)

* significativo 5%; ns: não significativo; Razão de Risco (RR)

O risco de morte em abelhas tratadas com D1 (artificial diluída em água com Cry1Ac) não difere do risco de falhar das abelhas alimentadas com D0 (artificial pura), indicando que a proteína Cry1Ac não afetou significativamente a sobrevivência das abelhas em relação a dieta controle (Tabela 1).

Tal resultado é coerente com os trabalhos de Han *et al.* (2010) e Sims (1995), nos quais são mencionados que não foram encontrados efeitos adversos das proteínas Cry1Ac sobre esses organismos não-alvo.

Os resultados deste trabalho também estão de acordo com um estudo, de meta-análises feito com 25 pesquisas utilizando proteínas Cry derivada de *Bacillus thuringiensis* (dos quais 6 são com Cry1Ac), os autores confirmaram que essas proteínas não afetam negativamente a sobrevivência de larvas ou de abelhas adultas testadas em laboratório (Duan *et al.* 2008).

A Tabela 2 mostram os resultados da predição para os valores de fragilidade das cinco colônias estudadas. Pode-se notar que as colônias 1 e 2 apresentaram os maiores valores de fragilidade. Vale ressaltar que se $z_j=1$, isto indica que a fragilidade é nula, todas as abelhas teriam a mesma condição e fragilidade, sem que exista o grão de associação entre elas dentro de cada grupo.

A variância estimada de z_j foi $\hat{\xi} = 0,2570$, e teste para a fragilidade Gama que testa a hipóteses $H_0: \hat{\xi}=0$ mostrou haver associação significativa entre os tempos de sobrevivência dos indivíduos dentro de cada colônia, com $\chi^2 = 36.72$ (<0,0001), o que indica a existência de diferenças significativas entre as fragilidades das colônias.

Tabela 2. Teste de significância dos valores preditos (z_j) de fragilidade das cinco colônias de *A. mellifera* estudadas. Larvas da espécie criadas “in vitro” submetidas à ingestão de três diferentes dietas ao longo do desenvolvimento: dieta artificial pura (padrão de comparação), dieta artificial diluída em água com Cry1Ac (D1), dieta artificial diluída em água (D2). Em cada tratamento (dieta) foram observadas 200 abelhas, 40 larvas de cada colônia, totalizando 600 indivíduos em estudo

Fragilidade	$\hat{z}_j = \exp\{\hat{w}_j\}$	I.C.(\hat{z}_j) 95%
z_1 (colônia 1)	1,1740	(0,719 : 1,910)
z_2 (colônia 2)	1,6270*	(1,012 : 2,620)
z_3 (colônia 3)	0,7460	(0,443 : 1,250)
z_4 (colônia 4)	0,8150	(0,488 : 1,360)
z_5 (colônia 5)	0,6390	(0,376 : 1,080)

* significativo 5%

Os intervalos de confiança calculados para todas as colônias indicam que dentre todas as colônias estudadas, dentro da colônia 2 a fragilidade é significativamente diferente de 1, já que o valor 1 não pertence ao intervalo de confiança, indicando assim que a fragilidade é significativa nesse grupo. Além disso, essa mesma colônia teve o maior risco de falhar, pois obteve o maior valor de z_j . Isto quer dizer que, nessa colônia, caso a falha das abelhas aconteça poderá ser observada em menor tempo. As outras colônias apresentaram valores não significativos da variável aleatória fragilidade, inferiores a 1.

Por exemplo, na Figura 1, é apresentada uma comparação entre dois colônias diferentes, curvas da sobrevivência das abelhas da colônia 2 que apresentaram maior porcentagem de mortalidade em menor tempo, com fragilidade alta e significativamente diferente de 1, e as curvas de sobrevivência das abelhas da colônia 5, de menor fragilidade. Dentro da colônia 5, as curvas para as três dietas testadas decrescem lentamente, em tanto que dentro da colônia 2, as curvas de sobrevivência das três dietas testadas cai rapidamente, dentro do mesmo período de tempo. Nota-se claramente que neste caso, independentemente

do tipo de dieta, as curvas de sobrevivência das abelhas da colônia 2 apresentaram decréscimos mais rápidos ao longo do tempo do que as curvas obtidas a partir dos dados observados para a colônia 5 (Figura 1).

Quantitativamente, na colônia 5, nas três dietas estudadas, (quantil $Q_{0,75}$) 75% dos indivíduos ainda estavam vivos cerca de 17 dias após o início dos experimentos. No entanto, na colônia 2 a mesma porcentagem de indivíduos sobreviveram durante apenas cerca de 5 dias. Portanto, houve uma grande diferença entre os tempos de sobrevivência dos indivíduos destas colônias.

As curvas de sobrevivência das três dietas são muito próximas entre si, em ambas as colônias, 2 e 5, sendo sempre superiores com a dieta artificial pura (Figura 1).

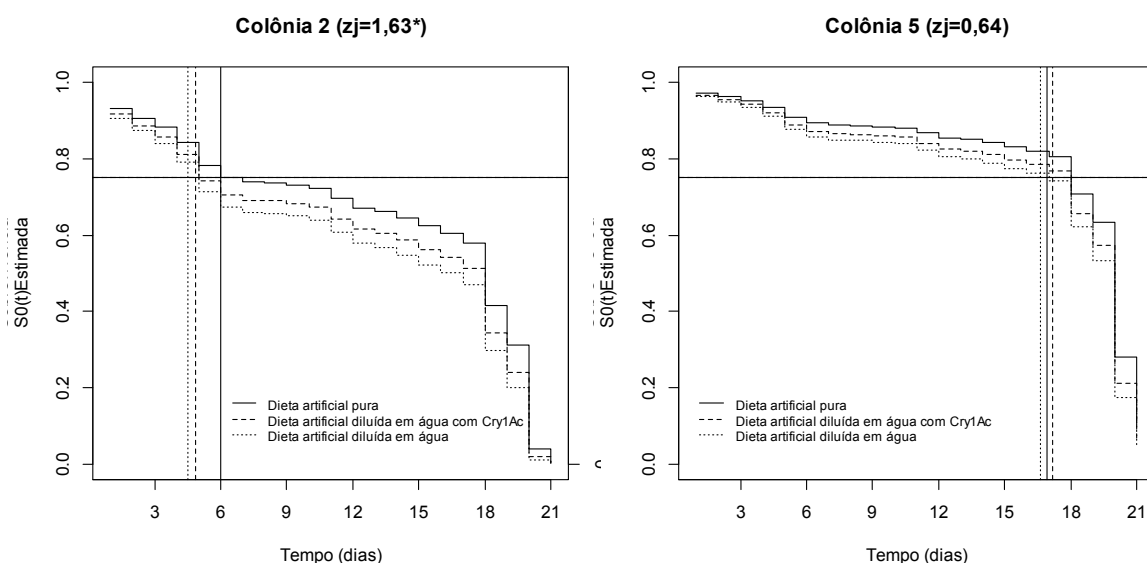


Figura 1. Curvas de sobrevivência obtidas a partir do modelo de fragilidade Gama, para abelhas coletadas em duas colônias diferentes (colônia 2: de maior fragilidade e colônia 5: de menor fragilidade) que foram submetidas à ingestão de dieta artificial pura, dieta artificial diluída em água com Cry1Ac e dieta artificial diluída em água. A linha horizontal indica a sobrevivência de 75% (quantil 0,75) e as linhas verticais indicam tempos de vida (dias) nesse quantil.

CONCLUSÕES

- Existem diferenças significativas na fragilidade dos indivíduos das diferentes colônias, evidenciando heterogeneidade entre as colônias e associação de indivíduos dentro de cada grupo.
- O risco de morte em abelhas tratadas com a dieta artificial diluída em água (D2) é significativamente diferente do risco dos indivíduos alimentados com a dieta controle (D0), quantificada aproximadamente 1,4 vezes o risco de D0 na presença de fragilidade heterogênea entre os indivíduos de diferentes colônias.
- O risco de morte em abelhas tratadas com dieta contendo a proteína Cry1Ac (D1) não diferiu estatisticamente do risco de falhar dos indivíduos alimentados com a dieta artificial pura (D0).

REFERÊNCIAS

- BECHER, M.A.; OSBORNE, J.L.; THORBEC, P.; KENNEDY, P.J.; GRIMM, V. Towards a systems approach for understanding honeybee decline: a stocktaking and synthesis of existing models. **Journal of Applied Ecology**, n.50, p. 868–880. 2013.
- BIESMEIJER, J.C.; SLAA, E.J. The structure of eusocial bee assemblages in Brazil. **Apidologie**, n.37, p. 240-258. 2006.
- COLOSIMO, E.A.; GIOLO, S.R. **Análise de sobrevivência aplicada**. ABE - Projeto Fisher. 1 ed. São Paulo: Edgar Blücher, 2006. 372 p.
- COLOSIMO, E.A.; FERREIRA, F.F., OLIVEIRA, M.D. e SOUZA, C.B. Empirical Comparisons between Kaplan-Meier e Nelson-Aalen Survival Functions Estimators. **Journal of Statistical Computation and Simulation**, n.72, p. 299-308. 2002.
- DE MAAGD, R. A., BRAVO, A. & N. CRICKMORE. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v.17, p. 193-199. 2001.

DUAN, J.J.; MARVIER, M.; HUESING, J.; DIVELY, G.; HUANG, Z.Y. A Meta-Analysis of Effects of Bt Crops on Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). **PLoS ONE**, v. 3, n. 1, p. 1-6. 2008. doi:10.1371/journal.pone.0001415

DUCHATEAU, L; JANSSEN, P. **The Frailty Model. Statistics for Biology and Health.** Springer Science Business Media, LLC. New York. 2008. 317 p.

HAN, P.; NIU, C.Y.; LEI, C.L.; CUI, J.J.; DESNEUX, N. Quantification of toxins in a Cry1Ac + CpTI cotton cultivar and its potential effects on the honey bee *Apis mellifera* L. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 1452–1459. 2010.

HENRY, M.; BÉGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J.F.; AUPINEL, P.; APTEL, J.; TCHAMITCHIAN, S.; DECOURTYE, A. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. **Science**, v. 336, p. 348-350. 2012.

HOUGAARD, P. Frailty Models for Survival Data. **Lifetime Data Analysis**. n.1, p. 255-273. 1995.

ISAACS, R.; KIRK, A.K. Pollination services provided to small and large highbush blueberry fields by wild and managed bees. **Journal of Applied Ecology**, v. 47, p. 841–849. 2010.

KLEIN, J.P. Semiparametric estimation of random effects using Cox model based on the EM algorithm. **Biometrics**, n. 48, p. 795-806. 1992.

LIMA, M.A.; PIRES, C.; GUEDES, R.; NAKASU, E.; LARA, M.; FONTES, E.; SUJII, E.R.; DIAS, S.; CAMPOS, L. Does Cry1Ac Bt-toxin impair development of worker larvae of Africanized honey bee? **J. Appl. Entomol.**, v.135, p. 415-422. 2012.

MALONE, L. A.; M. H. PHAM-DELÈGUE. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees. **Apidologie**, v.32, p. 287-304. 2001.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing.** Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Versão 3.0.2. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 22 de setembro de 2013.

SIMS, S.R. *Bacillus thuringiensis* var.kurstaki (CryIAc) protein expressed in transgenic cotton: effects on beneficial and other non-target insects. **Southwest Entomol.**, n. 20, p. 493–500. 1995.

THERNEAU, T.M., GRAMBSCH, P.M. **Modeling Survival Data: Extending the Cox Model.** Springer-Verlag, New York. 2000. 333 p.

TOMAZELLA, V.L.D. **Modelagem de dados de eventos recorrentes via Processo de Poisson com termo de fragilidade.** Tese (Doutorado)-Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação. São Paulo, 2003.

CAPÍTULO II

REGRESSÃO QUANTÍLICA EM SOBREVIVÊNCIA DE ABELHAS MELÍFERAS EXPOSTAS À PROTEÍNA Cry1Ac

RESUMO

As abelhas são responsáveis por grande parte da produção mundial de alimentos, devido ao processo de polinização que auxilia na reprodução sexuada das plantas e conseqüentemente no aumento de produtividade. Atualmente, com a criação de plantas transgênicas resistentes a insetos, aumentou a possibilidade das abelhas entrarem em contato com toxinas sintetizadas por essas plantas, tais como a proteína Cry1Ac derivada da bactéria *Bacillus thuringiensis*, que supostamente pode ser tóxica às abelhas. Desta forma, estudos que avaliam os riscos de toxicidade dessas proteínas as abelhas constituem uma ferramenta útil, principalmente quando são estudadas por meio de técnicas de análise de sobrevivência. Nestas técnicas a variável resposta é o tempo até a ocorrência do evento de interesse, denominado tempo de falha, e se a falha não ocorrer, o tempo é denominado censura, que é uma informação parcial. O principal interesse é estimar parâmetros para descrever a sobrevivência ou riscos, em determinado tempo. Usualmente quando existem covariáveis que possam influir no tempo de sobrevivência, o ajuste pode ser realizado pelo Modelo Regressão de Cox, também conhecido como modelo de riscos proporcionais. Para quando a suposição de riscos proporcionais é violada, existem modelos alternativos para enfrentar estas situações. Entre outros procedimentos, pode-se utilizar a Regressão Quantílica, que estuda a relação entre a variável dependente e as variáveis explicativas, em quantis condicionais, por meio da minimização de erros absolutos ponderados. Esta técnica possui propriedades de equivariância, invariância para transformações monotômicas e robustez na presença de *outlier*, assim, pela equivariância ela pode ser aplicada a dados com censura. Neste trabalho, as técnicas de Regressão de Cox e Regressão Quantílica foram

utilizadas para modelar um conjunto de dados de biossegurança da proteína Cry1Ac em abelhas melíferas, *Apis mellifera*. Foram testados três tratamentos: D0=Controle contendo dieta pura artificial, D1=mistura de dieta pura e a proteína Cry1Ac diluída em água e D2= dieta pura diluída em água, utilizando indivíduos de cinco colônias selecionados do apiário da Universidade Federal de Viçosa. Foi verificado que os riscos de falhar dos indivíduos não foram proporcionais para as diferentes dietas estudadas. Os tempos de sobrevivência das abelhas foram ajustados pela regressão quantílica, utilizando o estimador de Portnoy para 14 quantis. Nos quantis {0,10; 0,15; 0,30; 0,40} os coeficientes $\beta_1(\tau)$ são valores negativos significativamente diferentes de zero. Portanto, nestes quantis os indivíduos alimentados com a dieta pura (D0) tiveram maior tempo de sobrevivência, que aqueles que têm incorporado à proteína Cry1Ac na dieta (D1), isto aconteceu entre os indivíduos mais novos, já que nesses quantis os tempos de vida das larvas são inferiores ao tempo de vida mediano. Os coeficientes $\beta_2(\tau)$ para os quantis {0,35; 0,50;0,60} apresentaram efeitos negativos significativos, portanto a incorporação da água na dieta influenciou na sobrevivência das larvas aproximadamente nos tempos medianos de vida.

Palavras chave: *Apis mellifera*, estimador de Portnoy, quantis.

ABSTRACT

QUANTILE REGRESSION EFFECT ON THE SURVIVAL OF HONEYBEES EXPOSED TO Cry1Ac PROTEIN

Bees are responsible for much of the world's food production, due to the pollination process that helps sexual reproduction of plants and consequently increases productivity. Nowadays, the creation of transgenic plants resistant to insects favors the the contact between bees and toxins synthesized by these plants, including Cry1Ac protein derived from the bacterium *Bacillus thuringiensis*, which might be toxic to bees. Thus, studies that evaluate the risk of toxicity of these proteins to bees are a useful tool, especially when studied by

using techniques of survival analysis, in which the response variable is the time until the occurrence of the event of interest, called failure time. If failure does not occur, time is called censoring, which is some partial information. The main interest is to estimate parameters to describe the survival or hazards at any given time. In general, when there are covariates that may affect the survival time, the adjustment can be performed by the Cox regression model, also known as proportional hazards model. There are alternative models to be used when the assumption of proportional hazards is violated. Among other procedures, it can be used the Quantile Regression, which studies the relationship between the dependent variable and the explanatory variables, in conditional quantiles, by minimizing the weighted absolute errors. This technique presents properties of equivariance, invariance for monotonic transformations and robustness in the presence of outliers, thus, through equivariance, it can be applied to data with censoring. The Cox Regression and Quantile Regression techniques were used in this study to model a biosecurity dataset of Cry1Ac protein in *Apis mellifera* honey bees. Three treatments were tested: D0= control with pure artificial diet; D1 = mixture of pure diet and Cry1Ac protein diluted in water; and D2 = pure diet diluted with water, using individuals of five colonies selected from the apiary of the Universidad Federal de Viçosa. It was found that the hazards of failure by individuals were not proportional for the different diets studied. The survival times of bees were adjusted by quantile regression, using the Portnoy estimator for 14 quantiles. In the quantiles $\{0.10; 0.15; 0.30; 0.40\}$, the $\beta_1(\tau)$ coefficients are negative values significantly different from zero. Therefore, in these quantiles, the individuals fed with pure diet (D0) presented longer survival than those that added the Cry1Ac protein to the diet (D1). This was observed among younger individuals, since in these quantiles the lifespans of larvae are below the average life time. The $\beta_2(\tau)$ coefficients for the quantiles $\{0.35; 0.50; 0.60\}$ showed significant negative effects, which demonstrates that the addition of water to the diet affected the survival of larvae approximately at the median lifespans.

Keywords: *Apis mellifera*, Portnoy estimator, quantiles

RESUMEN

REGRESIÓN CUANTILICA EN SUPERVIVENCIA DE ABEJAS MELÍFERAS EXPUESTAS A PROTEÍNA Cry1Ac

Las abejas son responsables en gran parte de la producción mundial de alimentos, debido a su participación en el proceso de la polinización de las plantas, mediante este proceso ayuda a aumentar y mejorar la productividad. Actualmente, con la creación de plantas transgénicas resistentes a insectos, el aumento de la posibilidad de las abejas entrar en contacto con estas toxinas sintetizadas por las plantas, tales como proteína Cry1Ac derivados de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, que supuestamente puede ser tóxico para las abejas. Por lo tanto, los estudios que evalúan el riesgo de toxicidad de estas proteínas las abejas son una herramienta muy útil, estos pueden ser mediante técnicas de análisis de supervivencia. En estas técnicas la variable de respuesta es el tiempo hasta la ocurrencia del evento de interés, denominado tiempo hasta la falla, y si no se produce tal evento, el tiempo se llama la censura, que es una información parcial. El interés principal es estimar parámetros para describir la supervivencia o el riesgo en un momento dado. Por lo general, cuando hay covariables que pueden influir en el tiempo de supervivencia, el ajuste se puede realizar según el modelo de regresión de Cox, también conocido como modelo de riesgos proporcionales. Cuando los riesgos no son proporcionales en la muestra, es necesario estratificar o flexibilizar la condición de riesgo proporcional y como alternativa, entre otros procedimientos, puede utilizar la regresión cuantil, que estudia la relación entre la variable dependiente y las variables explicativas, por cuantiles condicionales y minimizando el error ponderado absoluto. Esta técnica tiene propiedades equivarianza, invariancia de transformaciones monotónicas y robustez en presencia de valores atípicos. Así, por la equivarianza datos censurados se pueden aplicar. En este trabajo, se utilizaron las técnicas de regresión cuantilica para modelar un conjunto de datos de la bioseguridad de la proteína Cry1Ac en las abejas *Apis mellifera*. Tres tratamientos fueron probados: D0 = dieta control

que contiene artificial puro, D1 = mezcla de dieta pura con proteína Cry1Ac diluida en agua y D2 = dieta pura diluida con agua, usando cinco colonias seleccionadas del apiario de la Universidad Federal de Viçosa. Se encontró que los riesgos de falla de los individuos no son proporcionalidades para diferentes dietas estudiadas. Los tiempos de supervivencia de las abejas fueron ajustados por regresión cuantílica, utilizando el estimador de Portnoy fueron calculados 14 cuantiles. En cuantiles {0.10, 0.15, 0.30, 0.40} los coeficientes $\beta_1(\tau)$ son valores negativos, significativamente diferentes de cero. Por lo tanto, en estos cuantiles los individuos alimentados con la dieta pura (D0) tuvieron mayor supervivencia que aquellos que han construido la proteína Cry1Ac en la dieta (D1), esto sucedió entre los individuos más jóvenes, los tiempos de vida de estas larvas son inferiores al promedio de tiempo de vida general. Los coeficientes $\beta_2(\tau)$ para cuantiles {0.35, 0.50, 0.60} presento efecto negativo estadísticamente significativo, indicando que la incorporación de agua en la dieta influyeron negativamente, disminuyendo la supervivencia de las larvas.

Palabras clave: *Apis mellifera*, Portnoy estimador, cuantiles.

INTRODUÇÃO

As abelhas são animais que contribuem para produção de alimentos, uma vez que atuam como importantes agentes polinizadores, contribuindo para a reprodução sexuada das plantas com flores, o que resulta na formação de bons frutos (NOGUEIRA-COUTO, 1998). Estes organismos estão associados a várias culturas e na maioria dos ecossistemas terrestres, são os principais polinizadores (BIESMEIJER; SLAA, 2006). Estudos sobre a ação das abelhas no meio ambiente evidenciam a extraordinária contribuição desses insetos na preservação da vida vegetal e também na manutenção da variabilidade genética (NOGUEIRA-COUTO, 1998).

Nos últimos anos, as populações de abelhas melíferas (*Apis mellifera*) começaram a entrar em declínio, fenômeno conhecido como CCD (*colony collapse disorder*) (POTTS *et al.*, 2010b). Dentre as hipóteses levantadas sobre as

causas do CCD, estão a suscetibilidade a inimigos naturais que acometem *A. mellifera* como o ácaro *Varroa destructor*, o protozoário *Nosema ceranae*, algumas espécies de vírus (APV-*Akute paralysis*, IAPV-*Israeli akute paralysis virus*, DWV-*Deform wing virus*, etc.), estresse causado pelo transporte a longas distâncias, ausência de pólen, contato e ingestão de pesticidas, entre outros, sem que seja ainda descoberta a causa principal (IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 2012).

Na agricultura são utilizados compostos tóxicos para tratamento de pragas, como os inseticidas sintéticos, que podem contribuir para o declínio das colônias de *A. mellifera* (HENRY *et al.*, 2012). Uma das alternativas ao uso desse tipo de inseticida consiste na criação de plantas transgênicas resistentes a insetos (DE MAAGD *et al.*, 2001)

As plantas modificadas geneticamente contendo toxinas Cry são utilizadas como alternativa aos inseticidas convencionais (sintéticos) desde a década de 40, como inseticidas microbiológicos para algumas espécies (ROMEIS *et al.*, 2006). No entanto, devido a síntese de proteínas entomotóxicas, acarretou-se a possibilidade de que artrópodes não-alvo, como as abelhas, poderem entrar em contato com as proteínas inseticidas e diminuir a sua sobrevivência (LIMA, *et al.*, 2012).

O algodão geneticamente modificado, por exemplo, sintetiza a toxina Cry1Ac do *Bacillus thuringiensis*, que supostamente pode ser tóxica às abelhas. Até o momento, poucas espécies de abelhas foram utilizadas em avaliações de toxicidade de produtos transgênicos inseticidas. Devido ao grande valor como polinizador, além da sua importância econômica, vários trabalhos verificaram se essas toxinas oferecem riscos à abelha *Apis mellifera* (MALONE; PHAM-DELÈGUE, 2001). Esta espécie é considerada o polinizador mais importante do algodão em diversas partes do mundo, devido à sua abundância nas flores (ARPAIA *et al.*, 2006).

Em estudos nos quais o interesse é avaliar o tempo de vida de indivíduos, uma técnica estatística bastante utilizada é a Análise de Sobrevivência; nesta análise o principal interesse é ajustar funções para descrever a sobrevivência e um procedimento muito utilizado quando existem variáveis explicativas, é o

modelo de Regressão de Cox, também denominado modelo de riscos proporcionais (COLOSIMO; GIOLO, 2006). No entanto, tem havido um reconhecimento de que o pressuposto subjacente da proporcionalidade no modelo de Cox é por vezes violado, necessitando de modelos alternativos. Um deles é a Regressão Quantílica em que a modelagem pode ser realizada por quantis condicionais da distribuição do tempo de evento (KENKER, 2009)

Este mesmo autor propôs o uso da Regressão Quantílica para dados censurados, que possui importantes propriedades como robustez e equivariância, pela qual a escala da variável original pode ser alterada, sem que tenha perda de coerência nas conclusões e, portanto, poderá ser utilizada em análise de sobrevivência (KOENKER; BASSETT, 1978).

A Regressão Quantílica oferece uma abordagem flexível para análise de sobrevivência semiparamétrica, já que em vez de fazer suposições globais sobre como as covariáveis influenciam os tempos de sobrevivência transformados, permite concentrar-se em locais particulares da distribuição de sobrevivência condicional (KOENKER, 2009). Pode-se, por exemplo, explorar o efeito de covariáveis em cada quantil, ou seja, detectar o comportamento dos tempos de sobrevivência ao longo da distribuição completa (KOENKER, 2005), que não pode ser verificado pelas técnicas usuais.

Assim, diferentemente do modelo de regressão linear que especifica mudanças na média condicional, o modelo de regressão quantílica especifica mudanças no quantil condicional. Desta forma, é possível obter entendimento mais completo de como a distribuição da resposta é afetada pelo preditores, incluindo informação sobre mudança da forma, além da locação central (HAO; NAIMAN, 2007). Por outro lado, enquanto os procedimentos clássicos requerem hipótese prévia de normalidade dos erros a regressão quantílica não precisa dessa hipótese para inferir sobre os parâmetros (KOENKER; BASSETT, 1978).

A motivação deste trabalho originou-se do artigo de Koenker e Geling (2001) baseado na pesquisa desenvolvida por Carey *et al.* (1992) sobre o estudo da longevidade da mosca da fruta Mediterrânea. Desta forma, o objetivo foi ajustar os tempos de sobrevivência de operárias imaturas de *A. mellifera*

utilizando modelos de Regressão Quantílica, para verificar o efeito da ingestão da proteína Cry1Ac sobre indivíduos de diferentes colônias.

METODOLOGIA

Os dados utilizados referem-se a uma amostra de 600 larvas de *A. mellifera* criadas “*in vitro*”, advindos de cinco colônias do apiário da Universidade Federal de Viçosa, escolhendo aleatoriamente 120 indivíduos de cada colônia. Um terço dos indivíduos provenientes de cada colônia foi submetido a cada um dos seguintes tratamentos:

Dieta 0 (D0): 164µl de dieta artificial pura (tratamento controle);

Dieta 1 (D1): 164µl de dieta artificial pura + 50µg de proteína Cry1Ac diluída em água destilada e autoclavada;

Dieta 2 (D2): 164µl de dieta artificial pura+ água destilada e autoclavada.

As formas imaturas das abelhas foram mantidas em estufa e observadas diariamente até a emergência das adultas, cujo ciclo varia entre 20 e 22 dias.

Os procedimentos para a obtenção dos dados utilizados para a aplicação deste trabalho estão detalhados em Lima *et al.* (2012). Nesta publicação estão descritos os passos para a coleta dos dados, manutenção e criação dos indivíduos de *A. mellifera* utilizados nos bioensaios.

A variável resposta $t = \min(T, C)$, em que T é definido como o tempo até a ocorrência da falha (morte), que é o evento de interesse neste estudo, e C (Censura) para o caso em que não houve falha até o término do experimento.

Os tempos de sobrevivência foram ajustados pelo modelo de Regressão Quantílica. O modelo básico para análise de dados de sobrevivência de abelhas toma a forma

$$Q_{\log(t)}(\tau|x_i) = x_i^T \beta(\tau), \quad (2.1)$$

com a flexibilização nas restrição paramétrica e a suposição sobre os erros, que são independentes e identicamente distribuídos (KOENKER, 2009).

A escolha da transformação logarítmica é usada principalmente pela facilidade de interpretação e o desejo de alcançar a linearidade na especificação paramétrica. Nestas funções de quantis condicionais, t pode ser recuperado imediatamente a partir do uso de uma transformação inversa, escrevendo a família de funções de quantis condicionais como,

$$Q_t(\tau|x) = \exp\{x^\top \beta(\tau)\}, \quad (2.2)$$

para t , o tempo de sobrevivência não transformada, em que cada $\beta(\tau)$ é um vetor de parâmetros, e para estimar $\beta(\tau)$, basta encontrar $\hat{\beta}(\tau)$ que seja a solução de

$$\min_{\beta \in \mathbb{R}^p} \sum_{i=1}^n \rho_\tau(y_i - x_i^\top \beta), \quad (2.3)$$

onde $\rho_\tau(u) = u(\tau - I)$ com $(u < 0)$ é uma função de perda da teoria da decisão (KOENKER; GELING, 2001).

Para estimar os quantis foi utilizado o método de Portnoy (2003), adequado para dados de censura aleatória, como é o caso deste experimento. Os tempos observados da mudança de estágio das abelhas (censura) aconteceram em tempos que podem diferir para cada indivíduo, ao longo do período estudado. O estimador de Portnoy (2003) é baseado nos quantis da função de distribuição de Kaplan-Meier $\hat{F}(t) = 1 - \hat{S}(t)$ e pode ser expresso como as soluções a um problema de otimização quantílica ponderada associados com observações censuradas, no qual a ponderação é dividida em duas partes: um permanece no tempo observado de censura inicial (y_i) e o resto é deslocado para $y_\infty = +\infty$.

A expressão anterior (2.2) é semelhante ao modelo de riscos proporcionais ou regressão de Cox,

$$\lambda(t|x) = \lambda_0(t) \exp\{x^\top \beta\}, \quad (2.4)$$

aplicando uma transformação monótona ao modelo, isto é,

$$\log \lambda(t|x) = \log \lambda_0(t) - \{x^\top \beta\}, \quad (2.5)$$

Uma formulação simples da regressão quantílica é o de duas amostras do modelo de tratamento-controle, sugerido por Lemhann (1974). Uma noção geral

do efeito de tratamento quantil pode ser definida como: Se ao tratamento é adicionado um incremento $\Delta(x)$ quando a resposta do indivíduo não tratado poderia ser x . Então a distribuição G das respostas de tratamento é da variável aleatória $X + \Delta(X)$, onde X esta distribuída por F .

Esta visão foi elaborada por Duksum (1974), em que o efeito de tratamento quantil é simplesmente a diferença entre os coeficientes dos quantis da distribuição marginal das respostas do tratamento e o controle, expresso como segue:

$$\beta(\tau) = G^{-1}(\tau) - F^{-1}(\tau), \quad (2.6)$$

Isto é precisamente o que é estimado no modelo de regressão quantílica, em geral

$$Q_{Y_i}(\tau|x_i) = \alpha(\tau) + \beta(\tau)x_i, \quad (2.7)$$

em que x_i é o indicador de grupos dieta, $x_i = 0$ indica controle (dieta artificial pura) e $x_i = 1$ indica tratamento.

Quando a variável tratamento toma mais de dois valores, a interpretação requer uma adaptação. No caso de $p = 2$ tratamentos (dietas em relação ao controle) distintos tem-se a formulação a seguir

$$Q_{Y_i}(\tau|x_{ij}) = \alpha(\tau) + \sum_{j=1}^p \beta_j(\tau) x_{ij}, \quad (2.8)$$

em que $x_{ij}=1$ se a observação i é do j – ésimo tratamento e $x_{ij} = 0$ para outros casos. O $\beta_j(\tau)$ constitui o efeito do tratamento quantil, relacionando a distribuição da resposta do controle com respostas dos indivíduos do tratamento j .

Para descrever o comportamento dos tempos de sobrevivência (t) das abelhas incluiu-se a covariável dieta, D1=artificial diluída em água com Cry1Ac e D2=artificial diluída em água, com efeito linear aditivo no $\log(T)$,

$$Q_{\log(t)}(\tau|x_{ij}) = \alpha(\tau) + \beta_1(\tau)x_{i1} + \beta_2(\tau)x_{i2}, \quad (2.9)$$

em que β_1 e β_2 são coeficientes associados com as covariáveis x_{i1} =dieta artificial diluída em água com Cry1Ac e x_{i2} =dieta artificial diluída em água, respectivamente e relacionadas com a dieta controle, artificial pura.

Em cada um dos modelos foi utilizado o método de *bootstrap*, com 1000 reamostragens, para gerar a banda de confiança de 90% para todos os quantis estimados.

Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas no *software* R, utilizando os pacotes *survival* e *quantreg* (R Development Core Team, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas das taxas de falhas ou risco são apresentadas na Figura 1, pode-se notar que as curvas se interceptam em vários períodos de tempo ao longo da distribuição dentro da covariável estudada, evidenciando que não existe proporcionalidade dos riscos dos indivíduos.

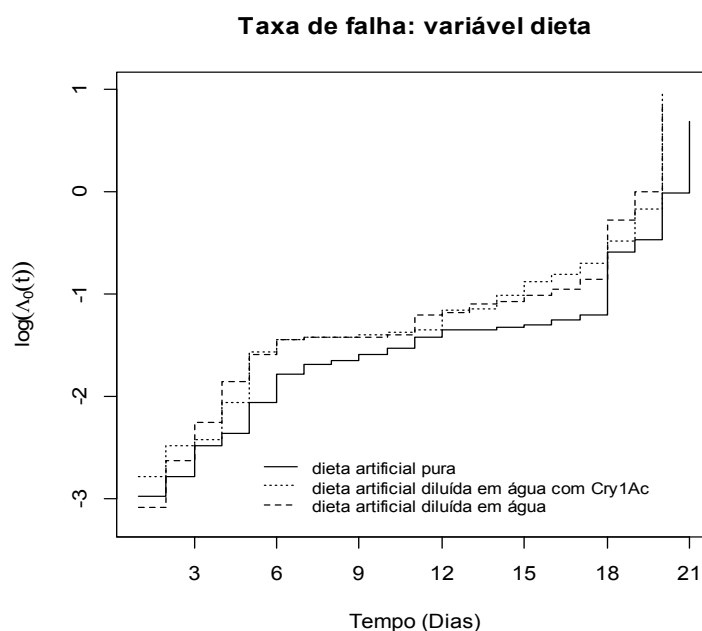


Figura 1. Curvas de taxas de falha de larvas de diferentes colônias testadas com três diferentes dietas: D0= dieta artificial pura, D1= dieta diluída em água com Cry1Ac e D2=dieta artificial diluída em água.

Esta situação impossibilita utilizar o Modelo de Cox para interpretar e fazer conclusões validas, devido a violação da proporcionalidade de risco. Portanto deve-se procurar outras técnicas alternativas para a interpretação dos dados de sobrevivência e uma delas é a Regressão Quantílica.

Na Tabela 1 estão apresentados os coeficientes da Regressão Quantílica para o modelo que inclui como covariável a dieta, D1=artificial diluída em água com Cry1Ac e D2=artificial diluída em água, com efeito linear aditivo no $\log (T)$, pela formulação (2.9), em 14 quantis utilizando o método de estimação de Pornoy (Pornoy, 2003).

Tabela 1. Coeficientes da regressão quantílica para o efeito das dietas. Coeficientes estimados pelo método Portnoy (Coef) para 1:19/20 quantis (Q) e 1000 reamostragem *Bootstrap*, dos $\log (t)$ de sobrevivência de larvas de diferentes colônias testadas com três diferentes dietas: (a) $\beta_1(\tau)$ =D1 (dieta diluída em água com Cry1Ac) vs. D0 (artificial pura) e (b) $\beta_2(\tau)$ =D2 (artificial diluída em água) vs. D0 (artificial pura)

τ	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35
β_1 =D1 vs. D0	-0,05 (1,63)	-0,22* (0,17)	-0,26** (0,10)	-0,60 (0,67)	-0,32 (0,28)	-0,25** (0,11)	-0,10 (0,12)
β_2 =D2 vs. D0	0,61 (1,66)	-0,42 (0,59)	-0,37 (0,39)	-0,60 (0,63)	-0,41 (0,29)	-0,18 (0,23)	-0,04* (0,00)
τ	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70
β_1 =D1 vs. D0	-0,03** (0,00)	-0,05 (0,25)	-0,04 (0,11)	-0,05 (0,13)	-0,01 (0,08)	0,00 (0,13)	-0,03 (0,08)
β_2 =D2 vs. D0	0,00 (0,00)	-0,05 (0,25)	-0,10** (0,02)	-0,05 (0,13)	-0,05** (0,00)	-0,03 (0,06)	-0,03 (0,08)

*, ** Significativo a 5% e 1%, respectivamente; Erros Padrão *Bootstrap* entre parênteses.

Pode-se observar ainda na Tabela 1 que os coeficientes de vários quantis na comparação da D1 (artificial diluída em água com Cry1Ac) com a D0 (Controle=artificial pura), inferiores à mediana ($Tau=0,50$), especificamente nos quantis $\{0,10; 0,15; 0,30; 0,40\}$ são valores negativos significativamente diferentes de zero. Por tanto, nestes quantis os indivíduos alimentados com a dieta pura (D0) tiveram maior tempo de sobrevivência, que aqueles que têm à proteína Cry1Ac incorporada na dieta (D1), isto aconteceu entre os indivíduos mais novos, já que nesses quantis os tempos de vida das larvas são inferiores ao tempo de vida mediano.

No quantil mediano e os quantis superiores os coeficientes $\beta_1(\tau)$ apresentaram resultados não significativos (Tabela 1). Portanto, não existem efeitos adversos da dieta com a proteína Cry1Ac na sobrevivência dos indivíduos de tempos medianos e nos tempos maiores de vida.

Este resultado é comparável, com a maioria das pesquisas que utilizam métodos usuais de análise, baseadas na estimação de valores centrais. É coerente com as afirmações de Han *et al.* (2010) e Sims (1995), que concluíram que não foram encontrados efeitos adversos das proteínas Cry1Ac sobre esses organismos não-alvo. Resultado similar foi observado por Liu *et al.* (2009) que indicou que o pólen do algodão transgênicos Bt+CpTI, que expressa Cry1Ac, não interferiu na sobrevivência das abelhas adultas de *A. mellifera*. E ainda, os resultados nestes quantis estão de acordo com um estudo, de meta-análises realizada por Duan *et al.* (2008), onde os autores confirmaram que a proteína Cry1Ac não afeta negativamente a sobrevivência de larvas e/ou de abelhas adultas testadas em laboratório.

Apesar da maioria dos trabalhos que testaram efeitos de toxinas Cry em abelhas não ter verificado toxicidade sobre indivíduos testados (Duan *et al.* 2008), algumas pesquisas demonstraram que toxinas Cry alteram a memória e o comportamento de *A. mellifera* (Ramirez-Romero *et al.*, 2005; Ramirez-Romero *et al.*, 2008), comprovando efeitos deletérios sobre as abelhas conforme os resultados verificados no presente estudo, especificamente nos tempos iniciais de vida das larvas (Tabela 1).

Quando comparado o Controle com a D2, $\beta_2(\tau)$, apresentados na Tabela 1, os efeitos dentro de cada quantil tiveram um comportamento bem parecido, excetuando o período inicial do experimento, em que se verificou um efeito positivo no primeiro quantil estimado ($Tau=0,05$).

Os coeficientes $\beta_2(\tau)$ para os quantis $\{0,35; 0,50 \text{ e } 0,60\}$ apresentaram efeito negativo significativos, portanto a incorporação da água na dieta influenciou na sobrevivência das larvas aproximadamente nos tempos medianos de vida.

Os 14 quantis considerados nesta análise estão representados na Figura 2 como um resumo visual dos resultados. A região sombreada levemente representa um intervalo de confiança pontual de 90% para cada coeficiente.

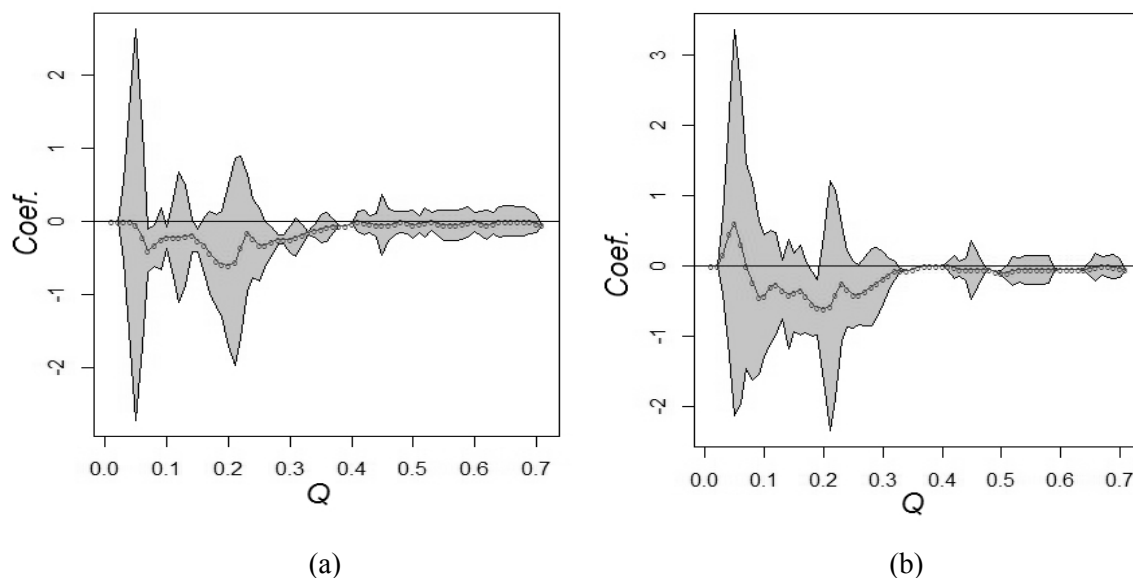


Figura 2. Curvas da regressão quantílica para o efeito das dietas. Coeficientes estimados pelo método Portnoy (Coef) para 1:99/100 quantis (Q), dos $\log(t)$ de sobrevivência de larvas de diferentes colônias testadas com três diferentes dietas: (a) $\beta_1(\tau)$ =D1 (dieta diluída em água com Cry1Ac) vs. D0 (artificial pura) e (b) $\beta_2(\tau)$ =D2 (artificial diluída em água) vs. D0 (artificial pura). A região sombreada refere-se a uma faixa de confiança pontual de 90% para o coeficiente correspondente. A linha horizontal em 0 representa a hipótese nula de nenhum efeito para cada covariável.

O efeito do fator dieta representado na Figura 2(a) retrata a diferença estimada nos quantis de *log* dos tempos de sobrevivência para as abelhas tratadas com D1 vs. D0. A curva dos quantis (linha com círculos pequenos) se coloca abaixo do eixo zero ao longo da distribuição. Nos primeiros tempos de vidas das larvas teve muita dispersão, mas nos tempos maiores, a partir do tempo mediano, pode ser interpretado como de melhor precisão pela diminuição da banda de confiança. A banda fica separada do eixo zero em certos quantis inferiores da mediana, entre os quantis {0,08 e 0,1} e entre os quantis {0,30 e 0,40} aproximadamente. Isto indica que a sobrevivência dos indivíduos alimentados com a dieta artificial pura é maior que aquelas alimentadas com a dieta incorporada com a proteína Cry1Ac. O eixo zero indica que a diferença dos quantis das respostas dos grupos é nula.

No caso do efeito da dieta ilustrada na Figura 2(b), como já foi mencionado acima, pode-se verificar que durante os primeiros intervalos de vida observados, parece haver um efeito positivo da D2 sobre a dieta Controle, especificamente no quantil 0,05. Entre os quantis {0,17 e 0,19} a banda de confiança está separada do eixo zero, evidenciando efeito significativo do coeficiente de comparação D2 vs. D0, isto é, a presença da água na dieta artificial diminuiu a sobrevivência das larvas das abelhas melíferas, nesses quantis.

As análises feitas por meio da Regressão Quantílica permitiram detectar que as distribuições dos tempos de sobrevivência podem ser diferentes em vários intervalos de tempo, como pode ser notado na Figura 2 anteriormente apresentada, em que os coeficientes do modelo da Regressão Quantílica podem-se apresentar, acima, abaixo ou constante no eixo zero. Este comportamento é diferente dos modelos de Regressão de Cox, $\lambda(t|x) = \lambda_0(t) \exp\{x^T\beta\}$, que não pode detectar este tipo de relação por ser monótona. Isto indica que os efeitos são estritamente positivos e crescentes para as covariáveis se $\hat{\beta}_i > 0$ e estritamente negativos e decrescentes com $\hat{\beta}_i < 0$. Por outro lado, é preciso mencionar que em quanto os modelos de regressão linear especificam mudanças na média condicional da variável resposta por efeito das covariáveis, os modelos de

regressão quantílica especificam mudanças no quantil condicional, e oferecem uma visão mais ampla da distribuição da resposta.

CONCLUSÕES

- Os riscos de falhar dos indivíduos não são proporcionalidades para as diferentes dietas estudadas;
- Nos quantis {0,10; 0,15; 0,30; 0,40} os coeficientes $\beta_1(\tau)$ são valores negativos significativamente diferentes de zero. Portanto, nestes quantis os indivíduos alimentados com a dieta pura (D0) tiveram maior tempo de sobrevivência, que aqueles que têm incorporado à proteína Cry1Ac na dieta (D1), isto aconteceu entre os indivíduos mais novos, já que nesses quantis os tempos de vida das larvas são inferiores ao tempo de vida mediano.
- Os coeficientes $\beta_2(\tau)$ para os quantis {0,35; 0,50;0,60} apresentaram efeito negativo estatisticamente significativos, por tanto a incorporação da água na dieta influenciou na sobrevivência das larvas aproximadamente nos tempos medianos de vida.

REFERÊNCIAS

ARPAIA, S.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; PIRES, C.S.S.; SILVEIRA, F.S. Non-target and biodiversity impacts on pollinators and flower visiting insects. In: Hilbeck, A., Andow, D., Fontes, E. (eds). **Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms Series**. Methodologies for Assessing Bt cotton in Brazil. Cambridge, CABI Publishing, v. 2, p.155-174. 2006.

BIESMEIJER, J.C.; SLAA, E.J. The structure of eusocial bee assemblages in Brazil. **Apidologie**, n 37, p. 240-258. 2006.

CAREY, J. R., LIEDO, P., OROZCO, D., and VAUPEL, J. W. Slowing of Mortality Rates at Older Ages in Large Medfly Cohorts, **Science**, n. 258, 457-461. 1992

COLOSIMO, E.A.; GIOLO, S.R. **Análise de sobrevivência aplicada**. ABE - Projeto Fisher. 1 ed. São Paulo: Edgar Blücher. 2006. 372 p.

DE MAAGD, R. A., BRAVO, A. & N. CRICKMORE. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v 17, p. 193-199. 2001.

DUAN, J.J.; MARVIER, M.; HUESING, J.; DIVELY, G.; HUANG, Z.Y. A Meta-Analysis of Effects of Bt Crops on Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). **PLoS ONE**, v. 3, n. 1, p. 1-6. 2008. doi:10.1371/journal.pone.0001415

DOKSUM, K. Empirical Probability Plots and Statistical Inference for Nonlinear Models in the Two Sample Case, **The Annals of Statistics**, n.2, 267-277. 1974.

HAO L.; NAIMAN, D. **Quantile Regression**. Sage Publications, Thousand Oaks, v. 149. 2007.

HAN, P.; NIU, C.Y.; LEI, C.L.; CUI, J.J.; DESNEUX, N. Quantification of toxins in a Cry1Ac + CpTI cotton cultivar and its potential effects on the honey bee *Apis mellifera* L. **Ecotoxicology**, v 19, p. 1452–1459. 2010.

HENRY, M.; BÉGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J.F.; AUPINEL, P.; APTEL, J.; TCHAMITCHIAN, S.; DECOURTYE, A. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. **Science**, v 336, p. 348-350. 2012.

KOENKER, R. **Quantile Regression**. Econometric Society Monographs. 1^a ed. New York: Cambridge University Press. 2005. 349 p.

KOENKER, R. Censored Quantile Regression Redux. **J. of Statistical Software**, v. 27, n. 6, p. 1-29. 2009.

KOENKER, R. **quantreg** package version 4.98: Quantile Regression. R version 3.0.1 (2013-05-16), Disponível: <http://CRAN.R-project.org/package=quantreg>. Acesso em: 27 jun. 2013.

KOENKER, R.; BASSETT, G. Regression Quantiles. **Econometrica**, v. 46, n.1, p.33-50. 1978.

KOENKER, R.; GELING, O. Reappraising Medy Longevity: A Quantile Regression Survival Analysis. **J. of Am. Stat. Assoc.**, v. 96, p. 458-468. 2001.

LEHMANN, E. **Nonparametrics: Statistical Methods Based on Ranks**. San Francisco: Holden-Day. 1974.

LIMA, M.A.; PIRES, C.; GUEDES, R.; NAKASU, E.; LARA, M.; FONTES, E.; SUJII, E.R.; DIAS, S.; CAMPOS, L. Does Cry1Ac Bt-toxin impair development of worker larvae of Africanized honey bee? **J. Appl. Entomol.**, v. 135. p. 415-422. 2012.

LIU, B.; SHU, C.; XUE, K.; ZHOU, K.; LI, X.; LIU, D.; ZHENG, Y.; XU, C. The oral toxicity of the transgenic Bt+CpTI cotton pollen to honey bees (*Apis mellifera*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n 72, 1163-1169. 2009.

MALONE, L. A.; M. H. PHAM-DELE'GUE. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumble bees. **Apidologie**, v 32, p. 287-304. 2001.

NOGUEIRA-COUTO, R. H. As abelhas na manutenção da biodiversidade e geração de rendas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 12, 1998, Salvador-BA. **Anais...** Salvador: 1998, p. 101.

POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W. E. Global Pollinator declines: trends, impacts and drives. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 25, p. 345-353. 2010.

PORTNOY, S. Censored Quantile Regression. **J. of Am. Stat. Assoc.**, v.98, p.1001-1012. 2003.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Versão 3.0.2. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 20 de novembro de 2013.

RAMIREZ-ROMERO, R.; JOSETTE, C.; PHAM-DELE'GUE, M.H. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. **Apidologie** 36:601–611. 2005.

RAMIREZ-ROMERO, R.; DESNEUX, N.; CHAUF AUX, J.; KAISER, L. Bt-maize effects on biological parameters of the non-target aphid *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae) and Cry1AB toxin detection. **Pestic Biochem Physiol** 91:110–115. 2008a.

RAMIREZ-ROMERO, R.; DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; CHAFFIOL, A.; PHAM-DELE'GUE MH. Does Cry1AB protein affect learning performance of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? **Ecotoxicol Environ Safe** 70:327–333. 2008b.

ROMEIS J., BARTSCH D., BIGLER F. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to non-target arthropods. **Nat. Biotechnol.** n. 26, p. 203–208. 2008.

SIMS, S.R. *Bacillus thuringiensis* var.kurstaki (CryIAc) protein expressed in transgenic cotton: effects on beneficial and other non-target insects. **Southwest Entomol.**, n 20, p. 493–500. 1995.

CONCLUSÕES GERAIS

- Existem diferenças significativas na fragilidade dos indivíduos das diferentes colônias, se evidencia heterogeneidade entre as colônias e associação de indivíduos dentro de cada grupo.
- Nos quantis $\{0,10; 0,15; 0,30; 0,40\}$ os coeficientes $\beta_1(\tau)$ são valores negativos significativamente diferentes de zero. Por tanto, nestes quantis os indivíduos alimentados com a dieta pura (D0) tiveram maior tempo de sobrevivência, que aqueles que têm incorporado à proteína Cry1Ac na dieta (D1), isto aconteceu entre os indivíduos mais novos, já que nesses quantis os tempos de vida das larvas são inferiores ao tempo de vida mediano. Nos quantis superiores incluindo a mediana, o risco de morte em abelhas tratadas com dieta contendo a proteína Cry1Ac (D1) não diferiu estatisticamente do risco de falhar dos indivíduos alimentados com a dieta artificial pura (D0).
- O risco de morte em abelhas tratadas com dieta artificial diluída em água (D2) é significativamente diferente com o risco dos indivíduos alimentados com a dieta controle (D0), quantificada como 1,4 vezes mais do risco de D0 na presença de fragilidade heterogênea entre os indivíduos de diferentes colônias. A diluição da dieta artificial em água aumentou significativamente o risco de morte das larvas de abelhas melíferas. Estratificando por quantis, os coeficientes $\beta_2(\tau)$ para os quantis $\{0,35; 0,50; 0,60\}$ apresentaram efeito negativo estatisticamente significativos, por tanto a incorporação da água na dieta influenciou na sobrevivência das larvas aproximadamente nos tempos medianos de vida.
 - Os riscos de falhar dos indivíduos não são proporcionalidades para as diferentes dietas estudadas; então o modelo de Cox é inadequado para inferir sobre os dados, pela qual as duas técnicas de análises são alternativas importantes para interpretação da variável resposta;
- Para pesquisas futuras é imprescindível incorporar mais covariáveis como fatores que pudessem influenciar negativamente na sobrevivência das abelhas, já que até o momento existem resultados contraditórios;

- Em relação da Regressão Quantílica, procurar métodos de comparação dos modelos aplicados na análise de sobrevivência, contendo dados censurados e mensurar os ajustes; e tentar desenvolver *softwares* menos complexos para análises desse tipo de dados.

APÊNDICE

Códigos de programação no *software* R, versão 3.0.2.

```
# Modelo de Fragilidade - pacote survival #
```

```
require(RODBC) # pacote para carregar dados direto do Excel
dados<-odbcConnectExcel("apis.xls")
apis1<-sqlFetch(dados,"Plan1")
str (apis1)

attach(apis1)

require(survival)
```

Para testar Fragilidade Gama

```
fit1<-coxph(Surv(tempo,cens)~factor(di) + frailty(col, sparse=F, dist="gamma"),
data=apis1)
summary(fit1)
fit1$loglik
```

Probabilidade de sobrevivência e de risco

```
H0<-basehaz(fit1,centered=F) # Riscos
S0<-exp(-H0$hazard) #Sobrevivencia
```

Colônia 1

```
c1d0<-S0^(1.174) # dieta 0
c1d1<-S0^(1.174*exp(0.198)) # dieta 1
c1d2<-S0^(1.174*exp(0.320)) # dieta 2
H0$time #Tempos
```

```
tabela1=cbind(H0$time,c1d0,c1d1,c1d2)
```

```
tabela1
```

Colônia 2

```
c2d0<-S0^(1.627) # dieta 0
```

```
c2d1<-S0^(1.627*exp(0.198)) # dieta 1
```

```
c2d2<-S0^(1.627*exp(0.320)) # dieta 2
```

```
tabela2=cbind(H0$time, c2d0,c2d1,c2d2)
```

```
tabela2
```

```
#Cálculo de quantil por interpolação
```

```
#quantil 0,75
```

```
#tempo c2d0
```

```
Qc2d0=((6-5)*(0.75-0.782979486)/(0.749464594-0.782979486))+5
```

```
Qc2d0
```

```
#tempo c2d1
```

```
Qc2d1=((5-4)*(0.75-0.8117869382)/(0.7421397842-0.8117869382))+4
```

```
Qc2d1
```

```
#tempo c2d2
```

```
Qc2d2=((5-4)*(0.75-0.7901177073)/(0.7139712166-0.7901177073))+4
```

```
Qc2d2
```

Colônia 5

```
c5d0<-S0^(0.639) # dieta 0
```

```
c5d1<-S0^(0.639*exp(0.198)) # dieta 1
```

```
c5d2<-S0^(0.639*exp(0.320)) # dieta 2
```

```
tabela5=cbind(H0$time,c5d0,c5d1,c5d2)
```

```
tabela5
```

#Cálculo das medianas por interpolação

#tempo mediano c5d0

$$\text{MEDc5d0} = ((20-19) * (0.5-0.6322665)) / (0.2802810-0.6322665) + 19$$

MEDc5d0

#tempo mediano c5d1

$$\text{MEDc5d1} = ((20-19) * (0.5-0.57187986)) / (0.21214725-0.57187986) + 19$$

MEDc5d1

#tempo mediano c5d2

$$\text{MEDc5d2} = ((20-19) * (0.5-0.53188055)) / (0.17348656-0.53188055) + 19$$

MEDc5d2

#Calculo quantil por interpolação

quantil 0,75

#tempo c5d0

$$\text{qc5d0} = ((18-17) * (0.75-0.7080114)) / (0.2802810-0.8064267) + 17$$

qc5d0

#tempo c5d1

$$\text{qc5d1} = ((18-17) * (0.75-0.76931843)) / (0.65645460-0.76931843) + 17$$

qc5d1

#tempo c5d2

$$\text{qc5d2} = ((17-16) * (0.75-0.76194874)) / (0.74358041-0.76194874) + 16$$

qc5d2

Figuras de Curvas de Sobrevida

Colônia 1

```
par(mfrow=c(3,2))
t<-H0$time

plot(t,c1d0,      type="s",      ylim=range(c(0,1)),xlab="Tempo      (dias)",
ylab="Sobrevivência S0(t) Estimada", xaxt="n")

axis(1,at=seq(0,21,by=3))      #eixos

lines(t,c1d1,type="s",lty=2)
lines(t,c1d2,type="s",lty=3)

legend(0.5,0.3, lty=c(1,2,3),c("Dieta Pura", "Dieta Pura + Cry1Ac", "Dieta Pura
+ Água"), bty="n", cex=0.75)

title("Colônia 1")

abline(v=18.3, lty=1,h=0.5)
abline(v=17.8, lty=2,h=0.5)
abline(v=17.5, lty=3,h=0.5)
```

Colônia 2

```
plot(t,c2d0, type="s", ylim=range(c(0,1)),xlab="Tempo (dias)",
ylab="Sobrevivência S0(t) Estimada", xaxt="n")

axis(1,at=seq(0,21,by=3))

lines(t,c2d1,type="s",lty=2)
lines(t,c2d2,type="s",lty=3)

legend(7,0.2, lty=c(1,2,3),c("Dieta Pura", "Dieta Pura + Cry1Ac", "Dieta Pura +
Água"), bty="n", cex=0.75)

title("Colônia 2")

abline(v=5.98, lty=1,h=0.75)
abline(v=4.88, lty=2,h=0.75)
abline(v=4.52, lty=3,h=0.75)
```


Colônia 3

```
plot(t,c3d0, type="s", ylim=range(c(0,1)),xlab="Tempo (dias)",
ylab="Sobrevivência S0(t)Estimada", xaxt="n")

axis(1,at=seq(0,21,by=3))

lines(t,c3d1,type="s",lty=2)
lines(t,c3d2,type="s",lty=3)

legend(0.5,0.3, lty=c(1,2,3),c("Dieta Pura", "Dieta Pura + Cry1Ac", "Dieta
Pura+ Água"), bty="n", cex=0.75)

title("Colônia 3")

abline(v=17.25, lty=1,h=0.75)
abline(v=16.26, lty=2,h=0.75)
abline(v=14.5, lty=3,h=0.75)
```

Colônia 4

```
plot(t,c4d0, type="s", ylim=range(c(0,1)),xlab="Tempo (dias)",
ylab="Sobrevivência S0(t) Estimada", xaxt="n")

axis(1,at=seq(0,21,by=3))

lines(t,c4d1,type="s",lty=2)
lines(t,c4d2,type="s",lty=3)

legend(0.5,0.3, lty=c(1,2,3),c("Dieta Pura", "Dieta Pura + Cry1Ac", "Dieta Pura
+ Água"), bty="n", cex=0.75)

title("Colônia 4")

abline(v=19.2, lty=1,h=0.5)
abline(v=18.9, lty=2,h=0.5)
abline(v=18.5, lty=3,h=0.5)
```

Colônia 5

```
plot(t,c5d0, type="s", ylim=range(c(0,1)),xlab="Tempo (dias)",
ylab="Sobrevivência S0(t) Estimada", xaxt="n")

axis(1,at=seq(0,21,by=3))

lines(t,c5d1,type="s",lty=2)
lines(t,c5d2,type="s",lty=3)

legend(0.5,0.3, lty=c(1,2,3),c("Dieta Pura", "Dieta Pura + Cry1Ac", "Dieta Pura
+ Água"), bty="n", cex=0.75)

title("Colônia 5")

abline(v=16.92, lty=1,h=0.75)
abline(v=17.17, lty=2,h=0.75)
abline(v=16.65,lty=3,h=0.75)
```

Regressão Quantílica - pacote quantreg

```
rm(list=ls())

require(RODBC) # pacote para carregar dados direto do excel
dados<-odbcConnectExcel("apis.xls")
apis1<-sqlFetch(dados,"Plan2")
str(apis1)

attach(apis1)
require(survival)
require(quantreg)
```

Regressao de Cox e teste de proporcionalidade

```
### Modelo: efeito do fator Dieta

fit1<-coxph(Surv(tempo,cens)~factor(di), data=apis1,x=T,
method="efron") summary(fit1)

resid<-resid(fit1,type="scaledsch")
cox.zph(fit1, transform="identity") ### g(t) = t

par(mfrow=c(3,2))
plot(cox.zph(fit1))
```

Regressão Quantílica

```
# Efeito das dietas
```

```
(Dieta 1 e Dieta 2 em relação da Dieta 0 (controle))
```

```
### Regressao Quantile= Método Portnoy
```

```
fit<-crq(Surv(log(tempo),cens)~factor(di), data = apis1, method = "Por")
```

```
Sfit<-summary(fit, 1:99/100, alpha = .1, se="boot", cov=T, R=1000)
```

```
PHit<-coxph(Surv(tempo, cens)~factor(di), data =apis1, x = T, method="efron")
```

```
par(mfrow=c(1,2))
```

```
plot(Sfit,fit,type="s", ylim=range(c(-3,3)), xlab="Q", ylab="Coef.",  
lty=3,main="")
```

Gráfico de Sobrevivência Modelo de Cox

```
fit<-coxph(Surv(tempo[di==0],cens[di==0]) ~ 1, data=apis1, x = T,  
method="efron")
```

```
ss<- survfit(fit)
```

```
s0<-round(ss$surv,digits=5)
```

```
plot(ss$time, s0, xlab="Tempo (Dias)", ylim=range(c(0,1)), ylab = "S(t)",  
type="s", xaxt="n")
```

```
axis(1,at=seq(0,21,by=3))
```

```
abline(lty=1,h=0.85, col="red")
```

```
fit<-coxph(Surv(tempo[di==1],cens[di==1]) ~ 1, data=apis1, x = T,  
method="efron")
```

```
ss<- survfit(fit)
```

```
s0<-round(ss$surv,digits=5)
```

```
lines(ss$time,s0,type="s",lty=3)
```

```
fit<-coxph(Surv(tempo[di==2],cens[di==2]) ~ 1, data=apis1, x = T,  
method="efron")
```

```
ss<- survfit(fit)
```

```
s0<-round(ss$surv,digits=5)
```

```
lines(ss$time,s0,type="s",lty=4)
```

```
legend(4,0.4,lty=c(1,3,2),c("Dieta Pura", "Dieta Pura+Agua+Bt", "Dieta  
Pura+Agua"), lwd=1,bty="n",cex=0.8)
```

```
title("Apis")
```

Gráfico de Risco (taxa de falha) para o fator dieta

```
fit<- coxph(Surv(tempo[di==0], cens[di==0])~1, data=apis1, x = T,  
method="efron")
```

```
ss<- survfit(fit)
```

```
s0<-round(ss$surv,digits=5)
```

```
H0<- -log(s0)
```

```
plot(ss$time,log(H0), xlab="Tempo (Dias)",ylim=range(c(-3.2,1)), ylab =  
expression(log(Lambda[0]* (t))), type="s", xaxt="n")
```

```
axis(1,at=seq(0,21,by=3))
```

```
fit<-coxph(Surv(tempo[di==1],cens[di==1]) ~ 1, data=apis1, x =  
T,method="efron")
```

```
ss<- survfit(fit)
```

```
s0<-round(ss$surv,digits=5)
```

```
H0<- -log(s0)
```

```
lines(ss$time,log(H0),type="s",lty=3)
```

```
fit<-coxph(Surv(tempo[di==2],cens[di==2]) ~ 1, data=apis1, x = T,
```

```
method="efron")
```

```
ss<- survfit(fit)
```

```
s0<-round(ss$surv,digits=5)
```

```
H0<- -log(s0)
```

```
lines(ss$time,log(H0),type="s",lty=2)
```

```
legend(12, -2.5, lty=c(1,3,2), c("Dieta Pura", "Dieta Pura+Agua+Bt", "Dieta  
Pura+Agua"), lwd=1, bty="n", cex=0.8)
```

```
title("Apis")
```