

Análisis de supervivencia aplicado al estudio de la mortalidad en injertos de inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten)

Survival analysis applied to the study of grafts mortality in inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten)

Judith Josefina GARCÍA BOLÍVAR

Instituto de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Avenida Universidad. Vía El Limón, Maracay, estado Aragua. Apartado Postal 4579. Venezuela E-mail: garciaj66@gmail.com

Recibido: 13/06/2012

Fin de arbitraje: 24/07/2012

Revisión recibida: 18/09/2012

Aceptado: 22/11/2012

RESUMEN

En el análisis de supervivencia existen dos métodos poderosos y ampliamente usados: Kaplan-Meier y Modelo de Riesgos Proporcionales de Cox. El método de Kaplan-Meier permite comparar supervivencia entre grupos o categorías, pero no permite modelar la influencia de predictores, ello se puede lograr con el modelo de regresión de Cox en el cual se consideró además la selección de variables usando el procedimiento paso a paso. Estas metodologías son aplicables a aquellos casos en los cuales la variable respuesta es el tiempo de mortalidad. Como aplicación se consideró el estudio de la mortalidad en injertos realizados en plantas de inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten) en Venezuela, debido a que se observó alta mortalidad en los injertos y se requería identificar el nivel de cada factor que causó mayor incidencia en la mortalidad. Los datos fueron tomados en un arreglo factorial 2×3^2 cuyos factores fueron sexo de la planta donadora, dosis de nitrógeno aplicada a los patrones y tiempo de remoción del plástico que cubre el injerto, en diseño en bloques al azar con cinco repeticiones y cuatro plantas como unidad experimental. Ambos modelos coinciden en establecer que el sexo de la planta donadora no tiene efecto sobre la mortalidad y la condición donde se presenta mayor mortalidad es a la dosis de urea de 9 g planta⁻¹/aplicación combinada con tiempo de remoción del plástico que cubre al injerto a los 60 días.

Palabras clave: Modelos de Supervivencia, Kaplan-Meier, Regresión de Cox, injertos, *Caryodendron orinocense* Karsten

ABSTRACT

There are two powerful and widely used methods in survival analysis: Kaplan-Meier and Cox proportional hazards models. Kaplan-Meier compares survival among groups or categories, but do not allow modeling the influence of predictors, this could be achieved using Cox's regression model in which it was also considered variable selection using the step by step procedure. These methodologies are applicable to cases in which the response variable is mortality time. It was considered the study of mortality of grafts in plants of inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten) in Venezuela. It was observed high mortality on the grafting thus it was required to identify the factor levels that increased the incidence of mortality of them. These data came from a factorial experimental design 2×3^2 , the factors were sex of the plant from which the scion was taken, nitrogen doses applied to the grafting patrons and time of removal of the foil that covered the point of joint rootstock-scion, in random blocks with five repetitions and four observations in each experimental unit. Both models agree to establish that sex of the donor plant has no effect on mortality and the condition at which higher mortality occurs is at the urea dose of 9 g plant⁻¹/application combined with removal of the plastic covering the graft at 60 days.

Key words: Survival analysis, Kaplan-Meier, Cox regression, grafting, *Caryodendron orinocense* Karsten

INTRODUCCION

De entre los muchos procedimientos de análisis de datos provenientes de ensayos biológicos que existen, en esta investigación se hace énfasis en la interpretación de modelos de supervivencia. El análisis de supervivencia consiste en un conjunto de técnicas para analizar el tiempo de seguimiento hasta la ocurrencia de un evento de interés. Este tiempo,

también denominado tiempo de vida, puede observarse completa o parcialmente. Un caso es aquel en que se observan los individuos desde un evento inicial hasta que termine el plazo para la observación del evento o hasta la ocurrencia del evento de interés. A la ocurrencia del evento de interés se le suele denominar falla o muerte y se denomina censura si al terminar el período de observación, aún no ha ocurrido el evento que se desea observar.

Debido a la presencia de censura y/o truncamiento, al análisis de supervivencia se le conoce también como análisis de datos censurados y/o truncados. Otro de los nombres que recibe este análisis es análisis de fiabilidad (reliability), derivados de estudios de distribuciones del tiempo de vida en procesos industriales o de ingeniería. El objetivo de estos análisis es determinar las variables que pueden predecir independientemente la supervivencia de un individuo y cuál es el mejor modelo para ello. Estos análisis tienen un amplio espectro sobre todo en la medicina humana y animal.

Como un caso práctico se consideró el estudio de la mortalidad en los injertos realizados en plantas de inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten). Las especies de *Caryodendron* presentan propiedades notorias como plantas oleaginosas. En los últimos veinte años, la demanda de materia prima en Venezuela ha creado una dependencia elevada en las importaciones de oleaginosas. Para estimar las necesidades de aceites y grasas comestibles en el país, se toma como base los requerimientos nutricionales que el Instituto Nacional de Nutrición (INN, 2012), estableció. Si se tiene en consideración los datos del reciente censo de población y vivienda (INAMET, 2012), donde se tiene una población de 27.000.000 habitantes, se requieren 405.000 t de aceites para cubrir la demanda nacional de aceites, para consumo humano. No obstante, las oleaginosas se utilizan además para la fabricación de jabones y cosméticos, por lo que se estima, de acuerdo con FEDEAGRO 2012, una demanda global de 720.400 t de aceites. Por otro lado, la producción venezolana de oleaginosas para el año 2010, suponiendo que toda la cosecha sea destinada a la producción de aceites está alrededor de 200.000 t, cantidad que cubre menos del 50% de lo requerido.

De allí la importancia que tiene el estudio y producción de oleaginosas nativas. De acuerdo al Programa de Recursos Vegetales del Convenio Andrés Bello (1995), el inchi fue considerado, a juicio de especialistas de varios países, como “la oleaginosa más promisorio de América”. Se consideraron especies promisorias aquellas que cumplen los siguientes requisitos:

- Fundamentalmente nativas de la subregión andina.
- Que no hayan sido domesticadas extensivamente por el hombre.

- Que sean especies subutilizadas o poco conocidas pero con potencialidades económicas a corto, mediano o largo plazo.
- Que cuente con información científica básica que valide su condición de especie promisorio.

Por ello, para países tropicales, el inchi puede ser una alternativa de excelentes perspectivas para el futuro, no sólo por su composición de aceites y ácidos grasos, lo cual lo hace apetecible como planta oleaginosa, sino como alimento que puede ser utilizado en la industria confitera.

La propagación en inchi en forma natural se realiza por semillas, pero debido que es una especie de polinización cruzada, la descendencia es muy variable, presentándose desuniformidades en la floración, en la cantidad y calidad del fruto. La necesidad de investigar sobre su propagación vegetativa fue para obtener uniformidad en las plantas, así como también con la finalidad de garantizar el sexo de las plantas, debido a que cuando se propaga sexualmente, aproximadamente a los cinco años ocurre la primera floración y es allí cuando se puede detectar el sexo de la planta por ser una especie dioica. Es necesario conocer el sexo de la planta con anticipación para un manejo eficiente, relacionado con el número de plantas de cada género y su colocación en el campo en las proporciones adecuadas para garantizar una buena producción.

Según Durán (1984), al propagar el inchi por injerto se obtienen individuos de buen rendimiento haciendo una selección de árboles madres. Además se puede obtener una producción más temprana que en los árboles propagados por semilla como se ha comprobado en otras especies tropicales.

En Venezuela se disponía de poca información con relación al *Caryodendron orinocense* Karsten y sus características de propagación, por ello García *et al.*, (2009) iniciaron investigaciones al respecto obteniendo a los 30 días de la injertación, que el sexo de la planta donadora y el tipo de injerto actúan independientemente sobre la probabilidad de prendimiento después de la injertación siendo esta mayor en los injertos de corona que en los injertos de enchapado lateral. Sin embargo, se notó una drástica disminución del porcentaje de prendimiento, a tal punto que a los 180 días solo quedaron vivos 15% de los injertos, por supuesto las plantas continuaban vivas pero no mantuvieron los injertos.

De aquí surge la necesidad de identificar cuáles de los factores evaluados causaron mayor incidencia en la mortalidad de los injertos utilizando los métodos de Kaplan-Meier y la regresión de Cox.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico utilizado

Se utilizaron plantas establecidas en Maracay, estado Aragua; que provenían de semillas extraídas el mismo día, de frutos recolectados en Calderas, estado Barinas el día anterior. Se colocaron en propagadores de aproximadamente 2mx1m en los cuales se había colocado previamente el sustrato. Las plántulas que se desarrollaron se trasplantaron del semillero a bolsas plásticas de 5 kg, para ser llevadas al vivero por seis meses. Las plantas más robustas y vigorosas se consideraron patrones para el presente ensayo. Las plantas madres se encontraban en el Campo Experimental de la UCV en Maracay, las cuales tienen aproximadamente diez años de edad.

Diseño del experimento

Los datos fueron tomados en un arreglo factorial 2×3^2 cuyos factores fueron sexo de la planta donadora, dosis de nitrógeno aplicada a los patrones (9, 12 y 18 g de urea (46% N) planta⁻¹/aplicación) y tiempo de remoción del plástico que cubre el injerto (60, 90 y 120 días desde la injertación), en diseño en bloques al azar con cinco repeticiones y cuatro plantas como unidad experimental. Hubo un total de 360 plantas recién injertadas al inicio del ensayo. Las dosis de nitrógeno y tiempos de remoción fueron escogidas basadas en experiencias previas publicadas por García *et al.*, (2009).

Se tomaron púas solo de dos árboles, uno de cada sexo, cuya floración y fructificación habían sido comprobadas e inmediatamente se procedió a la injertación. Se utilizó el método de injertación de corona y se incluyeron tres niveles de nitrógeno, con tres aplicaciones para nitrógeno y fósforo, la primera a las 6 semanas, la segunda a las 16 semanas y la tercera a las 26 semanas después del trasplante. La dosis de fósforo fue de 3 g de superosfato triple (45% P₂O₅) planta⁻¹/aplicación. El potasio se aplicó al inicio en una dosis única de 6,25 g de cloruro de potasio (60% K₂O) planta⁻¹.

Se utilizaron los programas estadísticos SAS, Statistix y Statdirect, ello se debió a que cada uno de

ellos aporta información que se complementa con la que aportan los otros. Se fijó un nivel de significación de 0,05 para las pruebas estadísticas.

Variable respuesta

Se evaluó el tiempo de mortalidad del injerto. El tiempo considerado para realizar observaciones sobre la presencia de fallas (injerto muerto) o no (injerto pegado), fue de 340 días.

Modelos de supervivencia

Se evaluaron dos modelos para tiempos de supervivencia en el estudio de la mortalidad del injerto en plantas de inchi. Ellos son; el modelo no paramétrico de Kaplan y Meier (1958) y el modelo de regresión de Cox (1972) y se aplicaron en la descripción del comportamiento del tiempo de supervivencia del injerto.

En el modelo de Kaplan-Meier se realizó un estudio univariado de los factores en estudio, esto es sexo de la planta donadora, fertilización con N y tiempo de remoción del plástico que cubre al injerto. Posteriormente se realizó un análisis estratificado considerando el tiempo de remoción del plástico que cubre al injerto, para cada nivel de N.

En el modelo de Cox se evaluaron los factores de acuerdo al diseño de experimentos descrito y se usaron variables ficticias (*dummies*) para su codificación. Se estudiaron cuales factores son de mayor incidencia sobre la mortalidad de los injertos, realizando análisis univariados y del modelo completo. Se asume la proporcionalidad de riesgos en los modelos. En el modelo completo se realizó análisis del índice pronóstico y selección de variables utilizando el procedimiento paso a paso (Stepwise). A continuación se resume cada uno de dichos modelos:

Método de Kaplan-Meier

El método de Kaplan-Meier permite realizar pruebas de significación estadística para comparar una variable categórica, como por ejemplo el sexo, y verificar si la supervivencia es distinta entre hombres y mujeres. La comparación de dos o más curvas de supervivencia entre categorías se realiza mediante la prueba Log-rank (Le, 1997) y se fundamenta en comparar los eventos observados versus los esperados.

La mediana del tiempo de supervivencia es calculada como el tiempo por debajo del cual la función de supervivencia es menor o igual a 0,5. Los intervalos de confianza para la mediana se construyen usando el método no paramétrico robusto de Brookmeyer y Crowley (1982). Otro intervalo de confianza para la mediana fue construido usando un estimador de la función de densidad de la supervivencia para muestras grandes descrita por Andersen (1993). Cuando existen muchos empates en los tiempos de supervivencia se prefiere el uso de la metodología de Andersen.

Método de Cox

En el análisis de supervivencia la variable de interés es el tiempo hasta que ocurre un suceso. Un posible método para este análisis consiste en suponer que esos tiempos siguen una determinada distribución o función matemática. Para ello se plantea un modelo de cómo evoluciona en función del tiempo la tasa de mortalidad la cual se también se denomina función de riesgo. Una vez determinada la tasa de mortalidad, se calcula, a partir de ella, la función de supervivencia (Taucher, 1999).

Para el modelado, existen funciones matemáticas que se aproximan a las curvas de supervivencia y se pueden utilizar para ver la influencia de variables regresoras. Sin embargo, esto es complejo de hacer y en la práctica no siempre los datos se aproximan a una curva conocida. El método más comúnmente utilizado para resolver este problema, es mediante la regresión de Cox, ya que tiene la gran ventaja de que no se basa en modelar una curva predeterminada. De hecho, este modelo no tiene curva de supervivencia predefinida (es no paramétrico), pero sí permite ver la influencia de variables regresoras en la respuesta (Taucher 1999). El modelo de regresión de Cox está definido por la siguiente función (Harrel, 2001):

$$h(t) = h_0(t) \cdot \exp(X_1 \cdot \beta_1 + X_2 \cdot \beta_2 + \dots + X_k \cdot \beta_k)$$

Donde:

$h(t)$: función de riesgo de que el evento ocurra al tiempo t .

$h_0(t)_0$: función de riesgo mínima a tiempo t_0 , riesgo base, la cual no se especifica en este modelo.

X_k : variable predictora k .

β_k : constante asociada a la variable k .

En este modelo, los riesgos para dos conjuntos diferentes de valores de los covariantes, conservan la misma proporción a lo largo del tiempo (modelos de riesgos proporcionales). Esta característica del modelo de proporcionalidad de riesgos puede no siempre ser válida y ocurre cuando la influencia de algún covariante depende precisamente del tiempo. (Ata y Tekin, 2007).

La interpretación del modelo de Cox no se hace directamente a través de su coeficiente estimado $\hat{\beta}_i$, sino del exponencial $\exp(\hat{\beta}_i)$ y es semejante a la que se realiza en regresión logística (García, 2007). Si $\hat{\beta}_i$ es el coeficiente estimado correspondiente a la variable X_i (variable continua), $\exp(\hat{\beta}_i)$ es el riesgo relativo cuando X_i aumenta una unidad, manteniendo constantes las demás variables. Para variables dicotómicas $\exp(\hat{\beta}_i)$ es un estimador de la razón de riesgos (hazard ratio = RR) y se interpreta como el incremento en el nivel de riesgo derivado de la presencia de cada covariable $X_i = 1$ en relación a ausencia $X_i = 0$. En cuanto a la utilización de variables cualitativas como regresoras, con más de dos categorías, valen las consideraciones señaladas para regresión logística utilizando variables ficticias o dummies. (Sahai y Kurshid, 1996).

Es necesario aclarar que cuando se realiza análisis de supervivencia, generalmente lo que se desea saber es cómo influyen una serie de características en la variable respuesta. En estos casos es de mayor interés determinar qué variables están influyendo más que saber a qué tiempo exacto ocurre cada evento.

Contrastes de hipótesis para el modelo de Cox

Una vez que se ha ajustado un modelo de Cox, existen contrastes de hipótesis para verificar la significación del modelo, estas pruebas son asintóticamente equivalentes. Ellas son:

Prueba de razón de verosimilitud

Es una prueba de significación global y presenta gran confiabilidad. Se define como $L = 2[\log(L(\beta_0)) - \log(L(\beta))]$; donde β_0 es calculado con

los valores iniciales de los coeficientes y $\hat{\beta}_i$ es la solución luego de ajustar el modelo. Puede observarse que L^2 , también llamado Deviance, (Hosmer y Lemeshow, 1989; Cox y Snell, 1989), está basado en la comparación de los coeficientes de verosimilitud obtenidos cuando se fija un modelo solo con la ordenada al origen y otro modelo con ordenada al origen y variable explicatoria. Este estadístico tiene una distribución Ji-Cuadrada asintótica con un grado de libertad bajo la hipótesis nula de que el coeficiente de regresión en el modelo es cero.

Prueba de Wald

Bajo la hipótesis nula de que $\beta_i = 0$, se aproxima a la distribución Ji-Cuadrada. Proporciona un contraste por variable en vez de una medida de significación global. El estadístico de contraste se define mediante $(\hat{\beta})' \sum_{\beta}^{-1} (\hat{\beta})$ donde $\sum_{\beta}^{-1}$ es la matriz de varianzas y covarianzas estimada (Dobson, 1983). Un valor $p < 0,05$ provee evidencias de que el coeficiente de regresión para la variable explicativa en estudio, es distinto de cero.

Índice pronóstico

El exponente del modelo de regresión de Cox se denomina índice pronóstico PI (prognostic index), de manera que la tasa de riesgo se puede expresar a través de este indicador (Domenech, 1992).

$$PI = \hat{\beta}_1 x_1 + \hat{\beta}_2 x_2 + \dots + \hat{\beta}_p x_p \rightarrow h(t;X) = h_0(t) * e^{PI}$$

En la práctica es mejor utilizar el índice pronóstico centrado que se obtiene centrando las variables regresoras, en el cual un valor igual a 0 es el correspondiente a un individuo promedio.

$$PI_c = \hat{\beta}_1 (x_1 - \bar{x}_1) + \hat{\beta}_2 (x_2 - \bar{x}_2) + \dots + \hat{\beta}_p (x_p - \bar{x}_p)$$

Cuadro 1. Resultados del análisis usando el modelo Kaplan-Meier para mortalidad del injerto considerando sexo de planta donadora en injertos de inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten).

Sexo de la planta donadora	Mediana tiempo de supervivencia (días)	CI (95%) Andersen para mediana	CI (95%) Brookmeyer-Crowly para mediana	Muertes observadas	Muertes esperadas	Riesgo relativo (RR)
G1 = FEME	23	20,61-25,39	20-24	152	147,64	1,029
G2 = MASC	23	20,03-25,97	21-26	152	156,35	0,972

CI = Intervalo de confianza, LI = Límite inferior y LS = Límite superior

CI (95%) de RR del G1 VS G2 = 0,85-1,06-1,33 (LI-RR-LS)

χ^2 para Riesgo Relativo Equivalente = 0,261 P = 0,6093 (Log-Rank)

La diferencia entre los índices pronósticos permite estimar su riesgo relativo y el centrado no afecta el valor de la diferencia.

$$RR = \frac{h(t;X_A)}{h(t;X_B)} = \frac{h_0(t)e^{PI_A}}{h_0(t)e^{PI_B}} = e^{(PI_A - PI_B)}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis univariado en el modelo de Kaplan-Meier

En el Cuadro 1 se aprecia que las medianas de supervivencia para los injertos fueron iguales para ambos sexos de la planta donadora y se lograron a los 23 días. La Figura 1 es la clásica curva de supervivencia (Kalfbfeish y Prentice, 1980), la cual muestra como la supervivencia disminuye con el tiempo. Para demostrar si dos o más curvas de supervivencia son diferentes se utilizó para realizar pruebas de hipótesis, la prueba Log-Rank; la cual no asume ninguna distribución particular de la función de supervivencia.

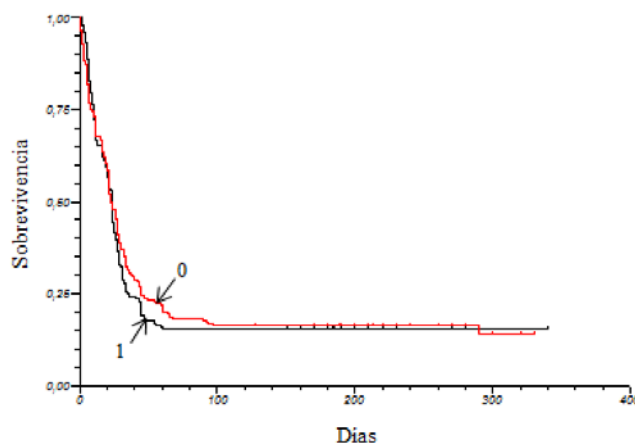


Figura 1. Curva de supervivencia para injertos provenientes de plantas donadoras de diferentes sexos en injertos de inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten).

En este caso, no existieron diferencias en cuanto a Sexo de la planta donadora, la prueba Log-rank establece que no existe significación estadística para esa variable a un nivel de significación de 0,05 ($p = 0,6093 > 0,05$). El intervalo de confianza de 95% para riesgo relativo (RR) confirma este resultado y además trae más información que el valor p por sí solo. Este intervalo calculado entre los grupos G1 vs G2, incluye el 1 (uno) lo que indica que no existen diferencias entre ambos sexos; esto es, que el sexo de la planta donadora no tiene efecto sobre la mortalidad.

Con respecto al efecto de la fertilización de los patrones sobre la supervivencia, las medianas de supervivencia indican que el 50% de los injertos sobrevivieron 23 días o menos a la dosis de 9 g de urea planta⁻¹/aplicación; 29 días o menos a la dosis de 12 g planta⁻¹/aplicación y 21 días o menos a la dosis de 18 g planta⁻¹/aplicación (Cuadro 2; Figura 2). Por otro lado, existió menor número de muertes observadas a la dosis de 12 g planta⁻¹/aplicación y los intervalos de confianza de RR permitieron comparar los grupos y verificar que a la dosis de 12 hubo menor riesgo de muerte y los otros dos grupos no difieren entre sí. Ello se corroboró usando la prueba Log-Rank ($p = 0,0005 < 0,05$).

En el Cuadro 3, las medianas de supervivencia indican que el 50% de los injertos duraron vivos 7 días o menos cuando se realizó el destape a los 60 días, 27 días o menos cuando se realizó a los 90 días y 33 días o menos cuando fue a los 120 días. Existió menor mortalidad cuando fue realizado a los 90 días de la injertación. Los intervalos de confianza permiten verificar que los injertos destapados a los 60 días comparado con los destapados a los 90 (G1-G2) tienen un valor de RR que está contenido en el intervalo de 3,1 a 6,4; por

ello existe mayor probabilidad de morir en los destapados a los 60 días y si los comparamos con los destapados a los 120 días (G1-G3), el verdadero valor de RR está contenido en el intervalo de 2,4 a 4,9. Los destapados a los 90 días difieren de los destapados a los 120 días, pero no en forma tan evidente. Las curvas de supervivencia (Figura 3) y la prueba log-rank también evidencian que existen diferencias al considerar número de días hasta el destape del injerto sobre la supervivencia de este.

Análisis estratificado usando el modelo de Kaplan-Meier

Como no hubo diferencias estadísticamente significativas en la tasa de mortalidad entre los injertos cuyas plantas donadoras poseían diferentes sexos, no se estratificó por este factor. La estratificación se realizó por dosis de N. El Cuadro 4, muestra que hubo diferencias estadísticamente

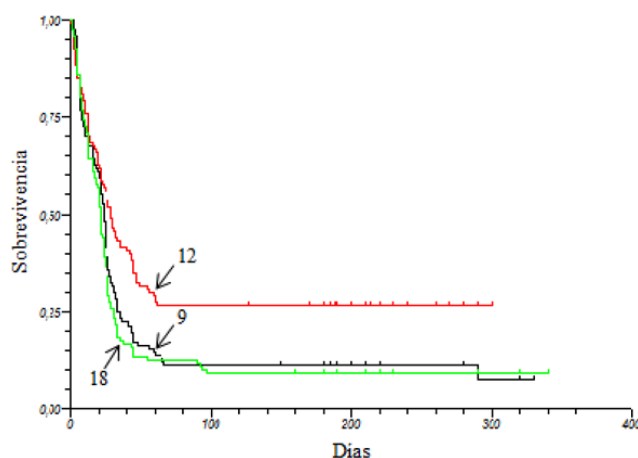


Figura 2. Curva de supervivencia para injertos en plantas fertilizadas a tres dosis de nitrógeno en injertos de inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten).

Cuadro 2. Resultados del análisis usando el modelo Kaplan-Meier para mortalidad del injerto considerando dosis de Nitrógeno en injertos de inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten).

Dosis de Nitrógeno	Mediana tiempo de supervivencia (días)	CI (95%) Andersen para mediana	CI (95%) Brookmeyer-Crowly para mediana	Muertes observadas	Muertes esperadas	Riesgo relativo (RR)
G1 = 9	23	20,61-25,38	21-25	107	96,26	1,11
G2 = 12	29	23,63-34,37	21-36	88	119,33	0,74
G3 = 18	21	19,47-22,53	18-22	109	88,39	1,23

CI = Intervalo de confianza, LI = Límite inferior y LS = Límite superior

CI (95%) de RR del G1 VS G2 = 1,15-1,51-1,97 (LI-RR-LS)

CI (95%) de RR del G1 VS G3 = 0,67-0,90-1,20 (LI-RR-LS)

CI (95%) de RR del G2 VS G3 = 0,45-0,59-0,79 (LI-RR-LS)

χ^2 para Riesgo Relativo Equivalente=15,09 P = 0,0005 (Log-Rank)

significativas entre los días transcurridos desde la injertación hasta el desprendimiento del plástico que cubre injerto, $p < 0,0001$ en la prueba log-Rank para todos los casos. En todos los estratos D60 tuvo mayor riesgo relativo de mortalidad (RR) que D90 y D120, siendo el mayor RR a la dosis de N de 9 g planta⁻¹/aplicación con D60, en el cual hubo 3,85 veces mayor riesgo de muerte que en las otras dos condiciones. El menor RR (0,49) se presentó a N = 12 con D90, siendo esta condición la más recomendable.

Análisis de supervivencia de Cox

Se utilizaron los criterios de la prueba de cocientes de verosimilitud (Deviance), prueba de Wald e intervalos de confianza de RR. El valor de exp (parámetro estimado) es un estimador puntual de la tasa a la cual la respuesta ocurre en el grupo donde $X = 1$ relativa a la tasa en la cual la respuesta ocurre en el mismo tiempo en el grupo denotado por $X = 0$ (grupo base). Se asume la proporcionalidad de riesgos en el modelo.

Los análisis univariados de los factores en estudio dieron como resultados los presentados en el Cuadro 5. En este caso, hubo igual riesgo de muerte del injerto para ambos sexos de la planta donadora ($p = 0,616 > 0,05$) tanto en la prueba de Wald como en la prueba de cocientes de verosimilitud.

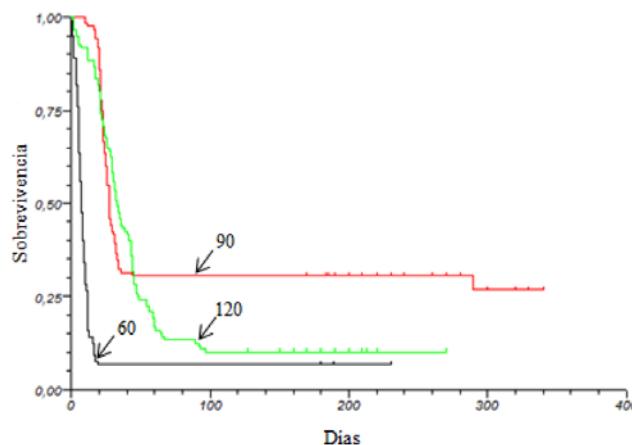


Figura 3. Curva de Supervivencia para injertos cuya remoción del plástico que lo cubre fue a 60, 90 y 120 días desde la injertación en injertos de inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten).

Cuadro 3. Resultados del análisis usando el modelo Kaplan-Meier para mortalidad del injerto considerando días desde la injertación hasta el desprendimiento del plástico que cubre el injerto de inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten).

Días hasta el destape	Mediana tiempo de supervivencia (días)	CI (95%) Andersen para mediana	CI (95%) Brookmeyer-Crowly para mediana	Muertes observadas	Muertes esperadas	Riesgo relativo (RR)
G1= 60	7	5,87-8,12	6-7	112	39,47	2,83
G2 = 90	27	25,31-28,68	26-30	84	132,47	0,63
G3 = 120	33	28,39-37,60	29-40	108	132,04	0,82

CI = Intervalo de confianza, LI = Límite inferior y LS = Límite superior

CI (95%) delRR G1 VS G2 = 3,14-4,47-6,38 (LI-RR-LS)

CI (95%) delRR G1 VS G3 = 2,43-3,46-4,94(LI-RR-LS)

CI (95%) delRR G2 VS G3 = 0,61-0,77-0,99(LI-RR-LS)

χ^2 para Riesgo Relativo Equivalente = 174,87 $P < 0,0001$ (Log-Rank)

Cuadro 4. Resultados obtenidos utilizando el modelo estratificado de Kaplan-Meier considerando riesgo de mortalidad como variable respuesta, fertilización (estrato) y días desde la injertación hasta el desprendimiento del plástico que cubre el injerto como factores en injertos de inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten).

	N=9g.p ⁻¹			N=12 g.p ⁻¹			N= 18g.p ⁻¹		
	D60	D90	D120	D60	D90	D120	D60	D90	D120
Muertes observadas	39	30	38	36	19	33	37	35	37
Muertes esperadas	10,14	46,83	50,02	13,20	38,44	36,36	16,04	47,06	45,90
Riesgo relativo (RR)	3,85	0,64	0,75	2,73	0,49	0,91	2,31	0,74	0,81
Log-Rank	χ^2 para RR = 108,62 P<0,0001			χ^2 para RR = 54,49 P<0,0001			χ^2 para RR = 36,07 P<0,0001		

g.p⁻¹ = g planta⁻¹/aplicación y D60, D90 y D120 = desprendimiento del plástico que cubre el injerto a los 60, 90 y 120 días de la injertación, respectivamente.

En cuanto a la fertilización del patrón, hubo diferencias significativas entre el nivel 12 con el de 9 (nivel base) ($p = 0,0038$) y el RR es 0,657; más no entre el nivel 18 con el de 9 ($p = 0,4358$) con RR cercano a uno (1,111). Ello indica que al nivel de fertilización de 12 hubo mayor supervivencia en los injertos que en el nivel 9. Sin embargo el de 18 comparado con el 9 tuvo igual riesgo de mortalidad. Bajo las consideraciones de este modelo, se recomienda fertilizar usando 12 g de urea planta⁻¹/aplicación; debido a que hubo menor riesgo de mortalidad en los injertos. En todos los casos la prueba Deviance y la inclusión o no del uno dentro de los intervalos de confianza de RR corroboraron los resultados de la prueba de Wald.

En el caso del tiempo del destape del injerto, los datos arrojan evidencias suficientes para afirmar que la mortalidad en el grupo cuyo destape se realizó a los 90 días difiere de aquella en que el destape se realizó a los 60 días (grupo base)

($p < 0,0001$). De igual manera el grupo cuyo destape se realizó a los 120 días difiere del que se realizó a los 60 días ($p < 0,0001$). En estos casos el riesgo de muerte del injerto es 0,185 para cuando el destape es hecho a los 90 días en comparación con aquellos en los que fue realizado a los 60 días y es de 0,238 cuando es realizado a los 120 días en lugar de a los 60 días. Es por ello recomendable realizarlo a los 90 días, en el cual el riesgo es menor.

Los resultados del modelo de Cox con todas las variables regresoras incluidas (Modelo completo) se aprecian en el Cuadro 6. De acuerdo a estos resultados, no existe evidencia ($p = 0,8741$) de que mortalidad depende del sexo de la planta usada como donadora del injerto (ajustada por dosis de Nitrógeno y días de destape del injerto).

Es significativa la diferencia entre las dosis 9 y 12 g planta⁻¹/aplicación ($p = 0,0002$) mas no entre 9 y 18 g planta⁻¹/aplicación, siendo menor el RR para 12

Cuadro 5. Resultados de la prueba de Wald, Deviance e Intervalos de Confianza (IC) del 95% para RR en los modelos de supervivencia simples de Cox en injertos de inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten).

Variable Regresora Grupo base: FEME	Parámetro estimado	Error estándar	Riesgo Relativo (RR)	IC (95%) para RR	χ^2	P(Wald)
Sexo de la planta donadora	0,057	0,115	1,059	0,845-1,327	0,251	0,616
Deviance (χ^2 con 1 grado de libertad) = 0,25 p = 0,616						
Variable Regresora Grupo base: N(9)	Parámetro estimado	Error estándar	Riesgo Relativo (RR)	IC (95%) para RR	χ^2	P(Wald)
N(12)	-0,419	0,144	0,657	0,495-0,873	8,38	0,0038
N(18)	-0,106	0,106	1,111	0,851-1,450	0,61	0,4358
Deviance (χ^2 con 2 grados de libertad) = 8,43 p = 0,0148						
Variable Regresora Grupo base: Destape (60)	Parámetro estimado	Error estándar	Riesgo Relativo (RR)	IC (95%) para RR	χ^2	P(Wald)
Destape (90)	-1,683	0,152	0,185	0,138-0,251	121,27	<0,0001
Destape(120)	-1,432	0,144	0,238	0,180-0,317	98,46	<0,0001

Deviance (χ^2 con 2 grados de libertad) = 119,12 p < 0,0001

Cuadro 6. Resultados de la prueba de Wald, Deviance e Intervalos de Confianza (IC) del 95% para RR en los modelos de supervivencia de Cox con todas las variables regresoras incluidas en injertos de inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten).

Variables regresoras	Parámetro estimado	Error estándar	Riesgo Relativo (RR)	IC (95%) para RR	χ^2	P (Wald)
Sexo de la planta donadora	-0,018	0,115	0,981	0,782-1,231	0,0251	0,8741
N(12)	-0,541	0,145	0,581	0,436-0,774	13,7890	0,0002
N(18)	-0,051	0,137	0,949	0,725-1,244	0,1388	0,7094
Destape (90)	-1,713	0,154	0,180	0,133-0,244	128,2822	<0,0001
Destape(120)	-1,476	0,476	0,228	0,171-0,305	100,3091	<0,0001

Deviance (χ^2 con 5 grados de libertad) = 144,72 p < 0,0001

g planta⁻¹/aplicación. En esta experiencia, la dosis intermedia fue la de mejor desempeño. Estos resultados están de acuerdo con lo establecido por Alarcón (2000), cuando establece que la sobredosificación de nutrientes puede conllevar a situaciones adversas al cultivo y la dosis baja no brinda una nutrición adecuada a la planta para el mantenimiento del injerto. Es de destacar que Bolívar (1997) recomienda 15 g (planta año⁻¹)⁻¹, como la dosis con mejor comportamiento en las variables de crecimiento de la planta evaluadas por ella en inchi. García *et al.* (2009), en ensayos similares, recomiendan las dosis de 12 o 18 g planta⁻¹/aplicación fraccionada en tres aplicaciones, ya que no presentaron diferencias estadísticamente significativas en variables de rendimiento relacionadas al cultivo.

En cuanto a la remoción del plástico del injerto (destape), existe mayor riesgo de mortalidad del injerto a los 60 días (Grupo base). Las experiencias de Gervais (1981) en cacao, establecen que la muerte de los injertos ocurre en su gran mayoría durante los dos meses siguientes a la injertación aunque no lo relaciona con el destape de la unión planta-injerto. Se recomienda realizar mayor número de ensayos para establecer el tiempo apropiado para desatar el injerto, ya que si es muy temprano el tejido de unión es muy tierno y escaso y se seca cuando parecía que ya estaba

brotando. Mantener la atadura mucho tiempo tampoco es recomendable, ya que se estrangularía el injerto al dificultar el paso de la savia, aunque ello también depende de la flexibilidad del material que se use para realizar la atadura.

Utilizando el modelo completo, se puede hacer análisis del índice pronóstico (Cuadro 7) y comparar por ejemplo, los dos casos más extremos. Esto es, los casos en los cuales A) el sexo de la planta donadora es femenino (codificada como $x_1 = 0$), la dosis de N es 9 (codificada como $x_2 = 0$, $x_3 = 0$), y el destape del injerto a los 60 días (codificada como $x_4 = 0$, $x_5 = 0$), con el caso B) en el que el sexo de la planta donadora es masculino ($x_1 = 1$), la dosis de N es 12 ($x_2 = 1$, $x_3 = 0$), y el destape del injerto a los 90 días ($x_4 = 1$, $x_5 = 0$).

La ecuación correspondiente a PI_C viene dada por:

$$PI_C = -0,018 (x_1 - 0,5) - 0,541 (x_2 - 0,333) - 0,051 (x_3 - 0,333) - 1,713 (x_4 - 0,333) - 1,476 (x_5 - 0,333)$$

Para Caso A; $PI(A)_C = 1,2693$

Para Caso B; $PI(B)_C = -1,0084$

Cuadro 7. Índices pronósticos centrados para la distintas combinaciones de los factores en estudio en injertos de inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten).

Sexo de la planta donadora	N (g planta ⁻¹ por aplicación)	Destape del injerto (días)	Codificación (variables ficticias)					Índice pronóstico (PI_C)
			$X_1 = \text{Sexo}$	$X_2 = N(0)$	$X_3 = N(1)$	$X_4 = \text{dest}(0)$	$X_5 = \text{dest}(1)$	
F	9	60	0	0	0	0	0	1,2693
F	9	90	0	0	0	1	0	-0,4494
F	9	120	0	0	0	0	1	-0,2116
M	9	60	1	0	0	0	0	1,2513
M	9	90	1	0	0	1	0	-0,4674
M	9	120	1	0	0	0	1	-0,2296
F	12	60	0	1	0	0	0	0,7283
F	12	90	0	1	0	1	0	-0,9904
F	12	120	0	1	0	0	1	-0,7526
M	12	60	1	1	0	0	0	0,7103
M	12	90	1	1	0	1	0	-1,0084
M	12	120	1	1	0	0	1	-0,7706
F	18	60	0	0	1	0	0	1,2183
F	18	90	0	0	1	1	0	-0,5004
F	18	120	0	0	1	0	1	-0,2626
M	18	60	1	0	1	0	0	1,2003
M	18	90	1	0	1	1	0	-0,5184
M	18	120	1	0	1	0	1	-0,2806

La diferencia entre los índices pronósticos;

$$PI(A)_C - PI(B)_C = 1,2693 - (-1,0084) = 2,278 \rightarrow \\ RR = e^{2,278} = 9,757 \approx 10.$$

Esto indica que el riesgo de que el injerto no pegue y muera, en plantas con $PI_C = 1,2693$ es 10 veces superior que en aquellas cuyo PI_C es $-1,0084$.

Selección de variables usando el modelo de Cox

Los resultados de la selección de variables (Cuadro 8), utilizando el método paso a paso no dio información diferente a la obtenida en el análisis del modelo completo, esto es, la no significación estadística del sexo de la planta donadora y la necesidad de incluir en el modelo solo dos dosis de N (9: Grupo base y 12) y tiempo del destape de la unión planta- injerto (los tres niveles evaluados, 60: Grupo base, 90 y 120).

CONCLUSIONES

El Modelo de Kaplan-Meier y el Modelo de Cox fueron ambos factibles de ser aplicados e interpretar sus resultados en condiciones similares, debido a que las variables explicativas en el modelo de Cox, consideraron solo valores discretos ya que provienen de un diseño de experimentos. En caso de la consideración de variables explicativas continuas, el modelo de Kaplan Meier hace necesario crear categorías que contemplen rangos de valores con la finalidad de comparar entre categorías; en dichos casos se hace más apropiado el uso del método de Cox, con el cual se determina la influencia de un predictor sobre la variable respuesta, pudiendo tomar cualquier valor real dentro del rango de los datos evaluados. Sin embargo, el uso de cada técnica depende de los objetivos que persiga el investigador.

En el Modelo de Kaplan-Meier, las curvas de supervivencia y los intervalos de confianza del riesgo relativo confirman los resultados de la prueba Log-Rank.

En el Modelo de Cox, en todos los casos la prueba Deviance y la inclusión o no del uno dentro de los intervalos de confianza de RR corroboraron los resultados de la prueba de Wald. En este caso, el análisis de regresión múltiple y en la selección de variables utilizando el método paso a paso no se obtuvo información diferente a la obtenida en los análisis univariados.

Ambos modelos coinciden en establecer que el sexo de la planta donadora no tiene efecto sobre la mortalidad y la condición donde se presenta menor mortalidad es aplicando 12 g de urea planta⁻¹/aplicación combinada con remoción del plástico que cubre al injerto a los 90 días y mayor mortalidad aplicando 9 g de urea planta⁻¹/aplicación con remoción del plástico a los 60 días.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela por el financiamiento del presente proyecto.

LITERATURA CITADA

- Alarcón, A. 2000. Técnica para cultivos de alto rendimiento. Novedades Agrícolas S. 465 p.
- Ata, N. and M. Tekin. 2007. Cox regression models with nonproportional hazards applied to lung cancer survival data. Hacettepe Journal of Mathematics and Statistics 36 (2): 157-167.

Cuadro 8. Significación de los coeficientes e Intervalos de Confianza (IC) del 95% para el Riesgo Relativo (RR) en el modelo de supervivencia de Cox con solo las variables regresoras escogidas utilizando el método Paso a Paso en injertos de inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten).

Variables regresoras	Parámetro estimado	Error estándar	Riesgo Relativo (RR)	IC (95%) para RR	χ^2	P(Wald)
N(12)	-0,515	0,127	0,597	0,135-0,245	16,32	<0,0001
Destape(90)	-1,705	0,144	0,182	0,135-0,245	123,56	<0,0001
Destape (120)	-1,466	0,153	0,231	0,174-0,307	102,33	<0,0001

Deviance (χ^2 con 3 grados de libertad = 144,56 $p < 0,0001$)

- Andersen, P. K. 1993. Statistical models based on counting processes. Springer-Verlag. New York, United States of America.
- Bolívar, I. 1997. Efecto de la intensidad de luz y fertilización nitrogenada sobre el crecimiento del inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten) en condiciones de vivero. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 85 p.
- Brookmeyer, R. and J. Crowley. 1982. A confidence interval for the median survival time. *Biometrics* 38: 29-41.
- Correa, J. y H. Bernal. 1995. Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Tomo XI. Editorial Guadalupe Ltda. Santa Fe de Bogotá. Colombia.
- Cox, D. R. 1972. Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 34 (2): 187-220.
- Cox, D. and E. Snell. 1989. The Analysis of binary data. 2^{ed}. Chapman and Hall. London, United Kingdom. 231 p.
- Dobson, A. 1983. An introduction to statistical modelling. Chapman and Hall. London, United Kingdom. 125 p.
- Domenech, J. 1992. Una aplicación del análisis de la supervivencia en ciencias de la salud. *Anuario de Psicología* 5: 109-141.
- Durán, M. E. 1984. Sobre el comportamiento del inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten) resultados preliminares sobre la respuesta de la especie a la propagación vegetativa por injerto. *Colombia Amazónica* 1 (2): 11-20.
- García J. 2007. Confrontación de modelos de regresión lineal y logística en el estudio de variables de rendimiento de *Musa* AAAB FHIA-21. *Revista de la Facultad de Agronomía* 33 (1): 25-54.
- García J.; D. Perdomo y H. Moratinos. 2009. Evaluación de dos métodos de propagación asexual en inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten). *Revista Científica UDO Agrícola* 9 (4): 782-792.
- Gervais, M. 1981. Greffage du cacaoyer en fente terminale. *Café, Cacao, Thé* 25 (1): 55-59.
- Harrel, F. E. 2001. Cox proportional hazard regression model. *In: Model in regression modeling strategies*. Springer, New York, United States of America. p. 465-507.
- Hosmer, D. and S. Lemeshow. 1989. Applied logistic regression. John Wiley, New York, United States of America. 307 p.
- Kalbfleisch, J. D. and R. L. Prentice. 1980. The statistical analysis of failure data. John Wiley and Sons. New York, United States of America.
- Kaplan, E. L. and P. Meier. 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 53: 457-481.
- Le, C. T. 1997. Applied survival analysis. John Wiley and Sons. New York, United States of America.
- Sahai, H. and A. Kurshid. 1996. Statistics in epidemiology: methods techniques and applications. CRC Press. 352 p.
- Taucher, E. 1999. Análisis de supervivencia. *In: Bioestadística*. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. p. 257-266.