

**RAE-CEA-16P09**

**RELATÓRIO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA SOBRE O PROJETO:**

**“O papel da citoadesão e dos receptores do tipo *Toll* na  
imunopatogênese da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo  
Murino Associado à malária grave”**

**Beatriz Albiero  
Florencia Graciela Leonardi  
Luís Gustavo Esteves  
Matheus Felipe Sebestyen Paiola**

**São Paulo  
2016**

**CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP**  
**RELATÓRIO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA**

**TÍTULO:** Relatório de Análise Estatística sobre o Projeto: “O papel da citoadesão e dos receptores do tipo *Toll* na imunopatogênese da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo Murino Associado à malária grave”

**PESQUISADOR:** Luana dos Santos Ortolan / Sabrina Epiphanio

**INSTITUIÇÃO:** Instituto de Ciências Biomédicas - USP

**FINALIDADE DO PROJETO:** Publicação, Doutorado

**RESPONSÁVEIS PELA ANÁLISE:** Beatriz Albiero  
Florencia Graciela Leonardi  
Luís Gustavo Esteves  
Matheus Felipe Sebestyen Paiola

**REFERÊNCIA DESTE TRABALHO:**

ALBIERO, B., LEONARDI, F. G., ESTEVES, L. G. e PAIOLA, M. F. S. (2016). **Relatório de Análise Estatística sobre o Projeto: “O papel da citoadesão e dos receptores do tipo *Toll* na imunopatogênese da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo Murino Associado à malária grave”.** São Paulo, IME-USP, RAE-CEA-16P09.

## FICHA TÉCNICA

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUSSAB, W. O. e MORETTIN, P. A. (2013). **Estatística Básica**. 8a.ed. São Paulo: Saraiva, 540p.
- NETER, J. e WASSERMAN, W. e KUTNER, M. H. (1990). **Applied Linear Statistical Models**, 5<sup>a</sup> ed. Illinois: Irwin, 1.181p.
- CONOVER, W.J. (1980). **Practical Nonparametric Statistics**, 2nd. Ed., John Wiley.
- GIBBONS, J.D. and Chakraborti, S. (2011). **Nonparametrical Statistical Inference**, Springer.
- LEHMANN, E.L. and D'Abraera, H.J.M. (1975). **Nonparametrics: Statistical Methods Based on Ranks**. Holden Day.

### PROGRAMAS COMPUTACIONAIS UTILIZADOS

Microsoft Excel for Windows ®, versão 2013.

Microsoft Word for Windows ®, versão 2013.

R for Windows ®, versão 3.1.3

Minitab, versão 16.1.0

### TÉCNICAS ESTATÍSTICAS UTILIZADAS: (classificação ISI entre parênteses)

Análise Descritiva Unidimensional (03:010)

Análise Descritiva Multidimensional (03:020)

Testes de Hipóteses Não Paramétricas (05:070)

## Sumário

Resumo.....	5
1. Introdução .....	6
2. Motivação e objetivos.....	7
3. Descrição do estudo.....	8
3.1 Animais e parasitas utilizados .....	8
3.2 Estímulos .....	9
4. Descrição dos experimentos.....	10
4.1 Ensaio de adesão de células endoteliais.....	10
4.2 Quantificação da expressão gênica de moléculas de adesão via PCR.....	11
4.3 Quantificação de citocinas inflamatórias via CBA .....	12
4.4 Quantificação da expressão gênica de receptores do tipo <i>Toll</i> .....	13
4.5 Imunoistoquímica de receptores do tipo <i>Toll</i> .....	13
4.6 Dosagem de VEGF .....	14
5. Descrição das variáveis.....	15
5.1 Variáveis explicativas dos experimentos .....	15
5.2 Variáveis resposta – por experimento.....	15
6. Análise descritiva.....	16
7. Análise inferencial.....	18
7.1 Ensaio de adesão .....	19
7.2 Quantificação de moléculas de adesão por PCR em tempo real .....	20
7.3 Quantificação de citocinas inflamatórias via CBA .....	21
7.4 Quantificação do fator VEGF.....	24
7.5 Quantificação da expressão gênica de receptores do tipo <i>Toll</i> .....	25
7.6 Imunoistoquímica de receptores do tipo <i>Toll</i> .....	27
8. Conclusão .....	29
APÊNDICE A - TABELAS .....	30
APÊNDICE B - GRÁFICOS .....	30

## Resumo

Dentre os diversos sintomas que a doença da malária pode causar, são objetos deste estudo duas complicações respiratórias graves, denominadas lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). O desenvolvimento de tais quadros ainda é pouco conhecido devido a um grande número de fatores envolvidos. Assim, foi realizado um estudo sob o modelo murino de infecção, no qual células endoteliais pulmonares foram analisadas sob diversos estímulos e tempos diferentes a fim de se compreender melhor a contribuição da citoadesão e dos receptores do tipo *Toll* na imunopatogênese dessas síndromes. O estudo foi composto por experimentos nos quais buscou-se obter informações a respeito de eventuais diferenças existentes entre células submetidas a certos estímulos e células não estimuladas (controle) no tocante a certas características de interesse. Para tanto, observa-se a importância de, para cada experimento, a determinação dos períodos nos quais as diferenças entre células estimuladas e controle são mais evidentes. Testes não-paramétricos foram utilizados para a detecção de tais períodos. Tal análise possibilitará um melhor direcionamento dos próximos estágios da pesquisa.

## 1. Introdução

A malária é um problema de saúde muito grave em muitos países das regiões tropicais e subtropicais. A doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos através do contato com mosquitos parasitados.

Pessoas infectadas podem desenvolver quadros respiratórios graves, com complicações pulmonares denominadas lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA).

As bases moleculares destas disfunções pulmonares permanecem ainda mal compreendidas devido a grandes dificuldades encontradas no estudo da doença em decorrência de um grande número de fatores potencialmente envolvidos. Tais dificuldades no estudo da doença inviabilizam, no momento, o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, ocasionando uma alta taxa de mortalidade decorrente da síndrome.

Sabe-se que mecanismos ligados à imunidade inata são importantes para o controle precoce da infecção. No entanto, respostas inflamatórias excessivas contribuem na patogênese e sintomas associados à malária grave.

Outros fatores se mostram relevantes no desenvolvimento da síndrome: a habilidade de eritrócitos parasitados serem sequestrados na microvasculatura dos tecidos, a ativação de células endoteliais pulmonares e o aumento da permeabilidade vascular pulmonar.

Em busca de compreender melhor o papel de alguns componentes da imunidade inata na patogenia da LPA/SDRA associada à malária grave, bem como o efeito da adesão dos eritrócitos infectados às células endoteliais, foi realizado um estudo sob o modelo murino de infecção.

O conhecimento adquirido sob este modelo trará importante contribuição para o entendimento dos sintomas e possibilitará estudos direcionados ao desenvolvimento de novas metodologias para o tratamento da doença.

## 2. Motivação e objetivos

Como motivação, foi realizado um experimento para a verificação da distribuição do parasita em organismos de camundongos parasitados.

Primeiramente, os camundongos foram infectados com *Plasmodium berghei* ANKA expressando luciferase (um tipo de enzima que catalisa reações biológicas transformando energia química em energia luminosa).

No sétimo dia pós-infecção, os camundongos receberam luciferina, que ao reagir com a luciferase presente nos parasitas, permite a emissão de luminescência do parasita.

Um equipamento adequado capta a fluorescência e bioluminescência *in vivo*. Os gráficos abaixo mostram a expressão de luciferase em animais perfundidos, ou seja, que tiveram o sangue drenado de seus órgãos antes da medição, e também de um animal não perfundido. Nota-se que mesmo após a perfusão, a concentração de parasitas ainda é grande nos pulmões e no baço, o que mostra que eles estão aderidos às células destes órgãos.

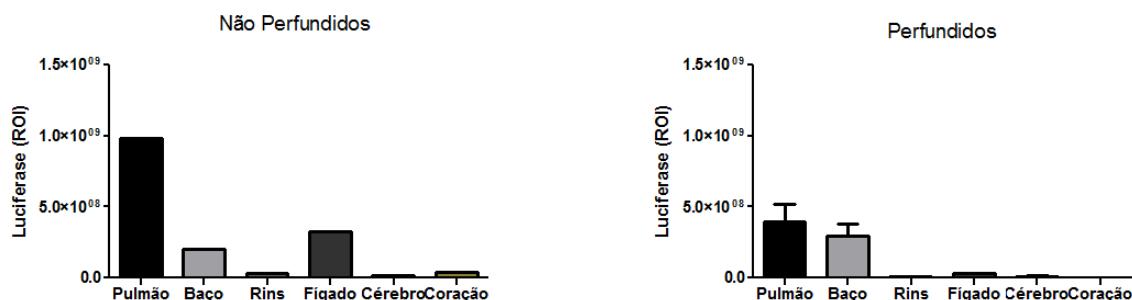


Gráfico 1 – Expressão de luciferase (em ROI) por órgão em ratos não perfundidos e perfundido

O estudo, de maneira geral, possui três objetivos principais:

- Avaliar os efeitos da citoadesão de eritrócitos parasitados na ativação de células endoteliais pulmonares (CEP) por meio de ensaios de adesão estáticos e em fluxo.

- Avaliar o papel dos receptores do tipo *Toll* (TLR) 2, 4 e 9, e também da molécula adaptadora MyD88 na indução de mediadores inflamatórios por CEP na presença de eritrócitos parasitados.
- Avaliar o efeito de drogas sintéticas antagonistas de TLR no tratamento de LPA/SDRA.

A avaliação descrita no terceiro objetivo, que será realizada em um momento posterior, não constituirá objeto desta análise estatística.

### **3. Descrição do estudo**

Neste estudo foram realizados seis tipos de experimentos distintos listados abaixo e descritos na seção seguinte:

- Ensaio de adesão de células endoteliais
- Expressão gênica por Polymerization Chain Reaction (PCR) em tempo real
  - Para moléculas de adesão
  - Para receptores do tipo *Toll*
- Quantificação de citocinas e quimiocinas via Cytometric Bead Array (CBA)
- Imunoistoquímica de receptores do tipo *Toll*
- Dosagem de Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

#### **3.1 Animais e parasitas utilizados**

Foram utilizados camundongos, machos, adultos (6 a 8 semanas de idades), das linhagens DBA/2, C57Bl/6 e animais da linhagem C57Bl/6 deficientes em TLR 2, 4, 9 e MyD88.

Os animais foram criados e mantidos em mini isoladores sob condições controladas de umidade, iluminação e temperatura.

A infecção dos animais, assim como o isolamento e sincronização de eritrócitos parasitados, foi realizada com o plasmódio murino *Plasmodium berghei* ANKA ou nk65.

Cada cultura de células é feita a partir dos pulmões de três animais, que por sua vez, são sacrificados.

### 3.2 Estímulos

É sabido que alguns fatores específicos podem estar relacionados de alguma forma com o desenvolvimento da SDRA associada à malária. Dessa forma, diferentes estímulos foram utilizados nos experimentos a fim de melhor entender como se dá tais relações.

Segue abaixo a lista dos principais estímulos utilizados:

- Fator de necrose tumoral - Alfa (TNF-  $\alpha$ )

*Citocina*

- Interferon-gama (IFN- $\gamma$ )

*Citocina*

- Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

*Proteína*

- Lipopolissacarídeo (LPS)

*Molécula constituída de um lipídeo e um polissacarídeo*

- Eritrócito parasitado (EP)

- Extrato do parasita (EXT)

- Eritrócito não parasitado (EnP)

## 4. Descrição dos experimentos

### 4.1 Ensaios de adesão de células endoteliais

O objetivo deste ensaio é verificar a capacidade de citoadesão do parasita em células endoteliais pulmonares na presença de diferentes estímulos.

Este experimento é importante, pois existe um grande questionamento sobre o desenvolvimento da SDRA. Não se sabe ao certo se primeiramente parasitas são aderidos ao endotélio e então as células tornam-se ativas liberando fatores inflamatórios, ou se a princípio as células devem estar ativas para que ocorra o fenômeno da adesão.

Para tanto, foram realizados dois experimentos, representados pelos códigos **LO8** e **LO11-14-25**. Os dois possuem o mesmo objetivo, porém diferem nos estímulos utilizados e tempos de observação.

Em cada lâmina (unidade amostral), é observada uma cultura contendo material misturado de três camundongos.

Observa-se, via microscópio, a proporção de células endoteliais apresentando parasitas aderidos em amostras de 100 células.

#### **Estímulos utilizados:**

**LO8:** IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, LPS, NE.

**LO11-14-25:** IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, LPS, EP, EXT, EnP.

**Controle:** foram utilizadas células não estimuladas (NE).

#### **Tempos de observação:**

**LO8:** 24h, 48h, 72h

**LO11-14-25:** 1h, 3h, 6h, 12h

**Amostragem:****LO8:**

- **Controle:**  
4 lâminas para cada tempo para células NE
- **Com Estímulos:**  
3 lâminas por estímulo para cada tempo

**LO11-14-25:**

- **Controle:**  
12 lâminas para cada tempo para células NE  
Acréscimo de 4 lâminas observadas para o tempo T=6h.
- **Com Estímulos:**  
6 lâminas por estímulo para cada tempo  
Acréscimo de 4 lâminas observadas para o tempo T=6h.

**4.2 Quantificação da expressão gênica de moléculas de adesão via PCR**

Após a verificação da ocorrência da adesão, ocorre outra dúvida: quais moléculas de adesão, dentre as que são previamente conhecidas como importantes no desenvolvimento da doença, poderiam apresentar maior expressão nas células endoteliais pulmonares, promovendo assim a adesão dos eritrócitos parasitados?

Foram realizados dois tipos de ensaios para a verificação da expressão gênica de moléculas de adesão. O primeiro, descrito nesta seção, conta com uma técnica denominada de PCR em tempo real, onde o interesse é observar uma quantificação (relativa ao controle - NE) de genes a partir de cultura de células endoteliais pulmonares a fim de mensurar a expressão de certas moléculas.

As moléculas analisadas por meio da técnica de PCR em tempo real foram:

- Molécula de adesão intercelular 1, ICAM-1
- Molécula de adesão vascular celular 1, VCAM
- Cluster de diferenciação, CD36

**Estímulos utilizados:** IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, LPS, EP, EXT, EnP.

**Controle:** NE.

**Tempos de observação:**

1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h

**Amostragem:**

- **Controle:**
  - 6 observações para cada tempo para cada molécula entre 1h e 12h
  - 9 observações para cada tempo para cada molécula entre 24h e 72h
- **Com Estímulos:**
  - 6 observações por estímulo para cada tempo para cada molécula

#### **4.3 Quantificação de citocinas inflamatórias via CBA**

O objetivo deste experimento é verificar se as células endoteliais produzem citocinas inflamatórias e os fatores que possivelmente ativariam essas células.

A principal pergunta a ser abordada por este experimento é se os eritrócitos parasitados seriam capazes de estimular as células endoteliais para que elas liberassem fatores inflamatórios.

Cada observação refere-se à análise de células soltas, marcadas e lidas pelo citômetro.

**Citocinas observadas:** GM-CSF, IL1-B, IL-6, KC, MCP, RANTES

**Estímulos utilizados:** IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, LPS, EP, EXT, EnP.

**Controle:** NE.

**Tempos de observação:** 1h, 3h, 6h, 12h, 24h.

**Amostragem:**

- **Controle:**
  - 3 observações para cada tempo para cada tipo de citocina.
- **Estímulos:**
  - 3 observações por estímulo para cada tempo para cada tipo de citocina.

#### **4.4 Quantificação da expressão gênica de receptores do tipo *Toll***

Sabe-se que os receptores **TLR2**, **TLR4** e **TLR9** são capazes de reconhecer o parasita da malária. TLR2 e TLR4 são receptores de membrana plasmática de células do sistema imune que reconhecem peptídeos do parasita. Já o TLR9 é um receptor que fica em uma membrana interna das células e reconhece o DNA do parasita. É sabido também que o Myd88 é uma molécula co-adaptadora envolvida na sinalização dos TLRs 2, 4 e 9.

Desta forma, um experimento foi desenvolvido com o intuito de observar se os animais que desenvolvem a SDRA possuem uma maior expressão gênica dos TLRs e de Myd88 no pulmão. Para este fim, a técnica de PCR em tempo real foi novamente utilizada.

**Estímulos utilizados:** IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, LPS, EP, EXT, EnP.

**Controle:** NE.

**Tempos de observação:** 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h.

**Amostragem:**

- **Controle:**

3 observações para cada tempo para cada receptor entre 1h e 12h.

6 observações para cada tempo para cada receptor entre 24h e 72h.

- **Com Estímulos:**

3 observações por estímulo para cada tempo para cada receptor.

#### **4.5 Imunoistoquímica de receptores do tipo *Toll***

Dando continuidade à análise sobre os receptores do tipo *Toll* por PCR em tempo real, foi observado que células pulmonares de animais infectados apresentam marcação para esses receptores.

Este experimento visa comparar camundongos não infectados (NI), camundongos infectados que morreram em decorrência de lesão pulmonar aguda (LPA) causada pela SDRA e camundongos infectados mortos por hiperparasitemia (HP) quanto às expressões dos receptores dos tipos TLR2, TLR4 e TLR9.

Para isso, realizou-se a análise de Imunoistoquímica, um procedimento que registra áreas do tecido pulmonar em que foi detectada a presença dos receptores e mede a proporção de tais áreas em relação à área total analisada.

**Amostragem:**

• **Não Infectados:**

- 12 camundongos para TLR4
- 24 camundongos para TLR9
- 24 camundongos para TLR2

• **Infectados:**

- 60 camundongos com SDRA e 60 camundongos com HP para TLR4
- 72 camundongos com SDRA e 72 camundongos com HP para TLR9
- 60 camundongos com SDRA e 72 camundongos com HP para TLR2

#### **4.6 Dosagem de VEGF**

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é uma proteína muito importante associada ao desenvolvimento da SDRA. Sabe-se que ele é produzido em maior quantidade em animais que desenvolvem a síndrome e que é produzido principalmente no baço. Possivelmente, isso ajuda a explicar o fato de, em experimentos previamente realizados, animais cujos baços foram removidos terem apresentado tempo de sobrevida maior.

Foi então realizado um estudo com a finalidade de verificar se células endoteliais presentes na microvasculatura do pulmão também seriam produtoras de VEGF, podendo contribuir para o desenvolvimento da síndrome.

**Estímulos utilizados:** IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, LPS, EP, EXT, EnP.

**Controle:** NE.

**Tempos de observação:** 24h, 48h, 72h

### **Amostragem:**

- **Controle:**  
4 observações para cada tempo.
- **Com Estímulos:**  
4 observações para cada tempo sob cada estímulo.

## **5. Descrição das variáveis**

### **5.1 Variáveis explicativas dos experimentos**

- **Estímulo aplicado:** Não Estimulado - Controle (NE), Lipopolissacarídeo (LPS), Intérferon-gama (IFN- $\gamma$ ), Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), Extrato do parasita (EXT), Eritrócito Parasitado (EP), Eritrócito não Parasitado (EnP).
- **Tempo entre aplicação (ou não) do estímulo e observação –** 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h.

### **5.2 Variáveis resposta – por experimento**

- **Ensaios de adesão** – Proporção de células aderidas (%)
- **PCR** – Expressão relativa de RNA mensageiro (RNAm)
- **CBA** – Concentração da molécula analisada (em pg/mL)
- **Imunoistoquímica** – Proporção da imagem capturada em que foi detectada a expressão do receptor observada. (%)
- **VEGF** – Concentração da proteína VEGF (em pg/mL)

## 6. Análise descritiva

As tabelas e gráficos apresentados nos Apêndices A e B descrevem alguns resultados relevantes observados nos experimentos.

Para o experimento LO8 de **Adesão**, nota-se um crescimento (*Gráfico B1, Tabela A1*) na proporção de células com parasitas aderidos conforme os tempos aumentam para todos os estímulos (exceto IFN- $\gamma$  entre 24h e 48h), com valores médios mais expressivos para os estímulos **LPS e TNF-  $\alpha$** . Porém, para o estímulo LPS, vemos (*Gráfico B2*) que existe maior variabilidade no instante 72h.

Já para o experimento LO11-14-25 (*Gráfico B3, Tabela A2*), a tendência de crescimento proporcional ao tempo não aparece, provavelmente devido ao fato dos tempos serem menores que no experimento anterior. Ainda assim, podemos notar que os mesmos estímulos **LPS e TNF- $\alpha$**  apresentam valores superiores aos demais, novamente com o LPS apresentando maior variabilidade, conforme visto no *Gráfico B4*.

Nos experimentos de **PCR em tempo real**, vemos que, para as moléculas CD36 (*Gráfico B5, Tabela A5*) quase todos os estímulos apresentam comportamento parecido ao longo do tempo, com a expressão relativa apresentando um decrescimento no tempo 12 horas e pico em 24 horas. As exceções são os estímulos **TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$**  com expressões relativas baixas após as 12 horas. Por outro lado, para as moléculas de ICAM-1 (*Gráfico B7, Tabela A3*), **TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$**  são justamente os estímulos que se destacam, apresentando expressões relativas acima das demais em todos os tempos após 12h, apesar do decaimento às 72 horas. Este resultado é compatível com parte das expectativas das pesquisadoras, uma vez que já é conhecido que o TNF- $\alpha$  aumenta a expressão das moléculas de ICAM-1. Para VCAM (*Gráfico B9, Tabela A4*), temos novamente uma alta expressão nas amostras estimuladas com **TNF- $\alpha$  e LPS** (conforme observado também nos ensaios de adesão).

Para os receptores TLR2 (*Gráfico B11, Tabela A13*), nota-se também valores mais expressivos para os estímulos **LPS e TNF- $\alpha$** , conforme notado em grande parte dos experimentos anteriores. Já para receptores TLR4 (*Gráfico B13, Tabela A14*) não se nota nenhum perfil de médias expressivamente diferente, com quase

todos os valores abaixo dos correspondentes para o grupo controle (NE). Apesar do pico no tempo de 24 horas para **VEGF**, vale notar que a variabilidade é alta e a média é influenciada por uma observação muito acima das demais (*Gráfico B14*). Para os receptores TLR9 (*Gráfico B15, Tabela A15*), o único comportamento relevante é o pico que parece se apresentar às 48 horas para todos os estímulos. Finalmente, para as moléculas de MyD88 (*Gráfico B17, Tabela A16*), vemos um padrão de decaimento da expressão relativa sob todos os estímulos ao longo do tempo; um pico é apresentado às 12 horas para as moléculas estimuladas por **LPS**, mas ele também pode ser atribuído a uma observação discrepante que eleva a média, conforme é observado no *Gráfico B18*.

No experimento de **CBA**, o estímulo **LPS** volta a se destacar, mais precisamente na expressão de GM-CSF (*Gráfico B19, Tabela A6*), mas também para RANTES (*Gráfico B29, Tabela A11*). Em ambos os casos, as amostras com este tratamento apresentaram valores extremamente acima dos demais, especialmente em tempos acima de 6 horas. Também é notável a expressão de moléculas estimuladas com **LPS** quando analisada a expressão de KC (*Gráfico B25, Tabela A9*) e MCP (*Gráfico B27, Tabela A10*), nos quais também se destacam os estímulos **TNF- $\alpha$**  e o **extrato** do parasita. Esses dois estímulos também parecem provocar uma alta expressão da secreção IL-6 (*Gráfico B23, Tabela A8*), porém com alta variabilidade conforme mostrado no *Gráfico B24*. De acordo com as pesquisadoras, uma das maiores questões a serem respondidas por estes experimentos era se eritrócitos parasitados seriam capazes de estimular as células endoteliais para que elas liberassem fatores inflamatórios. Não há evidências de uma resposta positiva a partir dos dados analisados, pois o estímulo EP não parece apresentar comportamentos significativos nestes experimentos.

No experimento de **Imunoistoquímica** (*Tabela A17*), o que primeiro se observa (*Gráfico B31*) é uma observação muito maior que as demais referente ao TLR9 em um camundongo morto por hiperparasitemia (HP). É possível que tenha ocorrido algum equívoco no registro desta informação, pois todos os demais valores encontram-se dentro do intervalo [0,1], o que é esperado, já que se referem a proporções. Por conta disso, optou-se por desconsiderar tal observação e refazer as análises. No *Gráfico B32*, vemos que, de modo geral, os ratos não infectados

(NI) apresentam uma expressão mediana levemente menor para os receptores dos tipos TLR2 e TLR9, porém a diferença é menor do que o que era esperado previamente ao experimento. Entretanto, para os indivíduos dos grupos LPA/SDRA e HP, as expressões dos receptores TLR2 e TLR4 apresentam grande variabilidade relativamente ao grupo NI, o que deve ser levado em conta antes de tirar-se maiores conclusões. Vale apontar que as observações foram feitas apenas no sétimo dia pós-infecção e não se sabe se a expressão gênica analisada ocorre em algum outro momento, posterior ou anterior ao observado.

Finalmente, no experimento de **expressão de VEGF** (*Gráfico B33, Tabela A12*), nota-se uma tendência de crescimento ao longo do tempo na variável resposta para todos os estímulos. Entretanto, os valores observados são maiores para as amostras estimuladas com **TNF- $\alpha$**  e **LPS**, que também se destacaram em vários dos experimentos anteriormente descritos.

## 7. Análise inferencial

Visando avaliar a significância estatística dos achados descritos na seção anterior, foram conduzidos testes de hipóteses com dois objetivos principais:

1. Verificar se existe diferença (estatisticamente significante) nas respostas de cada estímulo em cada tempo, **quando comparadas ao controle** (Não Estimulado).
2. Identificar, para cada experimento, os instantes de amostragem nos quais são mais evidenciadas diferenças entre os estímulos e o controle. Tal identificação possibilitará nortear o delineamento de futuras coletas de dados.

Já para o experimento de imunoistoquímica, em que os fatores são os receptores do Tipo Toll e o tipo do camundongo analisado, o objetivo da análise será identificar diferenças significativas na expressão de cada receptor entre os grupos de camundongos.

Considerando a natureza das amostras, que apresentam tamanho pequeno, e somando-se a impossibilidade de verificação de suposições sobre modelos, optou-se pelo uso de testes não-paramétricos (*CONNOVER (1980)*).

Esta seção apresentará os resultados dos testes realizados em cada experimento, por meio de tabelas com valores-p. Representações gráficas destas tabelas também podem ser encontradas no Apêndice B (*Gráficos B35 a B52*).

## 7.1 Ensaio de adesão

Nos ensaios de adesão, em que os valores observados são proporções, foram conduzidos testes qui-quadrado de homogeneidade (BUSSAB e MORETTIN, 2013). As tabelas abaixo apresentam os valores-p para a hipótese nula de que estímulo e controle possuem mesma proporção esperada de células apresentando adesão. Valores destacados referem-se a hipóteses rejeitadas a uma significância de 5%.

*Tabela 1 – Valores-p referentes ao teste de aderência de qui-quadrado no experimento LO08 – observações comparadas com o controle (NE)*

Estímulo	24h	48h	72h
IFN-γ	<b>4,9%</b>	100,0%	<b>0,1%</b>
LPS	11,9%	<b>2,4%</b>	<b>0,0%</b>
TNF- α	7,7%	<b>0,4%</b>	<b>0,0%</b>
VEGF	70,5%	30,8%	5,4%

Vemos que os resultados da Tabela 1 são compatíveis com o observado na análise descritiva, com mais diferenças entre estímulo e controle significativas aparecendo no tempo de 72h para os estímulos IFN-γ, LPS e TNF- α.

*Tabela 2 – Valores-p referentes ao teste de aderência de qui-quadrado no experimento LO11-14-25 – observações comparadas com o controle (NE)*

Estímulo	1h	3h	6h	12h
EnP	19,1%	47,8%	98,0%	73,7%
EXT	27,7%	<b>0,0%</b>	<b>2,5%</b>	<b>0,0%</b>
IFN-γ	96,1%	35,9%	<b>0,4%</b>	88,9%
LPS	<b>0,5%</b>	<b>0,0%</b>	<b>0,0%</b>	<b>0,9%</b>
TNF- α	<b>0,3%</b>	26,2%	<b>0,0%</b>	<b>0,1%</b>
VEGF	<b>1,3%</b>	47,8%	<b>0,0%</b>	49,6%

Ao contrário do caso anterior, a maior parte dos resultados significativos apresentados na Tabela 2 não foi observada no maior tempo, e sim no tempo de

6h, sugerindo que este também é um momento conveniente para uma nova observação. Neste momento apenas para os eritrócitos não parasitados (EnP), que servem de controle negativo, não houve diferença em relação ao controle.

## 7.2 Quantificação de moléculas de adesão por PCR em tempo real

Para este experimento e todos os demais, nos quais as observações não são proporções e sim variáveis contínuas, o teste utilizado anteriormente (teste  $\chi^2$ ) não é mais indicado. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney (CONNOVER, 1980) é o teste mais apropriado para este tipo de situação. As tabelas a seguir apresentam os valores-p para a hipótese nula de que estímulo e controle possuem medianas coincidentes. Valores destacados referem-se a hipóteses rejeitadas a uma significância de 5%.

*Tabela 3 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de quantificação de CD36 por PCR em tempo real – observações comparadas com o controle (NE)*

	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h
<b>EnP</b>	6,5%	93,7%	<b>0,4%</b>	<b>1,7%</b>	100,0%	22,4%	86,4%
<b>EP</b>	39,4%	13,2%	58,9%	<b>2,6%</b>	86,4%	18,1%	100,0%
<b>EXT</b>	24,0%	48,5%	9,3%	<b>0,4%</b>	69,9%	77,6%	14,5%
<b>IFN-γ</b>	48,5%	58,9%	42,9%	<b>2,6%</b>	8,8%	86,4%	89,8%
<b>LPS</b>	6,5%	24,0%	<b>0,9%</b>	<b>1,5%</b>	86,4%	86,4%	<b>3,6%</b>
<b>TNF- α</b>	58,9%	24,0%	<b>1,5%</b>	6,5%	<b>0,3%</b>	<b>1,8%</b>	<b>1,8%</b>
<b>VEGF</b>	93,7%	69,9%	8,2%	6,5%	14,5%	77,6%	<b>1,2%</b>

Nesse caso (Tabela 3) observamos que o momento 12h parece ser o momento mais adequado para a observação de diferenças entre estímulo e controle na quantificação da molécula CD36 para a maioria dos estímulos. Para células estimuladas com VEGF, o momento mais adequado é 72h, enquanto para TNF- α e LPS, vemos significância também às 6h.

*Tabela 4 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de quantificação de ICAM-1 por PCR em tempo real – observações comparadas com o controle (NE)*

	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h
<b>EnP</b>	<b>1,5%</b>	100,0%	31,0%	53,7%	68,9%	32,8%	38,8%
<b>EP</b>	24,0%	100,0%	93,7%	24,0%	52,9%	60,7%	38,8%

<b>EXT</b>	<b>2,6%</b>	12,6%	31,0%	31,0%	36,4%	68,9%	38,8%
<b>IFN-γ</b>	<b>0,2%</b>	<b>0,4%</b>	<b>0,4%</b>	<b>0,2%</b>	<b>0,0%</b>	<b>0,0%</b>	6,6%
<b>LPS</b>	<b>0,2%</b>	<b>0,4%</b>	<b>0,2%</b>	<b>0,2%</b>	32,8%	14,5%	8,8%
<b>TNF- α</b>	<b>0,2%</b>	<b>0,4%</b>	<b>0,2%</b>	<b>0,2%</b>	<b>0,2%</b>	<b>0,2%</b>	<b>0,3%</b>
<b>VEGF</b>	<b>4,1%</b>	42,9%	42,9%	58,9%	38,8%	95,5%	32,8%

Para a quantificação do **ICAM-1** (Tabela 4), observamos que há diferença significativa para todos os estímulos no tempo de **1h**, com exceção do estímulo **EP** (que, no entanto não apresentou diferença estatística para nenhum dos tempos observados).

*Tabela 5 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de quantificação de VCAM por PCR em tempo real – observações comparadas com o controle (NE)*

	<b>1h</b>	<b>3h</b>	<b>6h</b>	<b>12h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>EnP</b>	<b>4,1%</b>	42,9%	100,0%	53,7%	45,6%	14,5%	45,6%
<b>EP</b>	100,0%	100,0%	69,9%	58,9%	38,8%	77,6%	95,5%
<b>EXT</b>	18,0%	5,2%	93,7%	81,8%	32,8%	95,5%	32,8%
<b>IFN-γ</b>	58,9%	<b>0,4%</b>	31,0%	58,9%	95,5%	<b>0,3%</b>	22,4%
<b>LPS</b>	<b>0,2%</b>	<b>0,4%</b>	<b>0,2%</b>	<b>0,2%</b>	<b>1,8%</b>	<b>0,1%</b>	<b>0,0%</b>
<b>TNF- α</b>	<b>0,2%</b>	<b>0,4%</b>	5,2%	<b>0,2%</b>	<b>0,3%</b>	<b>0,1%</b>	<b>0,0%</b>
<b>VEGF</b>	39,4%	32,9%	100,0%	31,0%	68,9%	95,5%	86,4%

Para **VCAM** (Tabela 5), vemos que o estímulo **LPS** apresenta valores significativos para todos os tempos do estudo e **TNF- α** em todos exceto 6h. De maneira geral, observamos que não há um tempo ideal no qual se verificam diferenças significativas para uma maioria de estímulos, apesar dos valores-p serem menores para LPS e TNF- α no tempo 72h.

### 7.3 Quantificação de citocinas inflamatórias via CBA

O mesmo teste de Mann-Whitney foi aplicado aos dados do experimento de CBA, porém a um nível de significância de 5%, nenhuma diferença significativa foi constatada, como podemos observar na Tabela 6 abaixo:

*Tabela 6 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de quantificação de GM-CSF por CBA– observações comparadas com o controle (NE)*

	<b>1h</b>	<b>3h</b>	<b>6h</b>	<b>12h</b>	<b>24h</b>
<b>EnP</b>	<b>10,0%</b>	40,0%	40,0%	50,7%	66,7%

<b>EP</b>	20,0%	<b>10,0%</b>	100,0%	85,7%	66,7%
<b>EXT</b>	10,0%	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	33,3%
<b>IFN-γ</b>	10,0%	<b>10,0%</b>	100,0%	70,0%	66,7%
<b>LPS</b>	<b>7,7%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	33,3%
<b>TNF- α</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	33,3%
<b>VEGF</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	33,3%

Isso ocorre pelo fato do experimento apresentar tamanhos amostrais pequenos, fato que enfraquece o teste. O mesmo acontece para todos as outras moléculas analisadas nesse experimento:

*Tabela 7 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de quantificação de IL1-B por CBA– observações comparadas com o controle (NE)*

	<b>1h</b>	<b>3h</b>	<b>6h</b>	<b>12h</b>	<b>24h</b>
<b>EnP</b>	<b>10,0%</b>	100,0%	70,0%	50,7%	100,0%
<b>EP</b>	<b>10,0%</b>	40,0%	<b>10,0%</b>	40,0%	33,3%
<b>EXT</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	20,0%	70,0%	22,1%
<b>IFN-γ</b>	<b>7,7%</b>	<b>10,0%</b>	20,0%	100,0%	33,3%
<b>LPS</b>	20,0%	65,8%	40,0%	50,7%	100,0%
<b>TNF- α</b>	<b>10,0%</b>	70,0%	65,3%	100,0%	41,4%
<b>VEGF</b>	100,0%	20,0%	20,0%	100,0%	33,3%

*Tabela 8 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de quantificação de IL6 por CBA– observações comparadas com o controle (NE)*

	<b>1h</b>	<b>3h</b>	<b>6h</b>	<b>12h</b>	<b>24h</b>
<b>EnP</b>	<b>10,0%</b>	100,0%	70,0%	<b>10,0%</b>	66,7%
<b>EP</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	40,0%	100,0%
<b>EXT</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	22,1%
<b>IFN-γ</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	40,0%	<b>10,0%</b>	66,7%
<b>LPS</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>6,4%</b>	<b>6,4%</b>	22,1%
<b>TNF- α</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	70,0%	<b>10,0%</b>	100,0%
<b>VEGF</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	40,0%	<b>10,0%</b>	66,7%

*Tabela 9 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de quantificação de KC por CBA– observações comparadas com o controle (NE)*

	<b>1h</b>	<b>3h</b>	<b>6h</b>	<b>12h</b>	<b>24h</b>
<b>EnP</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	20,0%	<b>10,0%</b>	33,3%
<b>EP</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>5,7%</b>	66,7%
<b>EXT</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	33,3%
<b>IFN-γ</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	33,3%
<b>LPS</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	33,3%
<b>TNF- α</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	33,3%
<b>VEGF</b>	100,0%	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	66,7%



*Tabela 10 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de quantificação de MCP por CBA– observações comparadas com o controle (NE)*

	<b>1h</b>	<b>3h</b>	<b>6h</b>	<b>12h</b>	<b>24h</b>
<b>EnP</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	40,0%	33,3%
<b>EP</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	22,9%	100,0%
<b>EXT</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	33,3%
<b>IFN-γ</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	33,3%
<b>LPS</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	33,3%
<b>TNF- α</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	33,3%
<b>VEGF</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	33,3%

*Tabela 11 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de quantificação de RANTES por CBA– observações comparadas com o controle (NE)*

	<b>1h</b>	<b>3h</b>	<b>6h</b>	<b>12h</b>	<b>24h</b>
<b>EnP</b>	<b>10,0%</b>	<b>7,7%</b>	<b>10,0%</b>	20,0%	33,3%
<b>EP</b>	<b>10,0%</b>	<b>7,7%</b>	<b>10,0%</b>	62,9%	33,3%
<b>EXT</b>	<b>10,0%</b>	<b>7,7%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	33,3%
<b>IFN-γ</b>	<b>10,0%</b>	<b>7,7%</b>	70,0%	<b>7,7%</b>	33,3%
<b>LPS</b>	<b>10,0%</b>	<b>7,7%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	33,3%
<b>TNF- α</b>	<b>10,0%</b>	<b>7,7%</b>	<b>10,0%</b>	<b>10,0%</b>	22,1%
<b>VEGF</b>	<b>10,0%</b>	<b>7,7%</b>	<b>7,7%</b>	<b>10,0%</b>	66,7%

#### 7.4 Quantificação do fator VEGF

Novamente o teste de Mann-Whitney foi usado no experimento de quantificação do fator de crescimento VEGF:

*Tabela 12 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de quantificação de VEGF– observações comparadas com o controle (NE)*

	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>EnP</b>	88,6%	88,6%	20,0%
<b>EP</b>	11,4%	68,6%	34,3%
<b>EXT</b>	5,9%	68,6%	34,3%
<b>IFN-γ</b>	88,6%	48,6%	24,5%
<b>LPS</b>	<b>2,9%</b>	<b>2,9%</b>	<b>2,9%</b>
<b>TNF- α</b>	<b>2,9%</b>	<b>2,9%</b>	<b>2,9%</b>

Vemos na Tabela 12 que as diferenças são significativas para os estímulos LPS e TNF-  $\alpha$  em todos os tempos analisados. Em nenhum outro caso foram detectadas diferenças significativas. Concluímos que estes dois estímulos são importantes, mas pouco pode ser afirmado sobre os tempos de observação.

## 7.5 Quantificação da expressão gênica de receptores do tipo *Toll*

Analisamos agora os dados referentes à expressão de receptores do Tipo *Toll* (TLR2, TLR4 e TLR9), além das moléculas MyD88, também ligadas ao sistema imunológico. A quantificação também foi feita através de PCR em tempo real e testes de Mann-Whitney também foram realizados:

*Tabela 13 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de quantificação de receptores TLR2 por PCR em tempo real– observações comparadas com o controle (NE)*

	1h	3h	12h	24h	48h	72h
<b>EnP</b>	70,0%	70,0%	100,0%	26,2%	39,3%	<b>3,6%</b>
<b>EP</b>	100,0%	100,0%	100,0%	<b>2,4%</b>	<b>3,6%</b>	9,5%
<b>EXT</b>	40,0%	10,0%	10,0%	<b>2,4%</b>	<b>3,6%</b>	14,3%
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	10,0%	40,0%	10,0%	<b>2,4%</b>	7,1%	9,5%
<b>LPS</b>	10,0%	10,0%	10,0%	<b>2,4%</b>	<b>3,6%</b>	<b>3,6%</b>
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	10,0%	10,0%	10,0%	<b>2,4%</b>	<b>3,6%</b>	<b>3,6%</b>
<b>VEGF</b>	100,0%	70,0%	100,0%	16,7%	14,3%	14,3%

Como visto na Tabela 13, o momento em que verificamos a maioria das diferenças para os receptores do **TLR2** é o momento de **24h**. Observa-se também que **VEGF** não apresentou diferença significativa com relação ao controle.

*Tabela 14 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de quantificação de receptores TLR4 por PCR em tempo real– observações comparadas com o controle (NE)*

	1h	3h	12h	24h	48h	72h
<b>EnP</b>	100,0%	10,0%	10,0%	90,5%	9,5%	14,3%
<b>EP</b>	70,0%	10,0%	10,0%	90,5%	9,5%	14,3%
<b>EXT</b>	20,0%	10,0%	10,0%	38,1%	16,7%	14,3%
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	10,0%	10,0%	10,0%	<b>2,4%</b>	38,1%	9,5%
<b>LPS</b>	100,0%	100,0%	10,0%	9,5%	<b>4,8%</b>	<b>3,6%</b>
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	10,0%	70,0%	10,0%	<b>2,4%</b>	90,5%	7,1%
<b>VEGF</b>	70,0%	100,0%	10,0%	71,4%	<b>2,4%</b>	<b>3,6%</b>

Vemos na Tabela 14 que para o receptor do tipo **TLR4**, há poucos momentos, bem como estímulos, em que verificamos diferença estatística entre estímulos e controle.

*Tabela 15 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de quantificação de receptores TLR9 por PCR em tempo real– observações comparadas com o controle (NE)*

	1h	3h	12h	24h	48h	72h
<b>EnP</b>	70,0%	70,0%	10,0%	16,7%	54,8%	<b>3,6%</b>
<b>EP</b>	40,0%	40,0%	10,0%	9,5%	<b>4,8%</b>	<b>3,6%</b>
<b>EXT</b>	40,0%	70,0%	100,0%	<b>2,4%</b>	<b>2,4%</b>	<b>3,6%</b>
<b>IFN-γ</b>	100,0%	100,0%	10,0%	38,1%	85,7%	9,5%
<b>LPS</b>	70,0%	100,0%	40,0%	<b>2,4%</b>	38,1%	<b>3,6%</b>
<b>TNF- α</b>	100,0%	70,0%	100,0%	<b>2,4%</b>	54,8%	<b>3,6%</b>
<b>VEGF</b>	100,0%	40,0%	100,0%	26,2%	100,0%	7,1%

Para receptores do tipo **TLR9** (Tabela 15), o momento em que verificamos a maioria das diferenças é o momento de **72h**. Vemos também que **VEGF** e **IFN-γ** não apresentaram diferença significativa com relação ao controle para esse tipo de receptor em nenhum dos tempos estudados.

*Tabela 16 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de quantificação de MyD88 por PCR em tempo real– observações comparadas com o controle (NE)*

	1h	3h	12h	24h	48h	72h
<b>EnP</b>	70,0%	100,0%	70,0%	26,2%	<b>2,4%</b>	9,5%
<b>EP</b>	40,0%	20,0%	20,0%	71,4%	<b>2,4%</b>	<b>3,6%</b>
<b>EXT</b>	40,0%	20,0%	100,0%	71,4%	71,4%	<b>3,6%</b>
<b>IFN-γ</b>	20,0%	20,0%	100,0%	16,7%	90,5%	38,1%
<b>LPS</b>	20,0%	40,0%	40,0%	<b>2,4%</b>	<b>2,4%</b>	<b>3,6%</b>
<b>TNF- α</b>	10,0%	20,0%	100,0%	<b>2,4%</b>	26,2%	<b>3,6%</b>
<b>VEGF</b>	10,0%	20,0%	100,0%	26,2%	71,4%	7,1%

Podemos observar na Tabela 16 que, assim como nas análises de receptores *Toll*, os resultados relevantes aparecem apenas após as 24h, especialmente às 72h. No entanto, devemos ressaltar que, para tempos inferiores a 24h, as amostras possuem tamanho inferior (n=3).

Quanto aos estímulos, nota-se que o LPS apresentou resultados significativos em todos os tempos acima de 24h, seu bom desempenho também nas análises dos receptores *Toll* sugere que ele tem um papel importante.

### **7.6 Imunoistoquímica de receptores do tipo *Toll***

Neste experimento, os testes foram usados para comparação da expressão de cada receptor do tipo *Toll* entre os grupos de camundongos analisados (NI, HP, LPA/SDRA).

Inicialmente, testes de Kruskal-Wallis (CONOVER,1980) foram feitos para testar a hipótese de igualdade simultânea de medianas para os três grupos de cada receptor *Toll*. Essa hipótese foi rejeitada para os três receptores (valores  $p = 0.003$ ,  $0.0001$  e  $0.0001$  para os receptores TLR2, TLR4 e TLR9, respectivamente), o que significa que nos três casos há pelo menos um grupo cuja mediana é diferente das demais. Para analisar essas diferenças mais a fundo, testes de Mann-Whitney serão feitos, comparando dois a dois os grupos dentro de cada receptor *Toll*.

Para os receptores TLR2, os seguintes valores foram obtidos:

*Tabela 17 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de imunoistoquímica do receptor TLR2 – Grupos comparados dois a dois*

	<b>p</b>
NI vs HP	<b>1,0%</b>
NI vs LPA/SDRA	<b>0,0%</b>
HP vs LPA/SDRA	<b>42,3%</b>

Vemos então, na Tabela 17, que há diferença significativa na expressão do receptor entre o grupo Não Infectado e os demais, mas não entre os grupos HP e LPA/SDRA.

*Tabela 18 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de imunoistoquímica do receptor TLR4 – Grupos comparados dois a dois*

	<b>p</b>
NI vs HP	<b>4,4%</b>
NI vs LPA/SDRA	19,1%
HP vs LPA/SDRA	<b>0,0%</b>

Nesse caso (Tabela 18), o grupo HP se diferencia dos demais, mas o grupo LPA/SDRA não tem diferença significativa quando comparado com o grupo Não Infectado.

*Tabela 19 – Valores-p referentes ao teste de Mann-Whitney no experimento de imunoistoquímica do receptor TLR9 – Grupos comparados dois a dois*

	<b>p</b>
NI vs HP	<b>1,2%</b>
NI vs LPA/SDRA	<b>0,0%</b>
HP vs LPA/SDRA	<b>4,2%</b>

Nesse caso (Tabela 19), os três grupos são diferentes entre si.

## 8. Conclusão

Conclusões gerais sobre o estudo como um todo são complicadas pelo caráter exploratório dos experimentos, que nem sempre são relacionados, por se tratarem de quantificações diferentes. Dito isso, o que mais faz sentido é observar cada experimento individualmente e a eficácia das análises ao responder às questões feitas ao início da análise: quais estímulos se diferem mais do controle e quais os melhores tempos de observação, perguntas que a análise inferencial buscou responder, apesar de existir casos em que quase nada pode ser afirmado.

Ao analisar moléculas de adesão e citosinas, vemos um papel importante dos estímulos LPS e TNF- $\alpha$ , que apresentaram diferenças significativas em algum momento em todos os experimentos dessa categoria. A diferença fica justamente por conta destes momentos, já que em alguns experimentos, como os de adesão, os resultados mais expressivos surgem em tempos mais específicos e em outros, como no PCR de ICAM e VCAM e na quantificação de VEGF, eles ocorrem em praticamente todos os tempos observados.

Já na quantificação de receptores do tipo *Toll* por PCR em tempo real, apesar de inicialmente a análise parecer revelar que as diferenças são melhor observadas em tempos acima de 24 horas, convém lembrar que isso não é necessariamente verdade, devido ao fato dos tamanhos diferentes de amostras. A análise descritiva sugere que diferenças significativas também poderiam ser observadas em tempos menores, caso as amostras fossem maiores. Quanto aos estímulos, apesar de comportamentos significativos serem observados para os mesmos estímulos dos demais experimentos, nota-se também várias diferenças significativas entre outros estímulos e o controle. Pela análise descritiva nota-se que o comportamento das respostas é sempre semelhante independente do estímulo.

A fim de atender melhor os objetivos principais do estudo, descritos no início deste relatório, as informações obtidas aqui podem ser usadas para um melhor direcionamento de estudos futuros, focando nos instantes e estímulos considerados mais relevantes em cada experimento, ainda que considerando o caráter exploratório das análises estatísticas conduzidas.

## **APÊNDICE A - TABELAS**

*Tabela A1 – Medidas descritivas das proporções observadas no experimento L008 de Adesão, de acordo com tempo de observação e estímulo aplicado*

<b>Tempo</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>N</b>
24h	IFN-γ	5,333	2,333	5	4	7	3
	LPS	4,667	2,333	5	3	6	3
	NE	2,250	0,250	2	2	3	4
	TNF- α	5,000	1,000	5	4	6	3
	VEGF	3,000	4,000	3	1	5	3
48h	IFN-γ	4,000	3,000	3	3	6	3
	LPS	8,000	4,000	8	6	10	3
	NE	3,750	0,917	3,5	3	5	4
	TNF- α	9,333	4,333	10	7	11	3
	VEGF	5,667	6,333	6	3	8	3
72h	IFN-γ	9,333	40,333	13	2	13	3
	LPS	11,667	20,333	12	7	16	3
	NE	3,250	4,250	3,5	1	5	4
	TNF- α	13,000	7,000	14	10	15	3
	VEGF	6,667	4,333	6	5	9	3

*Tabela A2 – Medidas descritivas das proporções observadas no experimento LO11-14-25 de Adesão, de acordo com tempo de observação e estímulo aplicado*

<b>Tempo</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>N</b>
1h	EnP	1,833	0,567	2	1	3	6
	EXT	2,000	3,200	1,5	0	5	6
	IFN-γ	2,833	0,567	3	2	4	6
	LPS	5,833	20,167	6	0	11	6
	NE	3,000	3,091	3	1	7	12
	TNF- α	6,000	6,000	5	4	10	6
3h	VEGF	5,500	19,100	5,5	0	10	6
	EnP	2,833	1,367	2,5	2	5	6
	EXT	8,667	23,867	9	3	14	6
	IFN-γ	3,000	8,000	2	0	7	6
	LPS	7,000	26,400	7	2	12	6
	NE	2,167	1,788	2,5	0	4	12
6h	TNF- α	3,167	6,967	2,5	1	8	6
	VEGF	2,833	9,767	1,5	1	9	6
	EnP	3,400	4,267	3	0	7	10
	EXT	5,400	3,822	5,5	3	9	10
	IFN-γ	6,000	6,000	5,5	3	12	10
	LPS	8,300	10,011	7,5	5	14	10
12h	NE	3,500	4,533	3	1	8	16
	TNF- α	8,000	4,889	8,5	4	10	10
	VEGF	7,000	10,000	6,5	4	15	10
	EnP	2,833	0,567	3	2	4	6
	EXT	10,000	18,800	9,5	5	18	6
	IFN-γ	3,500	0,300	3,5	3	4	6
	LPS	6,000	17,200	5,5	2	11	6
	NE	3,250	1,114	3	1	5	12
	TNF- α	6,667	15,867	6	2	14	6
	VEGF	4,000	1,200	4	3	6	6

*Tabela A3 – Medidas descritivas das observações do experimento de PCR em tempo real, de acordo com tempo de observação e estímulo aplicado para a molécula ICAM-1*

Tempo	Estímulo	Média	Variância	Mediana	Mínimo	Máximo	N
1h	EnP	1,297	0,032	1,367	1,050	1,503	6
	EP	1,159	0,085	1,147	0,704	1,592	6
	EXT	1,344	0,046	1,316	1,091	1,681	6
	IFN-γ	2,338	0,444	2,104	1,939	3,675	6
	LPS	6,816	29,389	5,969	1,692	14,280	6
	NE	1,000	0,028	0,960	0,778	1,274	6
	TNF- α	4,946	6,206	4,654	2,600	7,586	6
3h	VEGF	1,308	0,046	1,338	1,031	1,538	6
	EnP	1,000	0,104	0,905	0,580	1,383	5
	EP	1,046	0,153	0,981	0,656	1,765	6
	EXT	1,265	0,113	1,201	0,938	1,650	6
	IFN-γ	7,934	53,507	3,645	2,957	20,311	6
	LPS	6,481	3,205	6,521	4,515	8,225	6
	NE	1,000	0,072	0,920	0,660	1,340	5
6h	TNF- α	4,222	0,779	4,150	3,058	5,301	6
	VEGF	2,067	3,808	1,329	0,560	5,696	6
	EnP	0,860	0,186	0,689	0,447	1,631	6
	EP	1,187	0,407	1,090	0,481	2,243	6
	EXT	1,252	1,308	0,896	0,513	3,561	6
	IFN-γ	2,452	0,441	2,373	1,765	3,485	5
	LPS	2,426	0,598	2,342	1,535	3,802	6
12h	NE	1,000	0,025	1,037	0,747	1,213	6
	TNF- α	4,303	15,530	2,536	1,367	11,366	6
	VEGF	0,946	0,190	0,709	0,643	1,667	5
	EnP	1,058	0,054	1,077	0,697	1,275	5
	EP	1,953	3,692	1,380	0,632	5,807	6
	EXT	1,268	0,268	1,250	0,494	2,034	6
	IFN-γ	6,231	17,209	5,383	1,897	13,882	6
24h	LPS	3,441	0,786	3,601	2,190	4,438	6
	NE	1,000	0,025	1,037	0,739	1,210	6
	TNF- α	5,135	1,241	5,032	3,580	7,002	6
	VEGF	1,020	0,139	0,946	0,694	1,702	6
	EnP	0,957	0,145	1,165	0,365	1,256	6
	EP	0,785	0,087	0,779	0,460	1,245	6
	EXT	1,125	0,013	1,058	1,042	1,301	5
	IFN-γ	5,170	12,765	3,859	2,508	11,968	6
	LPS	1,216	0,305	1,229	0,564	1,949	6
	NE	1,000	0,276	0,978	0,464	2,026	9
	TNF- α	3,134	1,757	3,139	1,317	4,520	6
	VEGF	1,568	1,219	1,139	0,380	3,186	6

*Tabela A3 – Continuação*

<b>Tempo</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>N</b>
48h	EnP	0,871	0,032	0,920	0,569	1,059	6
	EP	1,043	0,048	1,018	0,711	1,335	6
	EXT	0,973	0,070	0,896	0,713	1,449	6
	IFN-γ	3,419	0,738	3,575	1,981	4,516	6
	LPS	0,838	0,023	0,867	0,550	0,957	6
	NE	1,000	0,033	0,972	0,735	1,275	9
	TNF- α	4,618	7,922	4,637	1,124	8,418	6
72h	VEGF	1,018	0,043	1,027	0,712	1,238	6
	EnP	0,770	0,396	0,628	0,165	1,698	6
	EP	0,673	0,317	0,643	0,048	1,317	6
	EXT	0,775	0,249	0,731	0,315	1,422	6
	IFN-γ	2,238	1,286	2,598	0,747	3,374	6
	LPS	0,535	0,164	0,520	0,131	0,947	6
	NE	1,000	0,238	0,939	0,392	1,824	9
	TNF- α	2,835	2,300	2,459	1,237	5,308	6
	VEGF	0,708	0,266	0,575	0,210	1,441	6

*Tabela A4 – Medidas descritivas das observações do experimento de PCR em tempo real, de acordo com tempo de observação e estímulo aplicado para a molécula VCAM*

Tempo	Estímulo	Média	Variância	Mediana	Mínimo	Máximo	N
1h	EnP	1,1503	0,0100	1,1393	1,0037	1,3104	6
	EP	0,9964	0,0313	0,9981	0,7527	1,2691	6
	EXT	1,1913	0,0478	1,2215	0,8386	1,4242	6
	IFN-γ	1,0559	0,0101	1,0791	0,8697	1,1609	6
	LPS	2,4681	0,2938	2,2473	1,9617	3,3851	6
	NE	1,0000	0,0140	0,9665	0,8869	1,1800	6
	TNF- α	2,1256	0,0221	2,0929	1,9773	2,3919	6
	VEGF	1,0740	0,0247	1,0077	0,9613	1,3620	6
3h	EnP	1,5790	0,3468	1,8291	0,8349	2,0994	6
	EP	1,6958	1,2873	1,3826	0,7758	3,6482	6
	EXT	1,3594	0,1214	1,2965	0,9461	1,9560	6
	IFN-γ	2,9262	5,3291	1,7689	1,2485	7,1272	6
	LPS	5,6062	1,7710	6,0575	3,9104	6,9646	6
	NE	1,0000	0,0186	0,9927	0,8669	1,2211	5
	TNF- α	4,2409	0,5052	4,1080	3,6093	5,5275	6
	VEGF	2,4246	4,4514	1,3242	0,8873	5,8609	6
6h	EnP	1,3054	0,9437	0,9980	0,5298	2,9360	6
	EP	0,9805	0,3287	0,8549	0,4209	1,9685	6
	EXT	0,9757	0,0679	1,0136	0,5107	1,2544	6
	IFN-γ	1,7045	1,5938	1,5020	0,7079	4,1396	6
	LPS	3,2473	1,1299	3,3672	1,7388	4,8592	6
	NE	1,0000	0,0799	0,9954	0,6091	1,4119	6
	TNF- α	1,8664	0,5157	1,8510	0,9084	2,9313	5
	VEGF	0,9980	0,0597	1,0238	0,7470	1,3435	5
12h	EnP	1,1377	0,2616	1,3406	0,4385	1,7357	5
	EP	1,4190	0,7124	1,0549	0,7896	2,9921	6
	EXT	0,9575	0,2310	1,1450	0,3578	1,5077	6
	IFN-γ	1,2510	0,7018	0,8039	0,6540	2,7001	6
	LPS	2,7955	0,7490	2,6672	1,8584	3,9449	6
	NE	1,0000	0,0350	0,9916	0,7877	1,2674	6
	TNF- α	4,7988	4,1083	3,9895	2,6885	8,0366	6
	VEGF	0,7355	0,1646	0,6061	0,2038	1,2897	6
24h	EnP	0,8477	0,3000	0,7639	0,2086	1,4797	6
	EP	0,7171	0,0949	0,6691	0,3194	1,2318	6
	EXT	0,7334	0,3037	0,6813	0,1896	1,4791	6
	IFN-γ	0,8489	0,0448	0,8415	0,6109	1,2106	6
	LPS	2,4315	1,6639	2,4262	0,8306	4,0757	6
	NE	1,0000	0,2701	0,6969	0,4924	1,9378	9
	TNF- α	2,0603	0,1253	2,0773	1,6296	2,5856	6
	VEGF	1,0933	0,2140	1,0257	0,4542	1,7089	6

*Tabela A4 – Continuação*

<b>Tempo</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>N</b>
48h	EnP	0,8511	0,0206	0,8073	0,7119	1,0565	6
	EP	0,9240	0,0406	0,9095	0,6330	1,2228	6
	EXT	1,0958	0,2744	1,0407	0,4149	1,7209	6
	IFN-γ	1,7773	0,2891	1,7413	1,1943	2,5543	6
	LPS	2,1267	0,2649	2,1021	1,6101	2,6856	6
	NE	1,0000	0,0959	1,0205	0,5192	1,6437	9
	TNF- α	4,0260	7,1375	3,3325	1,3338	8,4486	6
72h	VEGF	0,9836	0,0705	0,9532	0,6357	1,4263	6
	EnP	0,8550	0,1307	0,8243	0,4031	1,3430	6
	EP	0,9575	0,0317	0,9905	0,6501	1,1668	6
	EXT	1,1654	0,0547	1,1526	0,7753	1,4718	6
	IFN-γ	2,9059	10,1210	1,2726	0,0772	8,1488	6
	LPS	2,0790	0,1476	2,1381	1,5123	2,5224	6
	NE	1,0000	0,0591	0,9186	0,6427	1,3679	9
	TNF- α	4,1084	3,4624	4,9356	1,5866	6,1770	6
	VEGF	0,9656	0,0727	0,9508	0,5662	1,3094	6

*Tabela A5 – Medidas descritivas das observações do experimento de PCR em tempo real, de acordo com tempo de observação e estímulo aplicado para a molécula CD36*

Tempo	Estímulo	Média	Variância	Mediana	Mínimo	Máximo	N
1h	EnP	2,969	4,576	2,630	1,023	5,600	6
	EP	2,579	3,756	2,121	0,813	5,029	6
	EXT	2,282	2,311	2,037	0,808	4,231	6
	IFN-γ	0,907	0,006	0,906	0,816	1,006	6
	LPS	2,636	2,877	2,381	1,054	4,650	6
	NE	1,000	0,040	0,963	0,725	1,275	6
	TNF- α	0,943	0,012	0,939	0,817	1,078	6
	VEGF	0,983	0,007	0,973	0,889	1,113	6
3h	EnP	0,979	0,051	0,950	0,703	1,229	6
	EP	1,298	0,139	1,442	0,681	1,717	6
	EXT	0,897	0,091	0,845	0,496	1,250	6
	IFN-γ	1,056	0,028	1,058	0,831	1,282	6
	LPS	1,203	0,065	1,322	0,815	1,407	6
	NE	1,000	0,009	1,036	0,865	1,101	6
	TNF- α	1,148	0,051	1,091	0,896	1,509	6
	VEGF	1,098	0,049	1,045	0,881	1,426	6
6h	EnP	1,669	0,152	1,831	1,151	2,205	9
	EP	1,119	0,132	1,142	0,599	1,621	6
	EXT	1,317	0,382	1,445	0,239	2,063	6
	IFN-γ	1,345	0,301	1,566	0,737	1,983	5
	LPS	1,624	0,152	1,489	1,300	2,272	6
	NE	1,000	0,044	0,989	0,687	1,335	6
	TNF- α	1,542	0,148	1,365	1,202	2,032	6
	VEGF	1,412	0,161	1,342	0,971	2,058	5
12h	EnP	0,450	0,026	0,404	0,308	0,727	5
	EP	0,481	0,050	0,473	0,191	0,854	6
	EXT	0,427	0,017	0,368	0,349	0,685	6
	IFN-γ	0,546	0,023	0,503	0,399	0,783	6
	LPS	0,517	0,026	0,438	0,364	0,770	6
	NE	1,000	0,141	0,991	0,505	1,438	6
	TNF- α	0,575	0,031	0,560	0,359	0,878	6
	VEGF	0,636	0,057	0,579	0,437	1,098	6
24h	EnP	0,957	0,369	1,013	0,156	1,623	6
	EP	1,049	0,146	1,052	0,528	1,507	6
	EXT	0,982	0,297	1,319	0,260	1,434	5
	IFN-γ	0,798	0,342	0,607	0,340	1,945	6
	LPS	0,995	0,376	0,889	0,247	1,749	6
	NE	1,000	0,047	0,964	0,623	1,325	9
	TNF- α	0,619	0,013	0,592	0,473	0,754	6
	VEGF	1,424	0,323	1,233	0,952	2,383	6

*Tabela A5 – Continuação*

<b>Tempo</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>N</b>
48h	EnP	1,614	0,894	1,274	0,644	2,892	6
	EP	2,076	2,954	1,296	0,908	5,302	6
	EXT	0,950	0,060	1,009	0,659	1,258	6
	IFN-γ	0,988	0,184	0,985	0,432	1,495	6
	LPS	0,969	0,213	0,996	0,380	1,603	6
	NE	1,000	0,097	0,953	0,550	1,610	9
	TNF- α	0,657	0,028	0,687	0,351	0,817	6
72h	VEGF	0,929	0,092	0,958	0,501	1,410	6
	EnP	0,882	0,305	1,039	0,160	1,413	6
	EP	1,370	1,194	1,181	0,348	2,937	6
	EXT	0,662	0,087	0,613	0,343	1,093	6
	IFN-γ	1,186	0,538	1,362	0,346	2,087	5
	LPS	0,574	0,029	0,603	0,313	0,764	6
	NE	1,000	0,180	0,754	0,569	1,734	9
	TNF- α	0,599	0,052	0,552	0,361	1,030	6
	VEGF	0,567	0,020	0,525	0,451	0,816	6

*Tabela A6 – Medidas descritivas das observações do experimento de CBA, de acordo com o tempo de observação e estímulo aplicado para a molécula GM-CSF*

<b>Tempo</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>N</b>
1h	EnP	8,5833	0,0390	8,62	8,37	8,76	3
	EP	8,3333	0,0126	8,36	8,21	8,43	3
	Ext	8,5667	0,0289	8,5	8,44	8,76	3
	IFN-γ	8,5933	0,0092	8,61	8,49	8,68	3
	LPS	8,5833	0,0040	8,62	8,51	8,62	3
	NE	8,1067	0,0144	8,1	7,99	8,23	3
	TNF- α	8,7033	0,0576	8,8	8,43	8,88	3
3h	VEGF	10,0433	0,0784	10,05	9,76	10,32	3
	EnP	8,3933	0,0026	8,38	8,35	8,45	3
	EP	8,5733	0,0114	8,55	8,48	8,69	3
	Ext	8,9933	0,1304	8,96	8,65	9,37	3
	IFN-γ	8,8133	0,0254	8,77	8,68	8,99	3
	LPS	10,6833	0,1792	10,78	10,22	11,05	3
	NE	8,3000	0,0091	8,31	8,2	8,39	3
6h	TNF- α	9,2367	0,0065	9,25	9,15	9,31	3
	VEGF	9,9500	0,0037	9,98	9,88	9,99	3
	EnP	8,4067	0,0390	8,37	8,23	8,62	3
	EP	8,6433	0,0702	8,56	8,43	8,94	3
	Ext	9,1467	0,0617	9,28	8,86	9,3	3
	IFN-γ	8,6600	0,0247	8,69	8,49	8,8	3
	LPS	15,1033	0,1960	14,96	14,75	15,6	3
12h	NE	8,5867	0,0134	8,53	8,51	8,72	3
	TNF- α	10,1767	0,1212	10,09	9,88	10,56	3
	VEGF	9,6400	0,0189	9,61	9,52	9,79	3
	EnP	8,8600	0,3324	8,76	8,34	9,48	3
	EP	8,4075	0,0844	8,48	8,02	8,65	4
	Ext	9,1967	0,0862	9,33	8,86	9,4	3
	IFN-γ	8,5733	0,0444	8,69	8,33	8,7	3
24h	LPS	24,0700	6,9937	23,75	21,6	26,86	3
	NE	8,4567	0,0158	8,44	8,34	8,59	3
	TNF- α	10,0433	0,0050	10,03	9,98	10,12	3
	VEGF	9,3467	0,0302	9,41	9,15	9,48	3
	EnP	9,1000	1,2482	9,1	8,31	9,89	2
	EP	8,3100	0,0098	8,31	8,24	8,38	2
	Ext	9,1800	0,0050	9,18	9,13	9,23	2
	IFN-γ	8,3000	0,0450	8,3	8,15	8,45	2
	LPS	113,8750	0,5941	113,875	113,33	114,42	2
	NE	8,1850	0,0421	8,185	8,04	8,33	2
	TNF- α	11,1900	0,0288	11,19	11,07	11,31	2
	VEGF	8,8650	0,0221	8,865	8,76	8,97	2

*Tabela A7 – Medidas descritivas das observações do experimento de CBA, de acordo com o tempo de observação e estímulo aplicado para a molécula IL 1-B*

<b>Tempo</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>N</b>
1h	EnP	20,930	0,091	20,89	20,65	21,25	3
	EP	21,080	0,116	20,98	20,8	21,46	3
	Ext	20,957	0,016	20,96	20,83	21,08	3
	IFN-γ	20,803	0,021	20,72	20,72	20,97	3
	LPS	20,413	0,065	20,43	20,15	20,66	3
	NE	20,040	0,017	20,04	19,91	20,17	3
	TNF- α	20,893	0,138	21	20,48	21,2	3
3h	VEGF	20,040	0,018	20,08	19,89	20,15	3
	EnP	20,417	0,034	20,48	20,21	20,56	3
	EP	20,683	0,079	20,83	20,36	20,86	3
	Ext	20,937	0,004	20,94	20,87	21	3
	IFN-γ	20,947	0,028	20,86	20,84	21,14	3
	LPS	20,443	0,000	20,45	20,43	20,45	3
	NE	20,500	0,041	20,42	20,35	20,73	3
6h	TNF- α	20,667	0,137	20,79	20,25	20,96	3
	VEGF	20,703	0,032	20,77	20,5	20,84	3
	EnP	20,623	0,023	20,65	20,46	20,76	3
	EP	20,773	0,004	20,76	20,72	20,84	3
	Ext	20,843	0,026	20,83	20,69	21,01	3
	IFN-γ	20,743	0,013	20,74	20,63	20,86	3
	LPS	20,640	0,013	20,63	20,53	20,76	3
12h	NE	20,520	0,027	20,48	20,38	20,7	3
	TNF- α	20,693	0,096	20,7	20,38	21	3
	VEGF	20,737	0,011	20,74	20,63	20,84	3
	EnP	21,177	0,314	21,35	20,55	21,63	3
	EP	20,495	0,060	20,385	20,35	20,86	4
	Ext	20,743	0,021	20,79	20,58	20,86	3
	IFN-γ	20,690	0,005	20,69	20,62	20,76	3
24h	LPS	20,610	0,010	20,59	20,52	20,72	3
	NE	20,703	0,021	20,72	20,55	20,84	3
	TNF- α	20,753	0,080	20,8	20,45	21,01	3
	VEGF	20,683	0,045	20,65	20,49	20,91	3
	EnP	20,245	0,061	20,245	20,07	20,42	2
	EP	20,230	0,001	20,23	20,21	20,25	2
	Ext	20,220	0,000	20,22	20,22	20,22	2
	IFN-γ	20,215	0,001	20,215	20,19	20,24	2
	LPS	20,455	0,061	20,455	20,28	20,63	2
	NE	20,285	0,000	20,285	20,28	20,29	2
	TNF- α	20,215	0,008	20,215	20,15	20,28	2
	VEGF	20,400	0,005	20,4	20,35	20,45	2

*Tabela A8 – Medidas descritivas das observações do experimento de CBA, de acordo com o tempo de observação e estímulo aplicado para a molécula IL-6*

<b>Tempo</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>N</b>
1h	EnP	449,9	25826,4	506,7	268,5	574,5	3
	EP	515,0	58845,3	390,7	359,7	794,5	3
	Ext	338,8	4541,6	349,4	266,7	400,2	3
	IFN-γ	413,0	1166,7	429,8	373,7	435,6	3
	LPS	486,3	4781,0	512,6	407,8	538,4	3
	NE	211,4	207,6	216,5	195,2	222,7	3
	TNF- α	1165,2	1587759,5	623,4	266,7	2605,6	3
3h	VEGF	1512,3	150851,6	1652,7	1073,2	1810,9	3
	EnP	921,8	6909,0	901,8	850,5	1013,1	3
	EP	1287,6	3424,6	1278,4	1234,3	1350,2	3
	Ext	3352,6	202947,8	3604,5	2832,5	3620,9	3
	IFN-γ	3329,0	65374,0	3269,6	3108,3	3609,2	3
	LPS	7005,2	356914,6	7335,9	6315,6	7364,3	3
	NE	910,5	14244,2	864,9	820,7	1045,9	3
6h	TNF- α	2576,9	221878,6	2311,8	2298,2	3120,8	3
	VEGF	1686,7	110610,4	1702,7	1346,3	2010,9	3
	EnP	1661,5	41967,0	1609,0	1487,9	1887,5	3
	EP	3030,3	176669,4	2879,5	2706,1	3505,2	3
	Ext	40079,6	820007966,4	23832,4	23262,8	73143,8	3
	IFN-γ	3243,1	2184375,4	2464,7	2316,9	4947,5	3
	LPS	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3
12h	NE	2032,4	267622,9	2150,2	1466,4	2480,7	3
	TNF- α	8039,0	48634275,5	11651,9	0,0	12465,1	3
	VEGF	2647,5	446959,4	2527,3	2047,2	3368,0	3
	EnP	4672,3	5035690,4	4028,1	2820,9	7168,0	3
	EP	5240,6	12934696,7	5647,4	1282,2	8385,3	4
	Ext	30704,5	203087582,3	24744,2	20401,5	46967,9	3
	IFN-γ	1686,5	4960,0	1674,1	1623,1	1762,3	3
24h	LPS	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3
	NE	1924,7	12174,6	1928,7	1812,4	2033,0	3
	TNF- α	22469,0	55971076,9	22761,9	14845,4	29799,6	3
	VEGF	2653,1	1218,3	2638,8	2627,7	2692,9	3
	EnP	1095,6	2400569,2	1095,6	0,0	2191,2	2
	EP	1943,4	1312621,2	1943,4	1133,3	2753,5	2
	Ext	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2
24h	IFN-γ	1909,9	27982,7	1909,9	1791,7	2028,2	2
	LPS	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2
	NE	2214,3	159646,4	2214,3	1931,7	2496,8	2
	TNF- α	24855,9	1235636003,7	24855,9	0,0	49711,9	2
	VEGF	1893,8	3621,0	1893,8	1851,2	1936,3	2

*Tabela A9 – Medidas descritivas das observações do experimento de CBA, de acordo com o tempo de observação e estímulo aplicado para a molécula KC*

Tempo	Estímulo	Média	Variância	Mediana	Mínimo	Máximo	N
1h	EnP	5,593	3,045	5,81	3,75	7,22	3
	EP	7,033	4,043	6,7	5,21	9,19	3
	Ext	6,820	1,639	6,84	5,53	8,09	3
	IFN-γ	8,510	0,171	8,57	8,07	8,89	3
	LPS	48,023	43,302	45,56	43,03	55,48	3
	NE	17,017	13,695	15,68	14,17	21,2	3
	TNF- α	49,027	51,277	49,48	41,65	55,95	3
3h	VEGF	17,017	13,695	15,68	14,17	21,2	3
	EnP	10,583	0,343	10,35	10,15	11,25	3
	EP	13,867	1,948	13,81	12,5	15,29	3
	Ext	291,120	5023,279	329,55	209,33	334,48	3
	IFN-γ	194,103	980,956	190,45	164,77	227,09	3
	LPS	421,690	2904,344	395,31	386,07	483,69	3
	NE	8,090	1,714	7,7	7,02	9,55	3
6h	TNF- α	79,740	80,657	78,88	71,22	89,12	3
	VEGF	14,363	9,744	15,23	10,9	16,96	3
	EnP	16,363	5,066	17,22	13,81	18,06	3
	EP	32,987	100,618	35,66	21,89	41,41	3
	Ext	618,317	7890,336	572,32	561,92	720,71	3
	IFN-γ	49,917	683,537	36,58	33,13	80,04	3
	LPS	675,493	4902,573	635,73	634,41	756,34	3
12h	NE	12,877	0,945	12,55	12,11	13,97	3
	TNF- α	414,243	7449,578	365,41	363,42	513,9	3
	VEGF	20,507	14,941	21,89	16,14	23,49	3
	EnP	41,110	22,341	42,34	35,89	45,1	3
	EP	76,148	6907,445	47,945	14,2	194,5	4
	Ext	559,940	2454,657	546,11	518,78	614,93	3
	IFN-γ	27,623	5,849	27,39	25,33	30,15	3
24h	LPS	575,027	3778,120	563,22	520,32	641,54	3
	NE	11,590	3,567	11,18	9,94	13,65	3
	TNF- α	282,970	1616,594	282,52	242,99	323,4	3
	VEGF	19,933	0,279	19,87	19,44	20,49	3
	EnP	190,310	63069,313	190,31	12,73	367,89	2
	EP	8,755	10,904	8,755	6,42	11,09	2
	Ext	820,170	7014,017	820,17	760,95	879,39	2
24h	IFN-γ	12,070	0,039	12,07	11,93	12,21	2
	LPS	632,615	935,281	632,615	610,99	654,24	2
	NE	10,420	2,122	10,42	9,39	11,45	2
	TNF- α	289,510	715,176	289,51	270,6	308,42	2
24h	VEGF	9,460	0,304	9,46	9,07	9,85	2

*Tabela A10 – Medidas descritivas das observações do experimento de CBA, de acordo com o tempo de observação e estímulo aplicado para a molécula MCP*

Tempo	Estímulo	Média	Variância	Mediana	Mínimo	Máximo	N
1h	EnP	610.56	42551.88	727.81	372.38	731.50	3
	EP	605.13	87118.50	466.21	405.07	944.12	3
	Ext	432.99	3188.77	449.69	370.05	479.22	3
	IFN-γ	497.41	226.18	494.63	483.96	513.65	3
	LPS	575.14	2048.42	596.30	523.18	605.95	3
	NE	214.13	841.70	227.34	180.86	234.18	3
	TNF-α	1330.77	2006500.06	656.86	377.04	2958.42	3
3h	VEGF	1736.13	88628.88	1712.98	1450.68	2044.74	3
	EnP	1004.63	10319.92	1014.39	898.52	1100.99	3
	EP	4022.61	99441.91	4005.12	3716.38	4346.34	3
	Ext	2562.55	23797.28	2532.79	2425.34	2729.53	3
	IFN-γ	1798.62	6274.39	1803.12	1717.25	1875.48	3
	LPS	4022.61	99441.91	4005.12	3716.38	4346.34	3
	NE	291.12	5023.28	329.55	209.33	334.48	3
6h	TNF-α	3930.08	81176.77	4043.64	3605.90	4140.71	3
	VEGF	1916.38	504921.91	1625.39	1397.49	2726.27	3
	EnP	1891.62	2636.50	1871.12	1853.69	1950.05	3
	EP	2104.75	143644.34	2287.02	1669.05	2358.19	3
	Ext	7548.69	304101.55	7382.84	7099.20	8164.04	3
	IFN-γ	3166.05	138.54	3170.08	3152.79	3175.27	3
	LPS	8417.59	126736.15	8264.15	8164.04	8824.58	3
12h	NE	1408.58	60413.72	1471.25	1137.52	1616.97	3
	TNF-α	9931.26	437829.34	10289.10	9167.71	10336.97	3
	VEGF	2618.52	323235.01	2569.49	2076.08	3209.98	3
	EnP	3373.38	372564.96	3489.71	2713.21	3917.23	3
	EP	4646.40	4577332.81	4221.24	2656.37	7486.75	4
	Ext	8789.06	690392.36	9184.33	7834.32	9348.54	3
	IFN-γ	5508.03	1105065.40	5710.22	4370.40	6443.47	3
24h	LPS	7488.86	550162.62	7183.71	6948.38	8334.49	3
	NE	2714.41	27079.53	2742.62	2537.57	2863.04	3
	TNF-α	6741.63	1631081.53	7161.83	5307.33	7755.72	3
	VEGF	3341.30	22630.13	3286.88	3225.65	3511.37	3
	EnP	6216.00	34823685.13	6216.00	2043.25	10388.75	2
	EP	1860.79	305613.44	1860.79	1469.88	2251.69	2
	Ext	10572.17	186172.02	10572.17	10267.07	10877.27	2
	IFN-γ	6694.68	179089.16	6694.68	6395.44	6993.92	2
	LPS	5773.31	72919.99	5773.31	5582.36	5964.25	2
	NE	1821.64	14263.61	1821.64	1737.19	1906.09	2
	TNF-α	6339.39	863876.26	6339.39	5682.17	6996.61	2
	VEGF	1979.74	6626.31	1979.74	1922.18	2037.30	2

*Tabela A11 – Medidas descritivas das observações do experimento de CBA, de acordo com o tempo de observação e estímulo aplicado para a molécula RANTES*

<b>Tempo</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>N</b>
1h	EnP	4.64	0.26	4.69	4.10	5.12	3
	EP	5.71	0.16	5.64	5.35	6.13	3
	Ext	4.60	0.02	4.63	4.44	4.73	3
	IFN-γ	4.07	0.02	4.01	3.97	4.23	3
	LPS	4.16	0.11	4.34	3.77	4.37	3
	NE	2.65	0.00	2.65	2.63	2.67	3
	TNF-α	5.95	13.69	4.39	3.28	10.17	3
3h	VEGF	7.25	0.47	7.57	6.46	7.71	3
	EnP	5.21	0.34	5.14	4.67	5.83	3
	EP	5.68	0.10	5.76	5.33	5.94	3
	Ext	5.13	0.01	5.09	5.04	5.26	3
	IFN-γ	5.32	0.22	5.33	4.85	5.79	3
	LPS	16.78	2.53	16.36	15.44	18.54	3
	NE	3.77	0.01	3.71	3.71	3.89	3
6h	TNF-α	6.73	1.43	6.73	5.54	7.93	3
	VEGF	6.53	0.18	6.66	6.05	6.87	3
	EnP	6.38	0.11	6.46	6.01	6.66	3
	EP	7.06	0.45	6.94	6.46	7.78	3
	Ext	7.95	0.48	8.28	7.15	8.42	3
	IFN-γ	5.84	1.38	5.47	4.89	7.15	3
	LPS	196.27	1521.59	211.58	151.93	225.30	3
12h	NE	5.25	0.03	5.33	5.05	5.36	3
	TNF-α	12.82	3.34	13.62	10.73	14.11	3
	VEGF	6.78	0.00	6.80	6.73	6.80	3
	EnP	8.75	6.42	9.33	5.98	10.95	3
	EP	7.17	2.49	7.39	5.26	8.63	4
	Ext	8.23	0.71	7.85	7.64	9.19	3
	IFN-γ	7.95	0.17	7.71	7.71	8.42	3
24h	LPS	592.31	1003.21	583.43	566.03	627.48	3
	NE	6.08	0.70	5.83	5.39	7.01	3
	TNF-α	15.77	0.10	15.79	15.44	16.08	3
	VEGF	7.71	0.10	7.85	7.36	7.93	3
	EnP	18.12	117.50	18.12	10.45	25.78	2
	EP	4.95	0.05	4.95	4.79	5.11	2
	Ext	16.92	38.02	16.92	12.56	21.28	2
	IFN-γ	7.76	4.12	7.76	6.32	9.19	2
	LPS	164.11	1.02	164.11	163.39	164.82	2
	NE	4.52	0.03	4.52	4.39	4.65	2
	TNF-α	116.93	0.00	116.93	116.93	116.93	2
	VEGF	5.90	3.86	5.90	4.51	7.29	2

*Tabela A12 – Medidas descritivas das observações do experimento de Quantificação de VEGF*

<b>Tempo</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>N</b>
24h	EnP	127,15	202,94	124,86	113,13	145,77	4
	EP	131,29	12,84	131,23	126,96	135,72	4
	Extrato	136,86	48,81	137,23	127,94	145,02	4
	IFN-γ	126,10	28,24	125,13	120,8	133,34	4
	LPS	229,19	76,02	225,44	223,71	242,19	4
	NE	124,24	21,09	124,75	119,07	128,37	4
48h	TNF- α	196,33	58,24	195,28	188,47	206,3	4
	EnP	186,17	76,58	183,39	179,39	198,52	4
	EP	188,74	21,60	190,47	181,87	192,14	4
	Extrato	191,06	102,25	190,14	181,23	202,74	4
	IFN-γ	189,55	61,24	191,12	179,93	196,03	4
	LPS	260,02	10,29	260,89	255,7	262,62	4
72h	NE	186,58	32,38	187,06	179,5	192,68	4
	TNF- α	241,46	21,38	242,25	235,38	245,97	4
	EnP	275,78	145,15	278,84	258,62	286,83	4
	EP	261,27	399,41	270,08	231,49	273,43	4
	Extrato	269,56	497,45	276,56	237,11	288,02	4
	IFN-γ	267,08	218,01	269,49	247,49	281,86	4
	LPS	326,50	50,87	328,99	316,12	331,9	4
	NE	258,78	80,19	262,24	245,65	265	4
	TNF- α	302,34	321,87	307,15	277,32	317,74	4

*Tabela A13 – Medidas descritivas das observações do experimento de PCR em tempo real, de acordo com tempo de observação e estímulo aplicado para o receptor do tipo Toll 2*

Tempo	Estímulo	Média	Variância	Mediana	Mínimo	Máximo	N
1h	EnP	0,944	0,018	0,966	0,803	1,065	3
	EP	0,987	0,045	0,948	0,798	1,215	3
	EXT	1,210	0,071	1,105	1,012	1,512	3
	IFN-γ	0,701	0,014	0,738	0,569	0,795	3
	LPS	4,553	1,551	5,014	3,143	5,502	3
	NE	1,000	0,032	0,982	0,831	1,188	3
	TNF- α	5,173	1,826	4,538	4,255	6,724	3
3h	VEGF	1,017	0,012	0,979	0,930	1,142	3
	EnP	1,091	0,025	1,124	0,920	1,230	3
	EP	0,936	0,002	0,918	0,904	0,986	3
	EXT	1,866	0,652	1,583	1,238	2,777	3
	IFN-γ	0,844	0,023	0,831	0,700	1,001	3
	LPS	9,126	3,685	9,075	7,233	11,071	3
	NE	1,000	0,023	0,939	0,888	1,173	3
12h	TNF- α	6,500	1,540	6,409	5,308	7,784	3
	VEGF	1,111	0,039	1,085	0,929	1,320	3
	EnP	1,113	0,036	1,010	0,996	1,333	3
	EP	1,053	0,209	1,183	0,544	1,432	3
	EXT	3,486	0,689	3,865	2,534	4,059	3
	IFN-γ	2,286	0,450	2,518	1,530	2,811	3
	LPS	8,910	15,323	7,994	5,534	13,201	3
24h	NE	1,000	0,082	1,140	0,670	1,190	3
	TNF- α	7,793	30,402	5,715	3,620	14,044	3
	VEGF	0,831	0,129	0,778	0,501	1,213	3
	EnP	1,349	0,268	1,138	0,969	1,939	3
	EP	1,413	0,043	1,325	1,266	1,650	3
	EXT	4,241	0,651	3,929	3,637	5,157	3
	IFN-γ	2,359	0,377	2,095	1,921	3,061	3
48h	LPS	14,348	81,009	13,619	5,735	23,691	3
	NE	1,000	0,034	0,983	0,722	1,256	6
	TNF- α	8,376	1,811	8,057	7,218	9,852	3
	VEGF	0,760	0,038	0,791	0,552	0,938	3
	EnP	0,703	0,028	0,674	0,553	0,882	3
	EP	0,523	0,004	0,549	0,450	0,570	3
	EXT	1,944	0,279	1,701	1,580	2,550	3
	IFN-γ	2,117	0,551	2,136	1,366	2,850	3
	LPS	4,837	2,362	5,081	3,193	6,237	3
	NE	1,000	0,137	1,025	0,620	1,380	5
	TNF- α	18,832	70,973	15,698	12,424	28,374	3
	VEGF	0,606	0,018	0,535	0,521	0,763	3

*Tabela A13 – Continuação*

<b>Tempo</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>N</b>
72h	EnP	0,459	0,024	0,540	0,280	0,557	3
	EP	0,435	0,033	0,435	0,307	0,562	2
	EXT	1,557	0,064	1,702	1,264	1,704	3
	IFN-γ	2,884	0,009	2,884	2,816	2,953	2
	LPS	3,648	2,072	4,200	2,014	4,729	3
	NE	1,000	0,116	0,898	0,661	1,441	5
	TNF- α	14,712	24,455	11,910	11,803	20,421	3
	VEGF	0,492	0,101	0,373	0,251	0,852	3

*Tabela A14 – Medidas descritivas das observações do experimento de PCR em tempo real, de acordo com o tempo de observação e estímulo aplicado para o receptor do tipo Toll 4*

Tempo	Estímulo	Média	Variância	Mediana	Mínimo	Máximo	N
1h	EnP	1,070	0,072	1,008	0,839	1,363	3
	EP	0,958	0,016	0,945	0,837	1,091	3
	EXT	1,195	0,026	1,157	1,056	1,372	3
	IFN-γ	0,820	0,006	0,842	0,731	0,886	3
	LPS	0,909	0,027	0,995	0,721	1,011	3
	NE	1,000	0,006	0,968	0,945	1,086	3
	TNF- α	0,845	0,005	0,806	0,802	0,927	3
	VEGF	0,942	0,037	0,923	0,760	1,142	3
3h	EnP	0,735	0,012	0,780	0,612	0,815	3
	EP	0,573	0,000	0,572	0,553	0,594	3
	EXT	0,573	0,008	0,565	0,490	0,664	3
	IFN-γ	0,775	0,002	0,778	0,729	0,818	3
	LPS	0,965	0,002	0,955	0,925	1,015	3
	NE	1,000	0,042	0,945	0,829	1,226	3
	TNF- α	0,911	0,047	0,875	0,716	1,143	3
	VEGF	1,021	0,146	0,924	0,697	1,442	3
12h	EnP	0,440	0,013	0,474	0,312	0,535	3
	EP	0,537	0,012	0,589	0,412	0,610	3
	EXT	0,296	0,012	0,252	0,216	0,421	3
	IFN-γ	0,508	0,024	0,575	0,329	0,620	3
	LPS	0,362	0,029	0,409	0,173	0,505	3
	NE	1,000	0,046	1,094	0,755	1,151	3
	TNF- α	0,494	0,005	0,478	0,435	0,567	3
	VEGF	0,719	0,002	0,732	0,673	0,753	3
24h	EnP	0,759	0,206	0,945	0,241	1,091	3
	EP	0,923	0,014	0,868	0,840	1,060	3
	EXT	0,794	0,009	0,794	0,699	0,888	3
	IFN-γ	0,591	0,001	0,579	0,575	0,619	3
	LPS	0,625	0,021	0,570	0,514	0,790	3
	NE	1,000	0,083	0,853	0,781	1,434	6
	TNF- α	0,338	0,001	0,341	0,300	0,374	3
	VEGF	1,551	0,919	1,409	0,672	2,573	3
48h	EnP	0,734	0,026	0,803	0,551	0,849	3
	EP	0,600	0,098	0,622	0,277	0,901	3
	EXT	0,753	0,065	0,768	0,491	0,998	3
	IFN-γ	0,759	0,154	0,580	0,489	1,209	3
	LPS	0,597	0,055	0,492	0,433	0,864	3
	NE	1,000	0,029	0,986	0,785	1,275	6
	TNF- α	1,091	0,449	0,924	0,520	1,829	3
	VEGF	0,723	0,001	0,725	0,697	0,746	3

*Tabela A14 – Continuação*

<b>Tempo</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>N</b>
72h	EnP	0,607	0,084	0,720	0,278	0,822	3
	EP	0,547	0,135	0,432	0,250	0,958	3
	EXT	0,589	0,012	0,650	0,464	0,653	3
	IFN-γ	0,486	0,000	0,486	0,476	0,495	2
	LPS	0,225	0,000	0,231	0,205	0,240	3
	NE	1,000	0,080	1,026	0,621	1,379	5
	TNF- α	0,624	0,019	0,563	0,527	0,780	3
	VEGF	0,325	0,011	0,296	0,237	0,442	3

*Tabela A15 – Medidas descritivas das observações do experimento de PCR em tempo real, de acordo com o tempo de observação e estímulo aplicado para o receptor do tipo Toll 9*

Tempo	Estímulo	Média	Variância	Mediana	Mínimo	Máximo	N
1h	EnP	2,085	2,358	2,033	0,576	3,646	3
	EP	0,816	0,299	0,545	0,458	1,446	3
	EXT	1,270	0,393	0,977	0,844	1,990	3
	IFN-γ	1,870	3,128	1,034	0,674	3,901	3
	LPS	1,003	0,106	0,841	0,791	1,378	3
	NE	1,000	0,245	0,728	0,700	1,571	3
	TNF- α	0,918	0,101	0,767	0,703	1,283	3
	VEGF	1,001	0,317	0,733	0,622	1,648	3
3h	EnP	0,845	0,021	0,803	0,726	1,005	3
	EP	0,754	0,100	0,623	0,524	1,114	3
	EXT	0,865	0,030	0,948	0,667	0,980	3
	IFN-γ	1,108	0,058	1,042	0,907	1,375	3
	LPS	1,025	0,145	1,046	0,635	1,394	3
	NE	1,000	0,112	1,064	0,639	1,297	3
	TNF- α	1,176	0,034	1,207	0,977	1,343	3
	VEGF	1,325	0,398	1,319	0,697	1,959	3
12h	EnP	0,560	0,035	0,455	0,450	0,777	3
	EP	0,712	0,004	0,698	0,658	0,780	3
	EXT	1,162	0,528	0,923	0,585	1,978	3
	IFN-γ	2,008	0,096	2,102	1,661	2,259	3
	LPS	0,737	0,051	0,702	0,531	0,980	3
	NE	1,000	0,048	0,913	0,838	1,249	3
	TNF- α	0,826	0,103	1,001	0,456	1,021	3
	VEGF	0,933	0,055	0,914	0,709	1,176	3
24h	EnP	0,716	0,071	0,731	0,444	0,974	3
	EP	0,614	0,073	0,570	0,368	0,903	3
	EXT	0,644	0,001	0,643	0,618	0,672	3
	IFN-γ	1,590	0,705	1,553	0,770	2,447	3
	LPS	0,489	0,023	0,554	0,315	0,597	3
	NE	1,000	0,041	0,986	0,765	1,262	6
	TNF- α	0,244	0,000	0,252	0,220	0,259	3
	VEGF	1,579	0,384	1,742	0,895	2,102	3
48h	EnP	1,274	0,041	1,205	1,116	1,501	3
	EP	1,705	0,039	1,670	1,527	1,918	3
	EXT	2,246	0,062	2,313	1,972	2,454	3
	IFN-γ	0,802	0,386	0,802	0,363	1,241	2
	LPS	0,666	0,015	0,692	0,533	0,771	3
	NE	1,000	0,144	0,959	0,608	1,567	6
	TNF- α	0,839	0,171	1,025	0,364	1,127	3
	VEGF	1,056	0,408	0,710	0,666	1,794	3

*Tabela A15 – Continuação*

<b>Tempo</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>N</b>
72h	EnP	0,105	0,005	0,084	0,044	0,187	3
	EP	0,139	0,003	0,121	0,094	0,203	3
	EXT	0,062	0,000	0,053	0,051	0,082	3
	IFN-γ	0,094	0,002	0,094	0,066	0,123	2
	LPS	0,106	0,011	0,063	0,030	0,224	3
	NE	1,000	0,545	0,708	0,256	2,035	5
	TNF- α	0,023	0,000	0,018	0,017	0,034	3
	VEGF	0,179	0,007	0,138	0,125	0,275	3

*Tabela A16 – Medidas descritivas das observações do experimento de PCR em tempo real, de acordo com com tempo de observação e estímulo aplicado para MyD88*

Tempo	Estímulo	Média	Variância	Mediana	Mínimo	Máximo	N
1h	EnP	1,3596	0,1818	1,5998	0,8673	1,6117	3
	EP	1,4506	0,4099	1,1631	1,0045	2,1842	3
	EXT	1,1687	0,0591	1,2067	0,9089	1,3907	3
	IFN-γ	1,9763	0,7629	1,8291	1,1858	2,9140	3
	LPS	1,8676	0,5786	2,0661	1,0274	2,5093	3
	NE	1,0000	0,0382	0,9032	0,8718	1,2250	3
	TNF- α	1,5490	0,0442	1,5042	1,3647	1,7780	3
	VEGF	1,6345	0,0287	1,6376	1,4637	1,8022	3
3h	EnP	1,1379	0,2610	0,9563	0,7427	1,7148	3
	EP	1,5238	0,1042	1,4054	1,2769	1,8892	3
	EXT	1,3775	0,0659	1,3403	1,1414	1,6507	3
	IFN-γ	1,4998	0,1362	1,4384	1,1654	1,8957	3
	LPS	1,3358	0,1237	1,2630	1,0263	1,7182	3
	NE	1,0000	0,0866	0,8643	0,7980	1,3376	3
	TNF- α	1,4209	0,1357	1,5508	1,0052	1,7068	3
	VEGF	1,5010	0,3050	1,4198	0,9938	2,0894	3
12h	EnP	1,3283	0,5991	1,6778	0,4412	1,8658	3
	EP	0,6231	0,0516	0,6193	0,3978	0,8521	3
	EXT	1,0349	0,1177	0,8949	0,7840	1,4259	3
	IFN-γ	1,0946	0,1165	0,9009	0,8943	1,4887	3
	LPS	2,0690	2,1572	1,3683	1,0819	3,7569	3
	NE	1,0000	0,0709	1,1276	0,6940	1,1783	3
	TNF- α	0,8843	0,1405	0,7831	0,5705	1,2994	3
	VEGF	1,0892	0,1266	0,8934	0,8744	1,5000	3
24h	EnP	0,8447	0,0359	0,8567	0,6496	1,0277	3
	EP	0,8871	0,1846	0,7390	0,5510	1,3711	3
	EXT	0,9828	0,1811	0,9078	0,5997	1,4407	3
	IFN-γ	1,1480	0,0204	1,2032	0,9859	1,2549	3
	LPS	0,4364	0,0150	0,4608	0,3036	0,5448	3
	NE	1,0000	0,0254	1,0378	0,7373	1,1643	6
	TNF- α	0,4873	0,0102	0,4601	0,4030	0,5989	3
	VEGF	0,8093	0,0576	0,8467	0,5527	1,0284	3
48h	EnP	0,5937	0,0013	0,6022	0,5545	0,6245	3
	EP	0,5297	0,0210	0,6105	0,3624	0,6163	3
	EXT	0,9115	0,1172	0,7172	0,7106	1,3068	3
	IFN-γ	0,9889	0,0021	0,9705	0,9553	1,0407	3
	LPS	0,6043	0,0005	0,5970	0,5862	0,6297	3
	NE	1,0000	0,0644	1,0246	0,6359	1,3486	6
	TNF- α	0,7749	0,0795	0,6255	0,5990	1,1001	3
	VEGF	0,9428	0,0200	0,9601	0,7935	1,0748	3

*Tabela A16 – Continuação*

<b>Tempo</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>N</b>
72h	EnP	0,2127	0,0047	0,2127	0,1644	0,2611	2
	EP	0,2808	0,0009	0,2638	0,2625	0,3161	3
	EXT	0,3281	0,0115	0,2730	0,2595	0,4518	3
	IFN-γ	0,5962	0,0044	0,5962	0,5492	0,6432	2
	LPS	0,2697	0,0012	0,2869	0,2299	0,2923	3
	NE	1,0000	0,2352	0,8044	0,5293	1,6663	5
	TNF- α	0,2135	0,0012	0,1949	0,1917	0,2539	3
	VEGF	0,4233	0,0093	0,3919	0,3462	0,5317	3

*Tabela A17 – Medidas descritivas das observações do experimento de imunoistoquímica, de acordo com tipo de receptor Toll e categoria do camundongo*

<b>Toll</b>	<b>Camundongo</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>N</b>
2	HP	0,393	0,046	0,417	0,046	0,907	72
	LPA/SDRA	0,416	0,031	0,427	0,064	0,715	60
	NI	0,260	0,016	0,214	0,134	0,580	24
4	HP	0,481	0,013	0,451	0,275	0,687	60
	LPA/SDRA	0,604	0,032	0,702	0,280	0,845	60
	NI	0,559	0,004	0,563	0,381	0,643	12
9	HP	0,677	0,017	0,691	0,216	0,862	71
	LPA/SDRA	0,724	0,007	0,733	0,498	0,867	72
	NI	0,610	0,016	0,612	0,207	0,799	24

## **APÊNDICE B - GRÁFICOS**

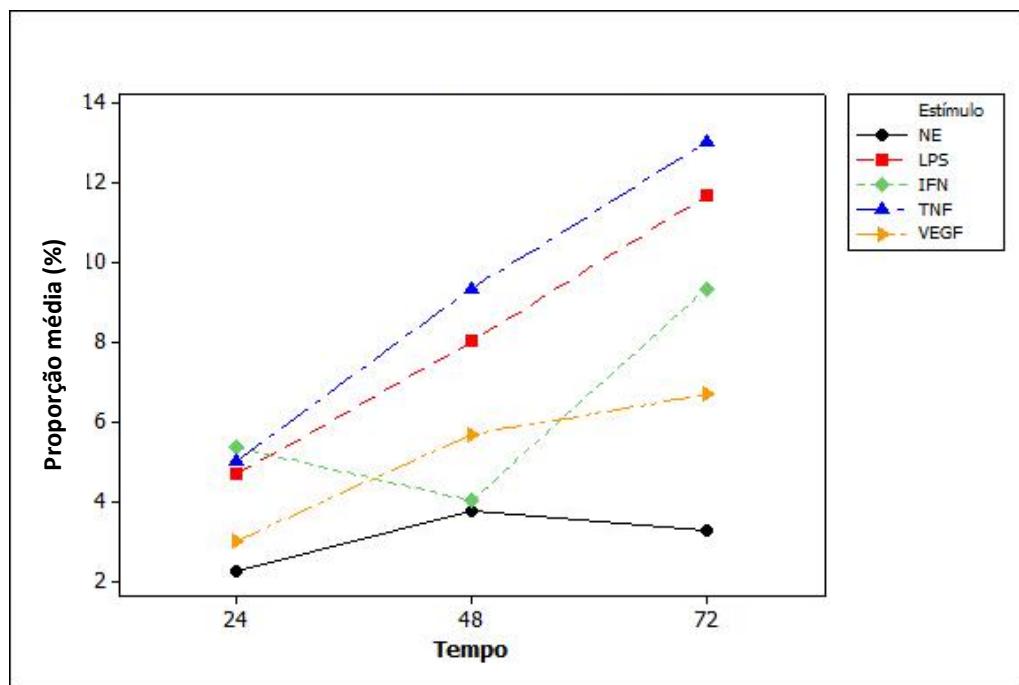


Gráfico B1 – Gráfico de perfis de proporções médias (%) observadas para o experimento LO8 de Adesão

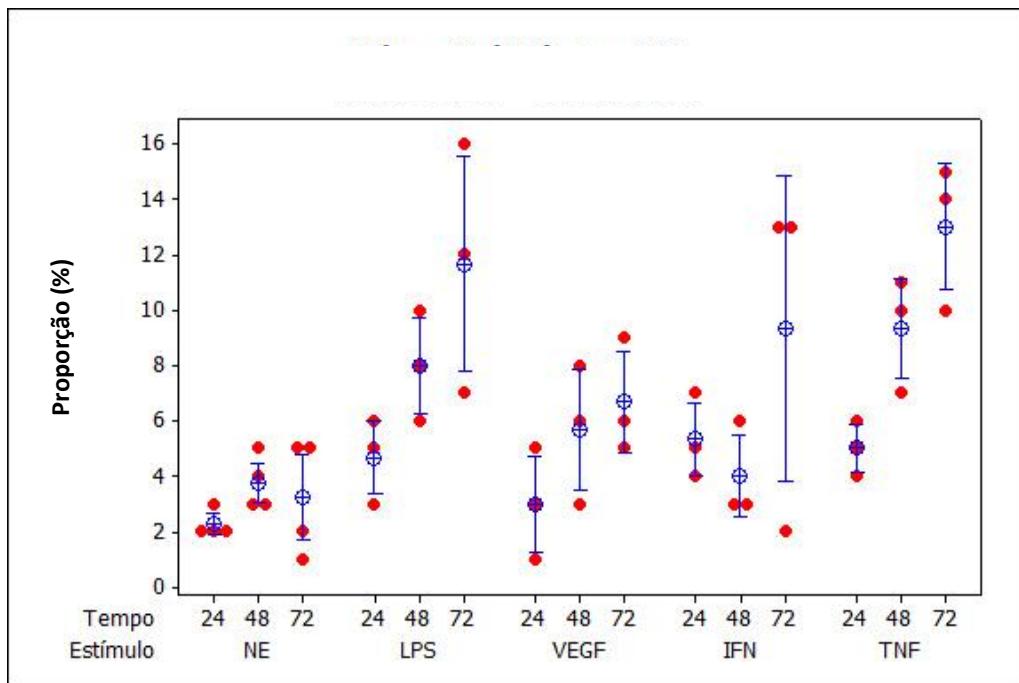


Gráfico B2 – Dotplot de proporções médias observadas (%) para o experimento LO8 de Adesão – Com intervalos para a média = média observada  $\pm 1,5 \times$  erro-padrão

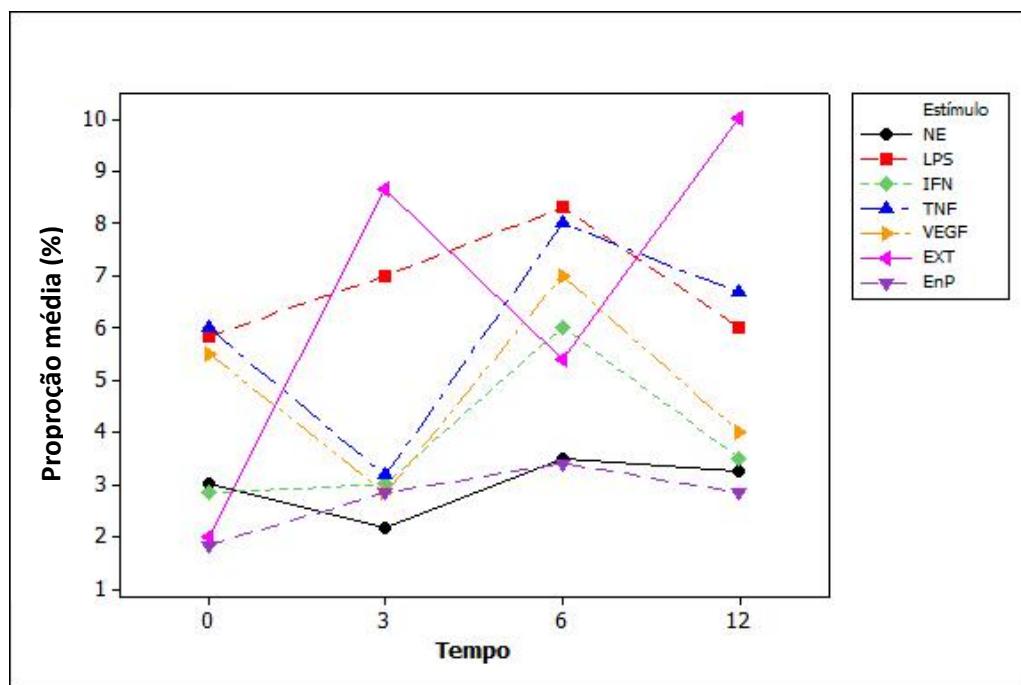


Gráfico B3 – Gráfico de perfis de proporções médias (%) observadas para o experimento LO11-14-25 de Adesão

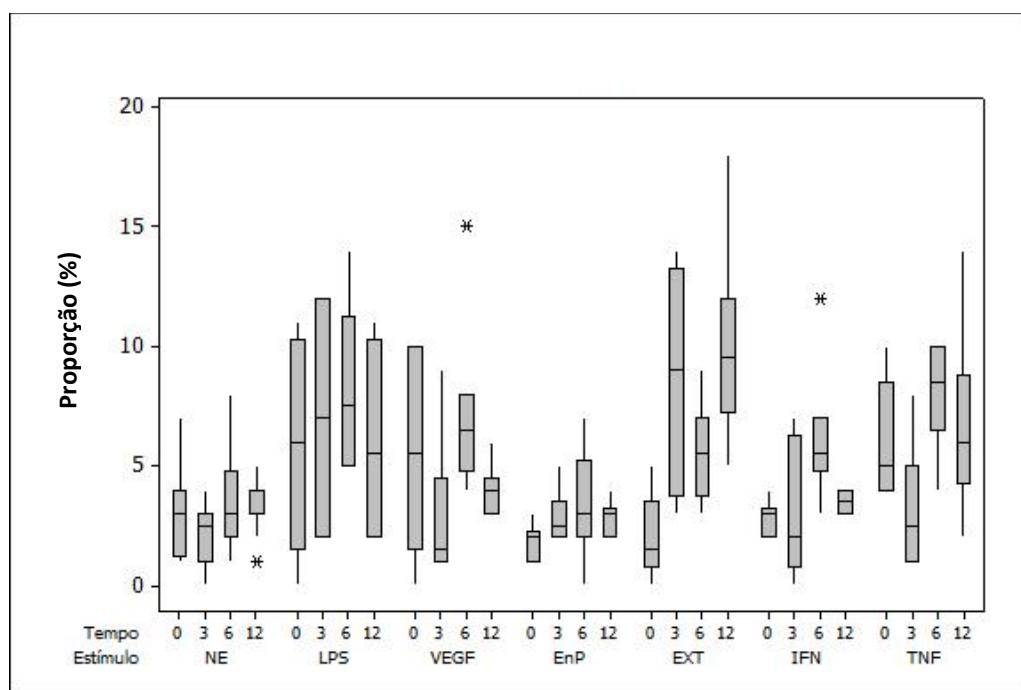


Gráfico B4 – Boxplot dos valores de proporções médias (%) observados para o experimento LO11-14-25 de Adesão

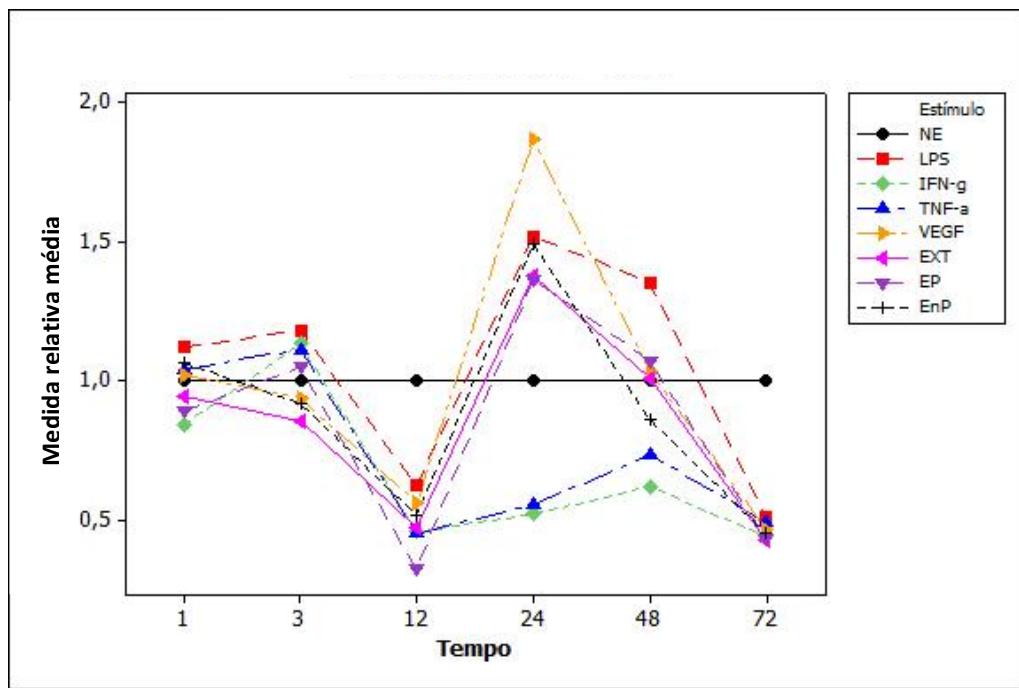


Gráfico B5 – Gráfico de perfis de médias para as moléculas de CD36 no experimento de PCR em tempo real – Medidas relativas ao controle

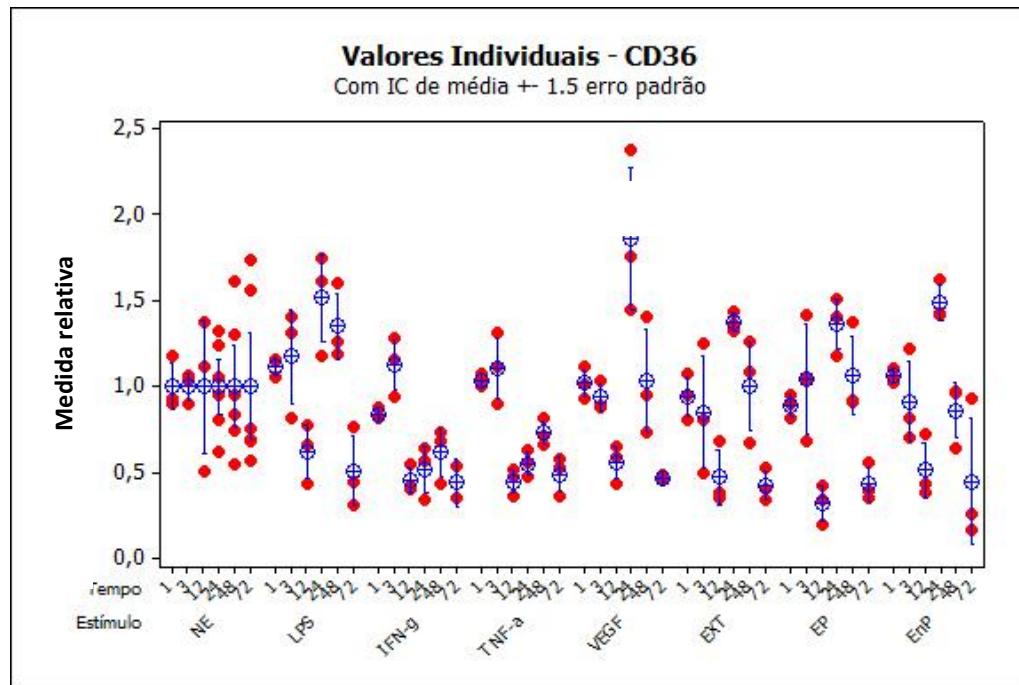


Gráfico B6 – Dotplot para as moléculas de CD36 no experimento de PCR em tempo real – Medidas relativas ao controle – Com intervalos para a média = média observada  $\pm 1,5 \times$  erro-padrão

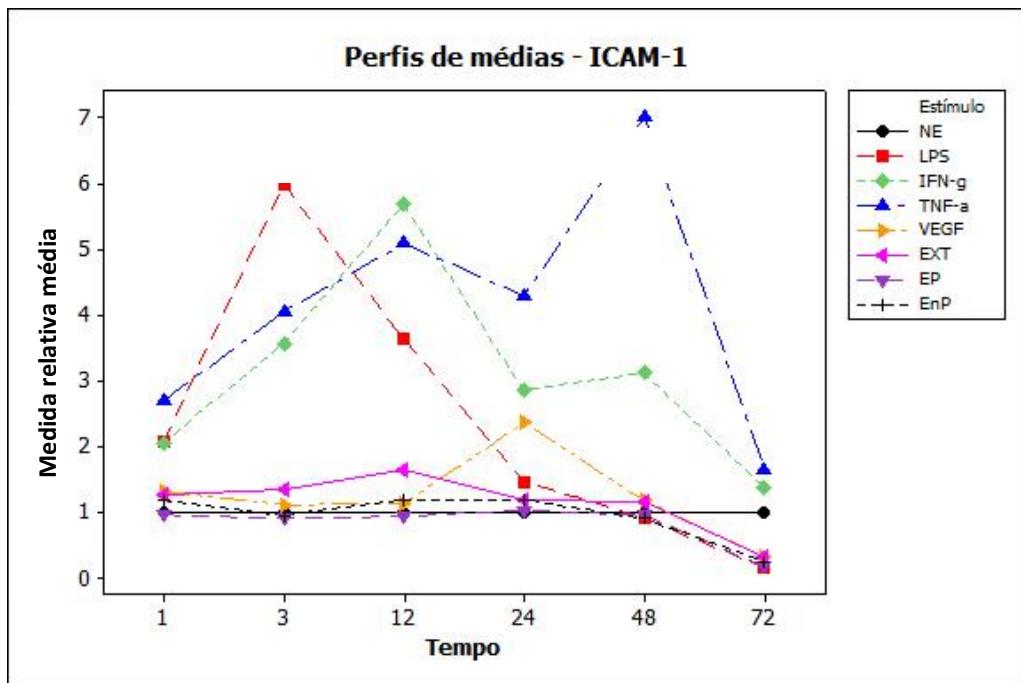


Gráfico B7 – Gráfico de perfis de médias para as moléculas de ICAM-1 no experimento de PCR em tempo real – Medidas relativas ao controle

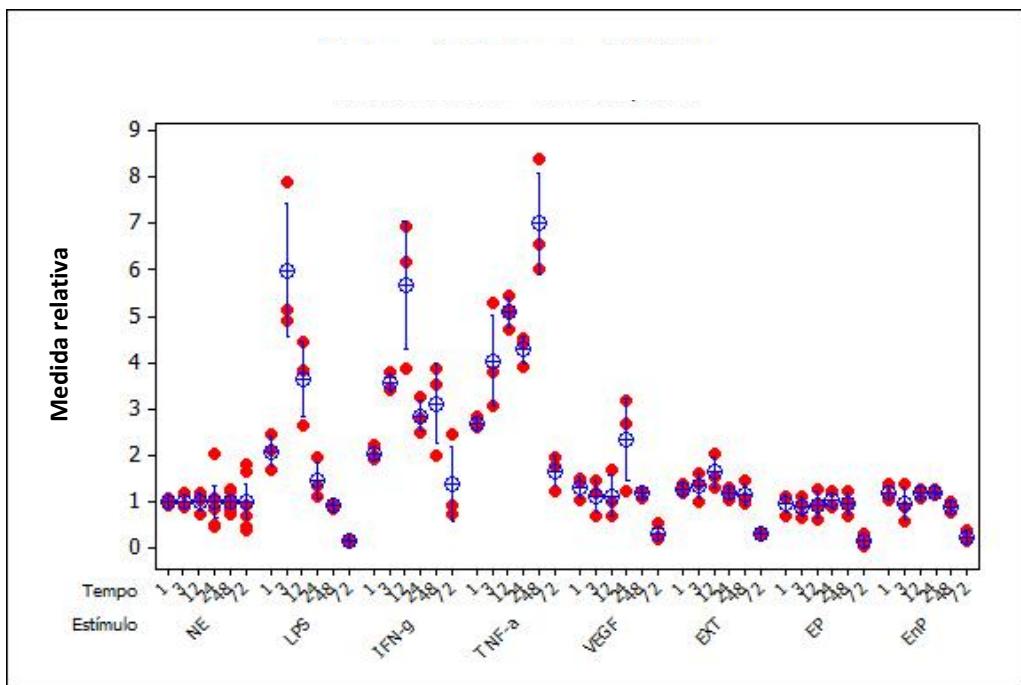


Gráfico B8 – Dotplot para as moléculas de ICAM-1 no experimento de PCR em tempo real – Medidas relativas ao controle – Com intervalos para a média = média observada  $\pm$  1,5\*erro-padrão

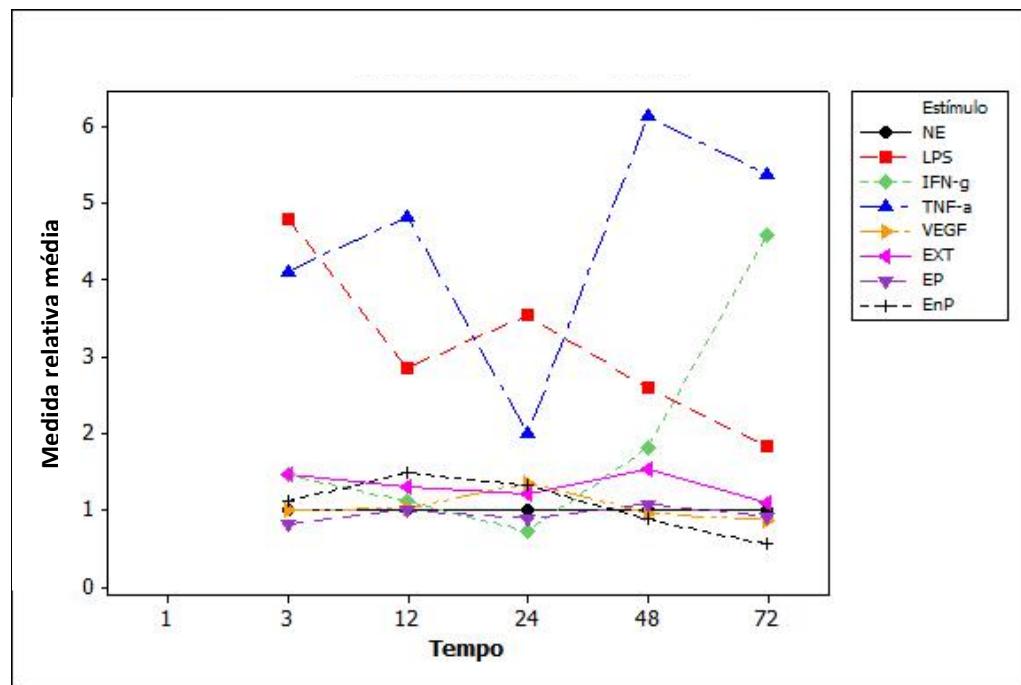


Gráfico B9 – Gráfico de perfis de médias para as moléculas de VCAM no experimento de PCR em tempo real – Medidas relativas ao controle

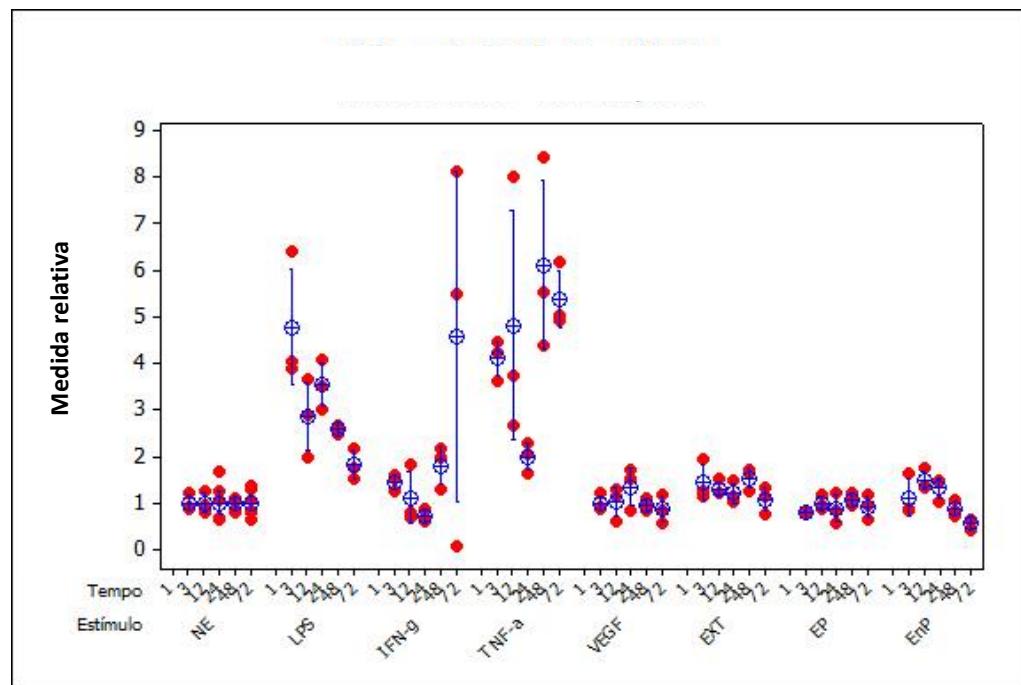
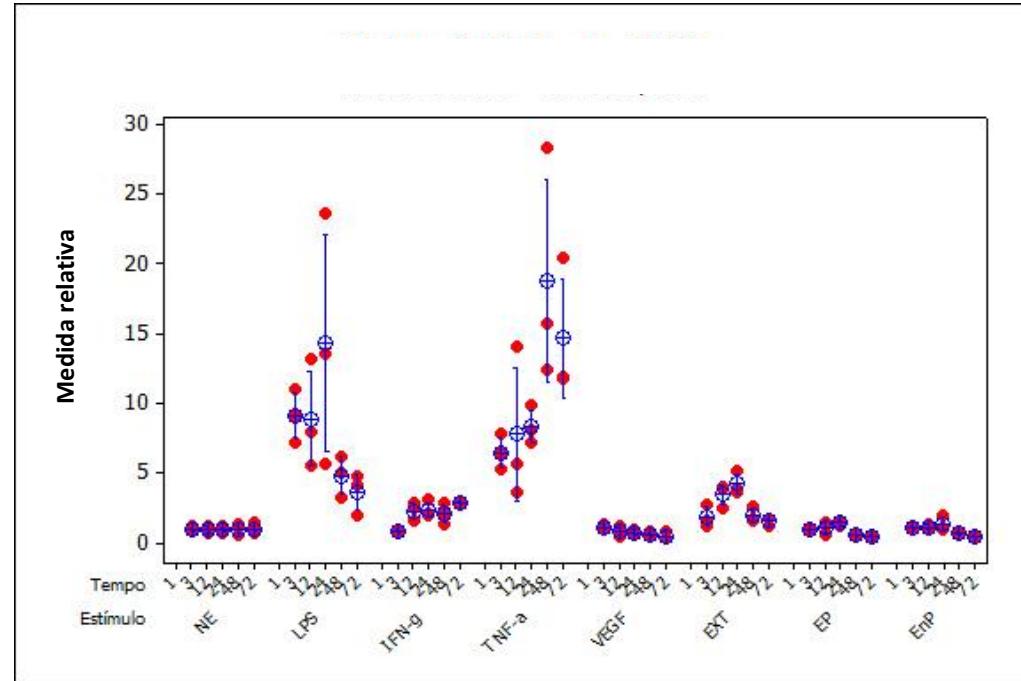
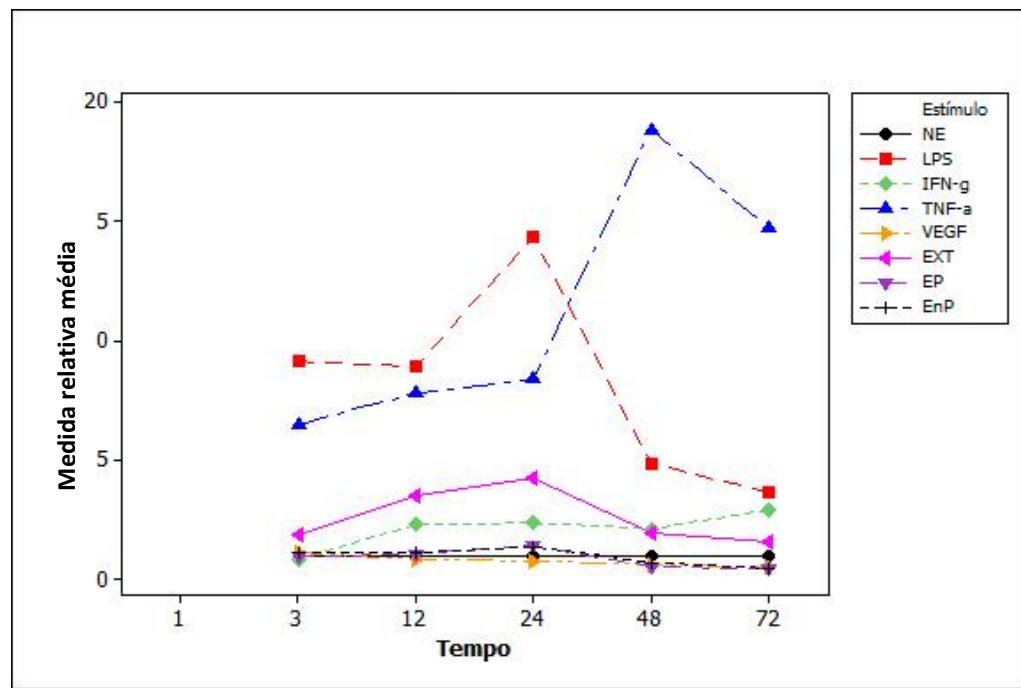


Gráfico B10 – Dotplot para as moléculas de VCAM no experimento de PCR em tempo real – Medidas relativas ao controle – Com intervalos para a média = média observada  $\pm$  1,5\*erro-padrão



*Gráfico B12 – Dotplot para as moléculas de TLR2 no experimento de PCR em tempo real – Medidas relativas ao controle – Com intervalos para a média = média observada  $\pm$  1,5\*erro-padrão*

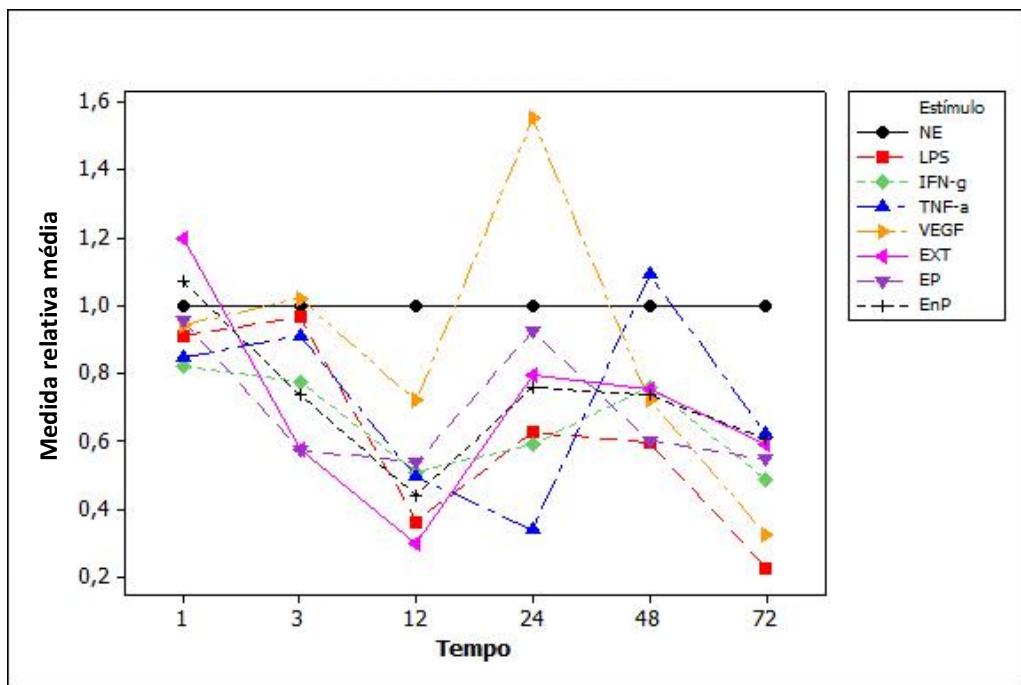


Gráfico B13 – Gráfico de perfis de médias para as moléculas de TLR4 no experimento de PCR em tempo real – Medidas relativas ao controle

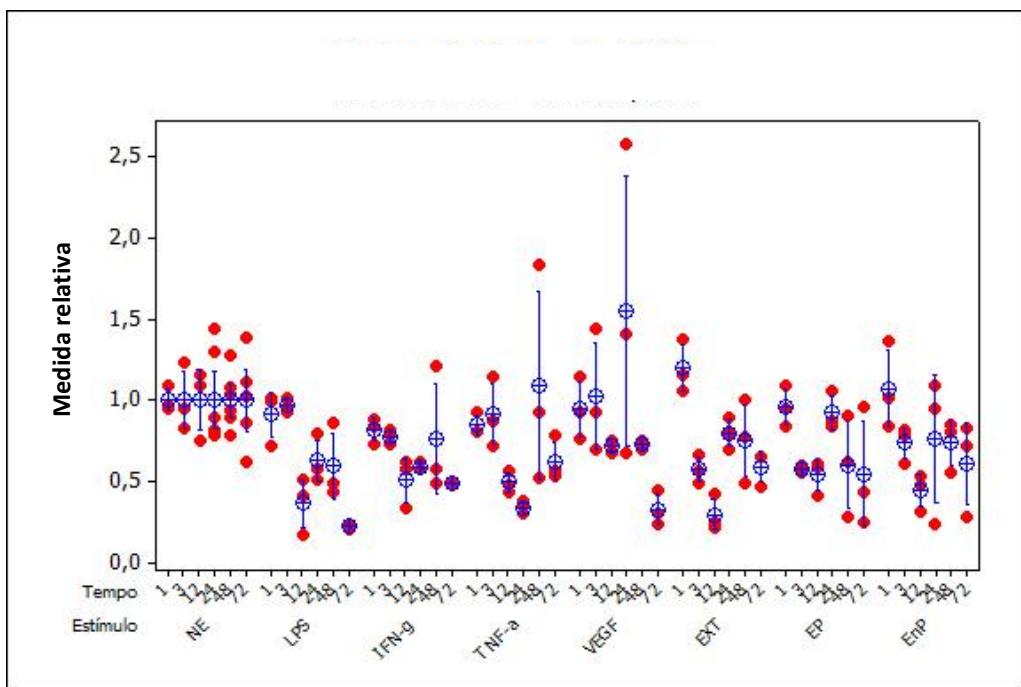


Gráfico B14 – Dotplot para as moléculas de TLR4 no experimento de PCR em tempo real – Medidas relativas ao controle – Com intervalos para a média = média observada  $\pm$  1,5\*erro-padrão

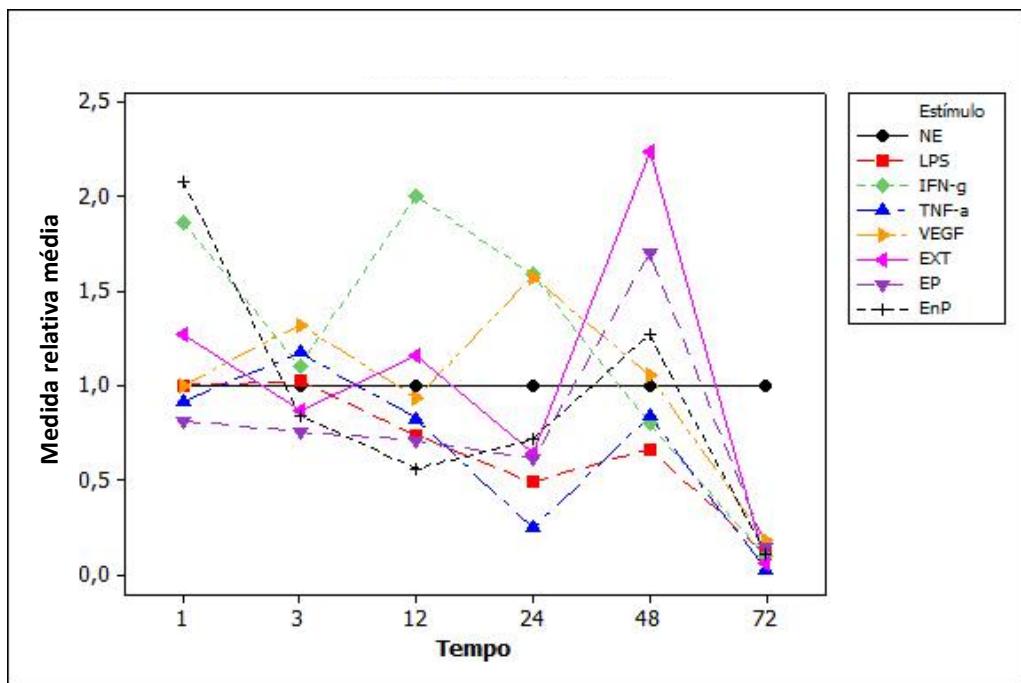


Gráfico B15 – Gráfico de perfis de médias para as moléculas de TLR9 no experimento de PCR em tempo real – Medidas relativas ao controle

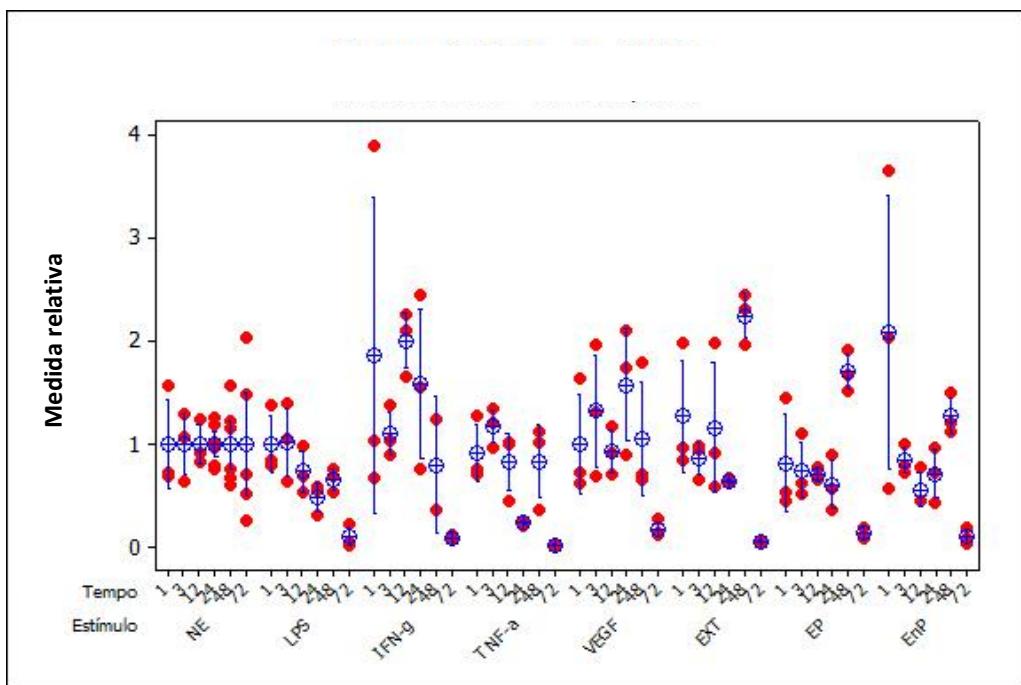


Gráfico B16 – Dotplot para as moléculas de TLR9 no experimento de PCR em tempo real – Medidas relativas ao controle – Com intervalos para a média = média observada  $\pm$  1,5\*erro-padrão

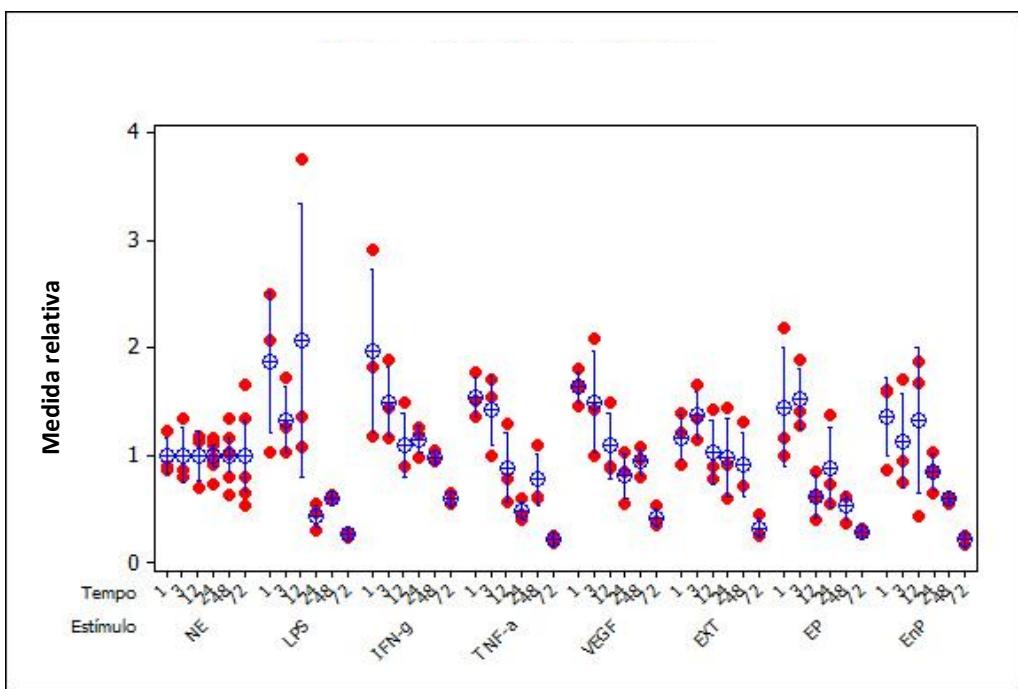
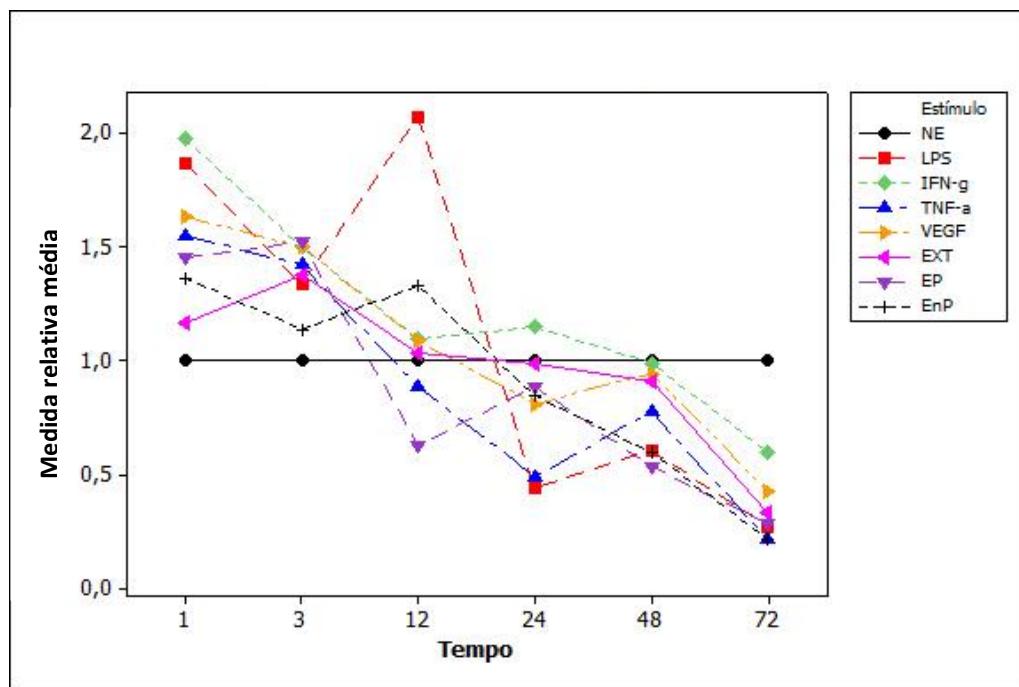
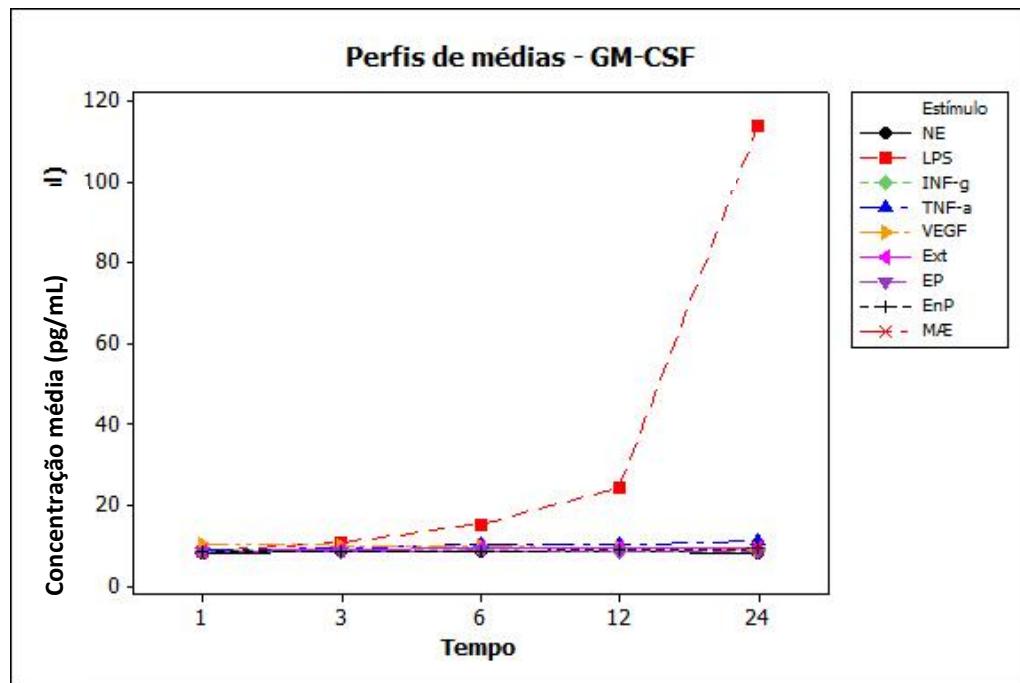
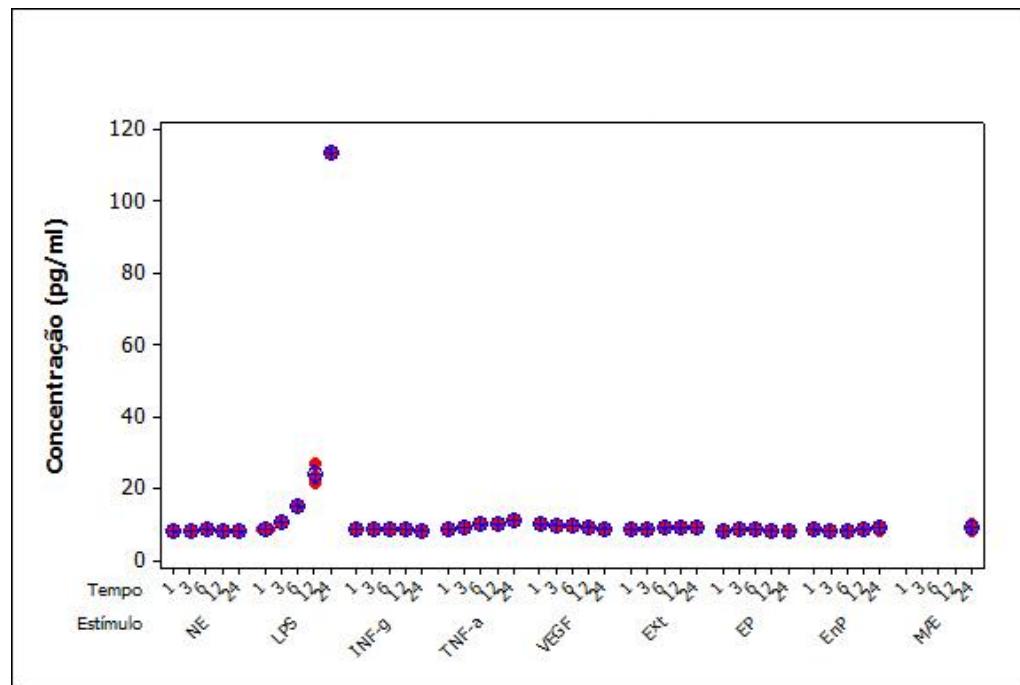


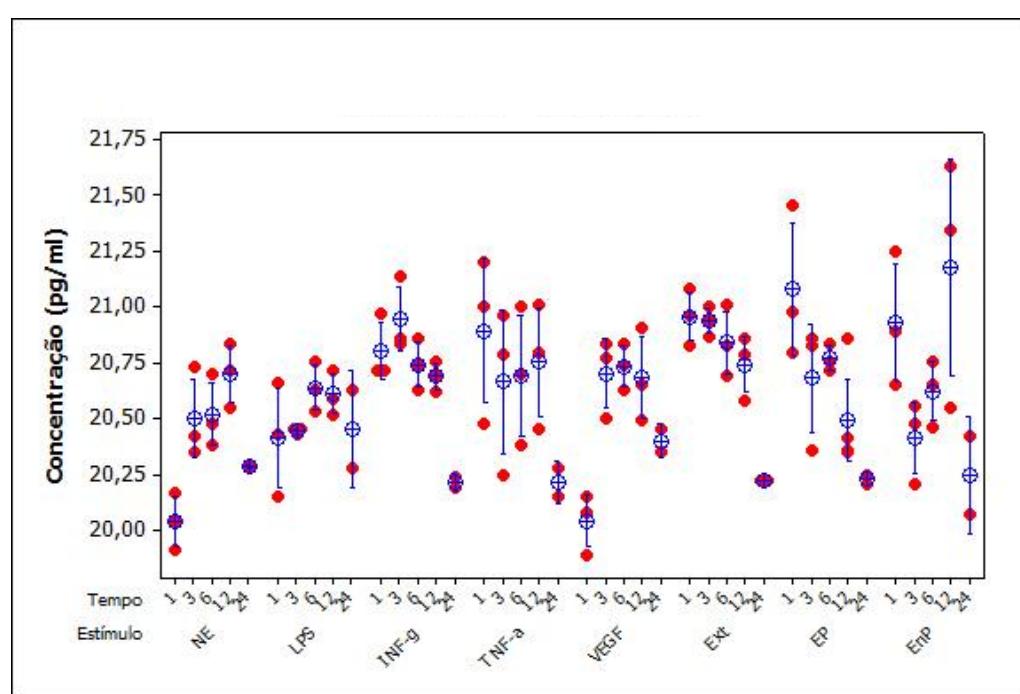
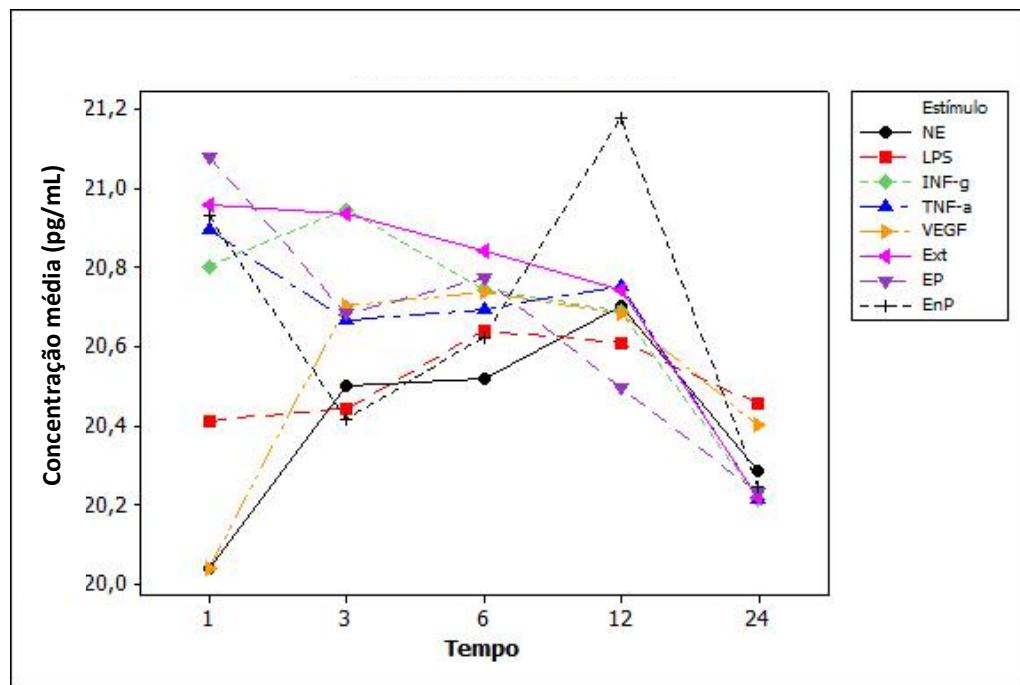
Gráfico B18 – Dotplot para as moléculas de MyD88 no experimento de PCR em tempo real – Medidas relativas ao controle – Com intervalos para a média = média observada  $\pm$  1,5\*erro-padrão



*Gráfico B19 – Gráfico de perfis de médias de concentração para as secreções GM-CSF no experimento de CBA*



*Gráfico B20 – Dotplot de concentração para as secreções GM-CSF no experimento de CBA – Com intervalos para a média = média observada  $\pm$  1,5\*erro-padrão*



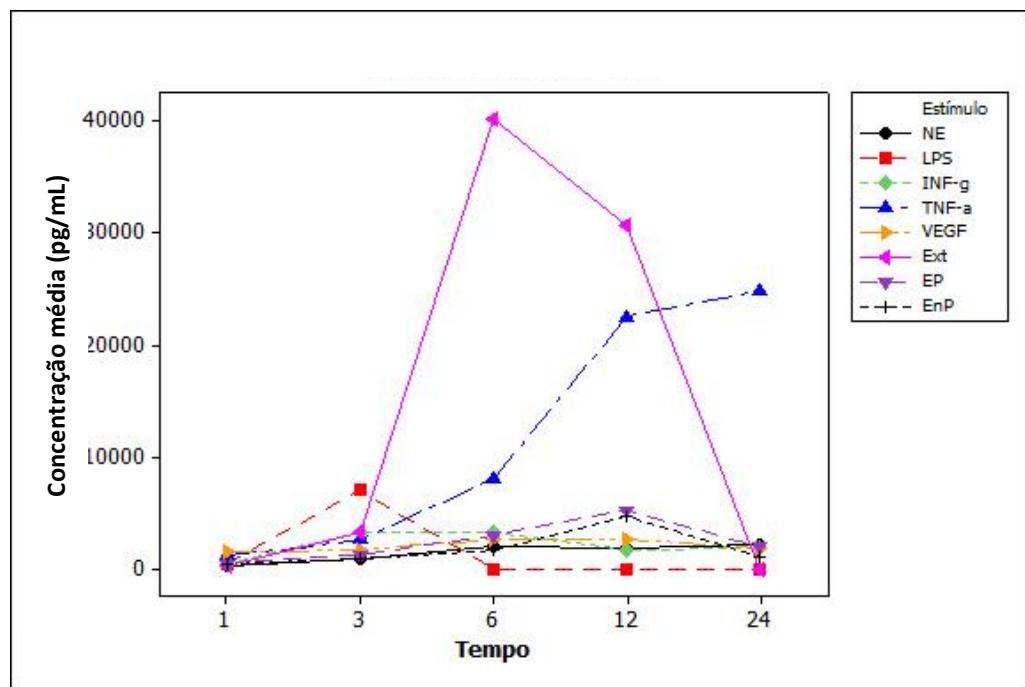


Gráfico B23 – Gráfico de perfis de médias de concentração para as secreções IL6 no experimento de CBA

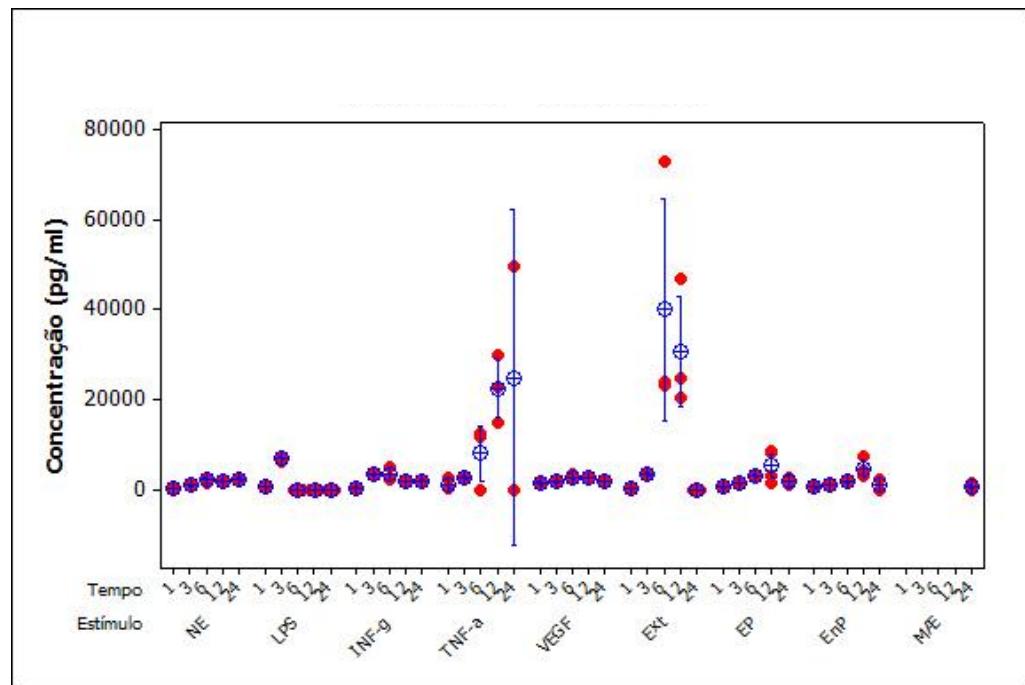


Gráfico B24 – Dotplot de concentração para as secreções IL6 no experimento de CBA – Com intervalos para a média = média observada  $\pm$  1,5\*erro-padrão

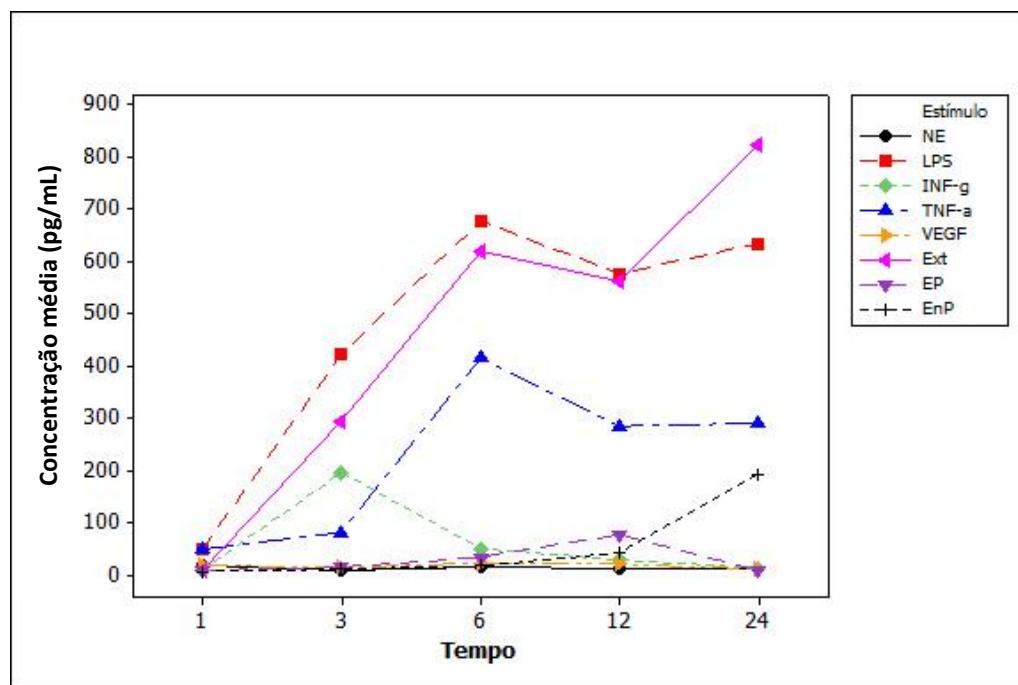


Gráfico B25 – Gráfico de perfis de médias de concentração para as secreções KC no experimento de CBA

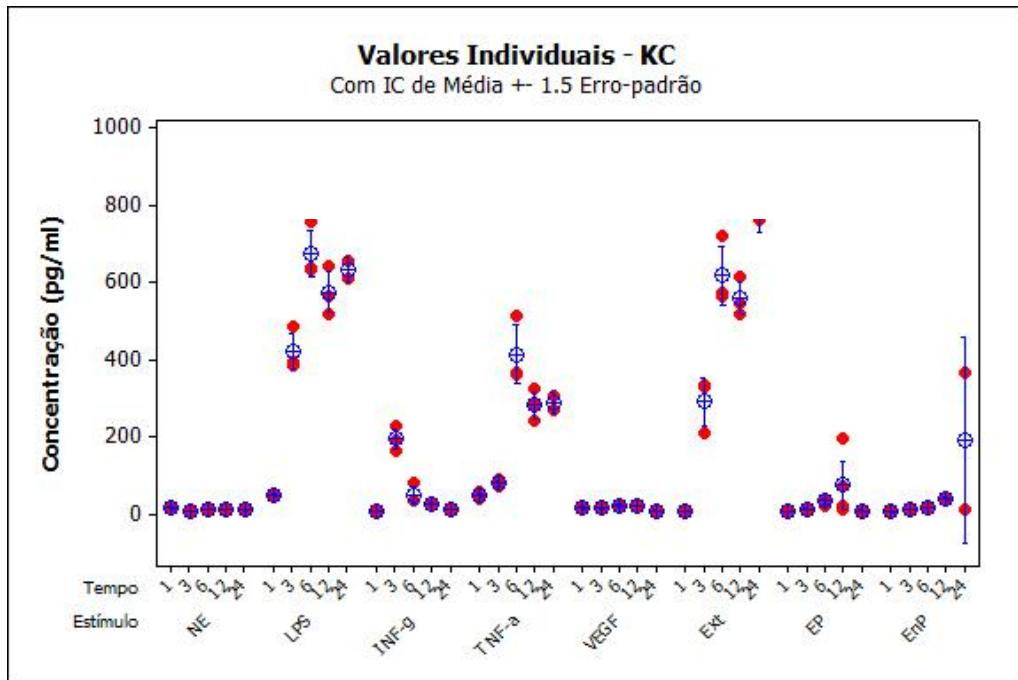


Gráfico B26 – Dotplot de concentração para as secreções KC no experimento de CBA – Com intervalos para a média = média observada  $\pm$  1,5\*erro-padrão

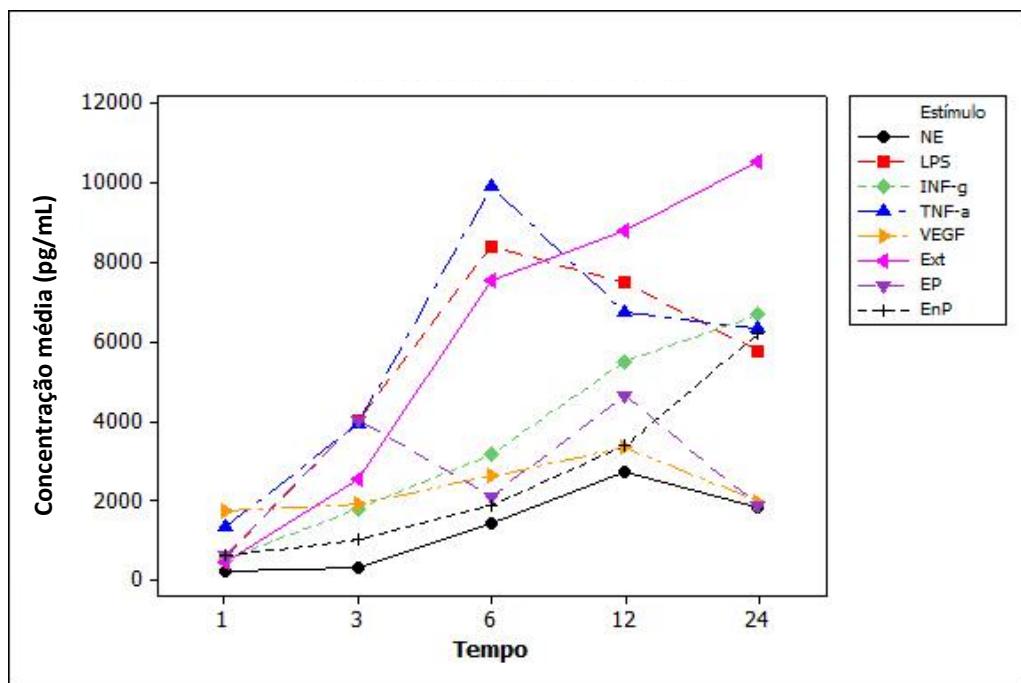


Gráfico B27 – Gráfico de perfis de médias de concentração para as secreções MCP no experimento de CBA

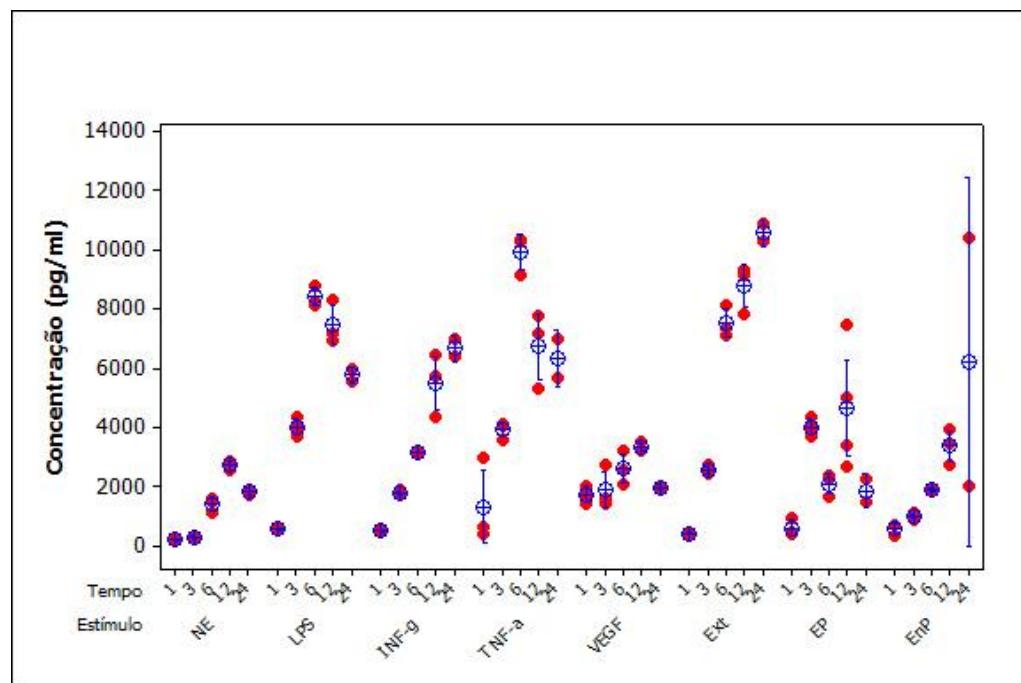


Gráfico B28 – Dotplot de concentração para as secreções MCP no experimento de CBA – Com intervalos para a média = média observada  $\pm$  1,5\*erro-padrão

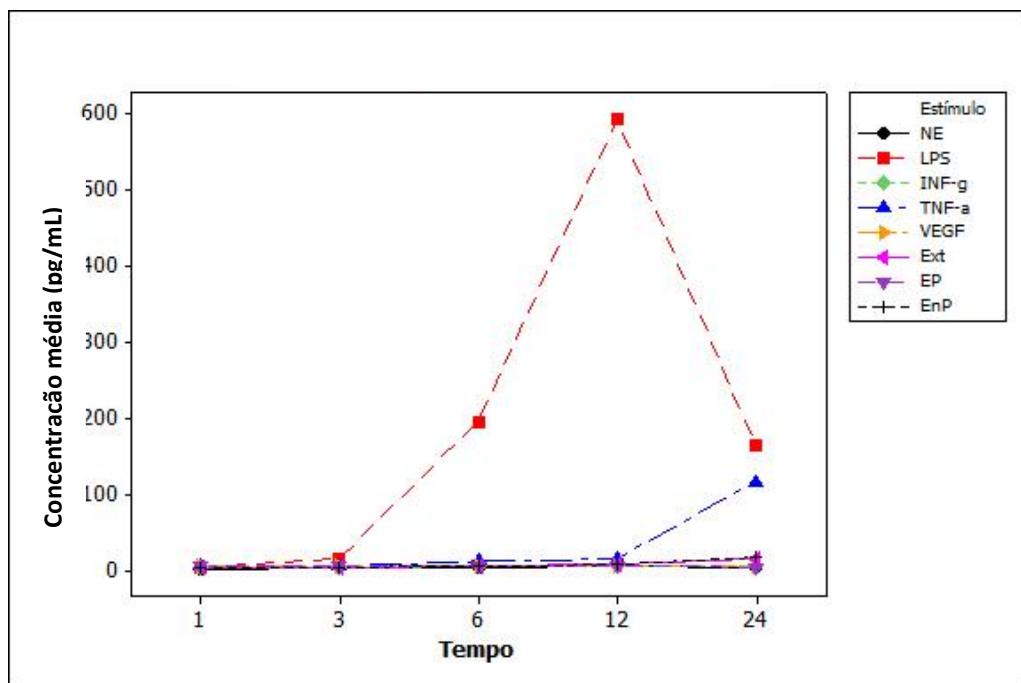


Gráfico B29 – Gráfico de perfis de médias de concentração para as secreções RANTES no experimento de CBA

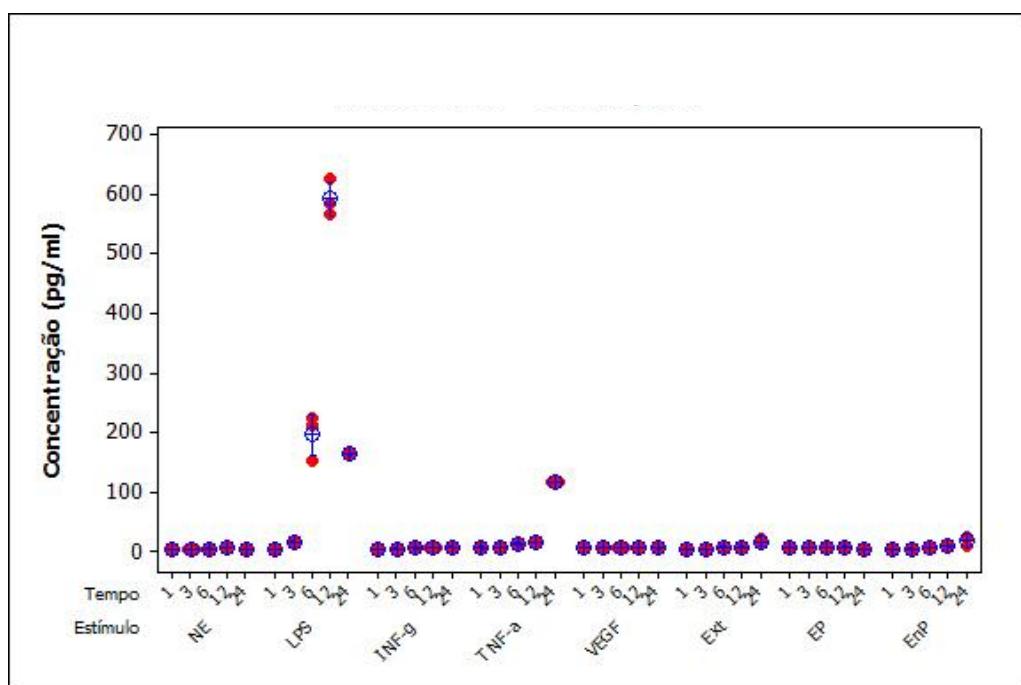
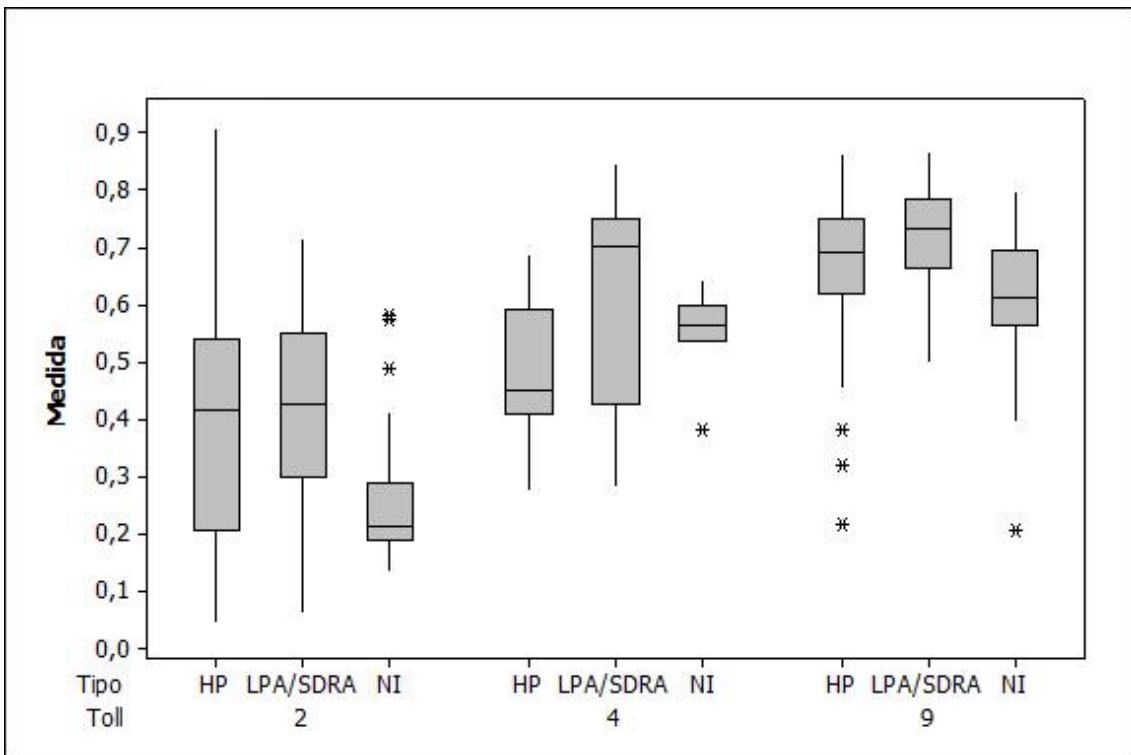
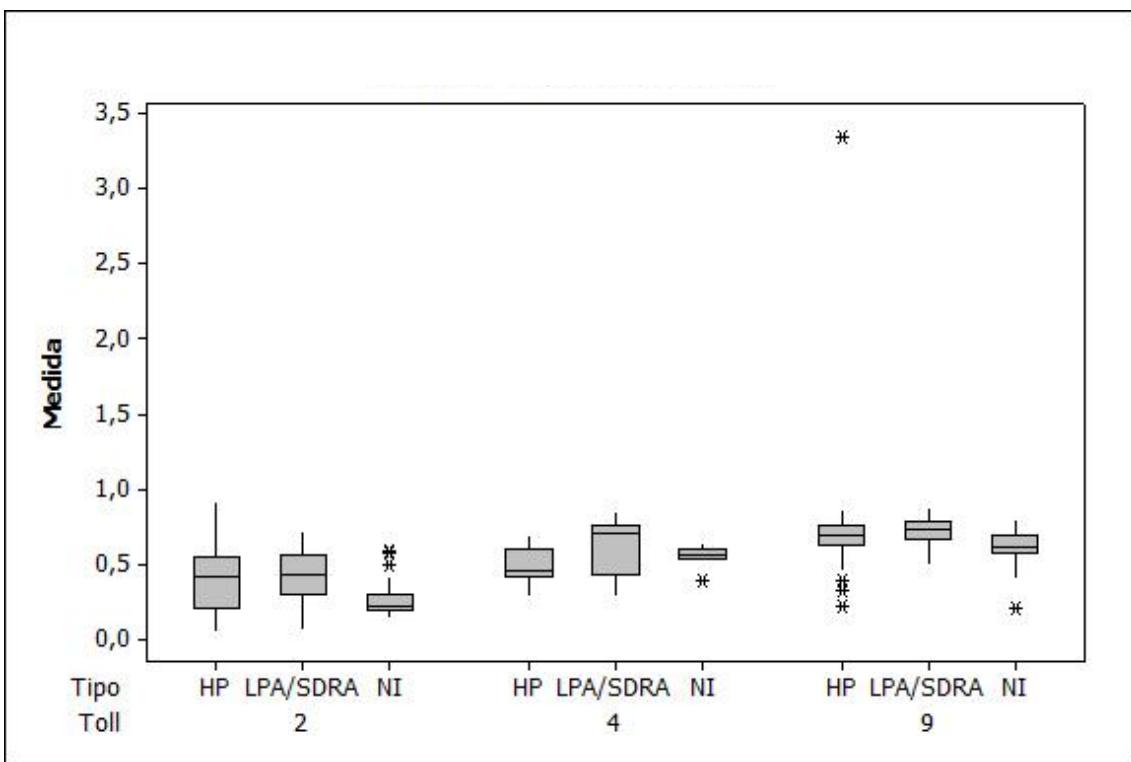


Gráfico B30 – Dotplot de concentração para as secreções RANTES no experimento de CBA – Com intervalos para a média = média observada  $\pm$  1,5\*erro-padrão



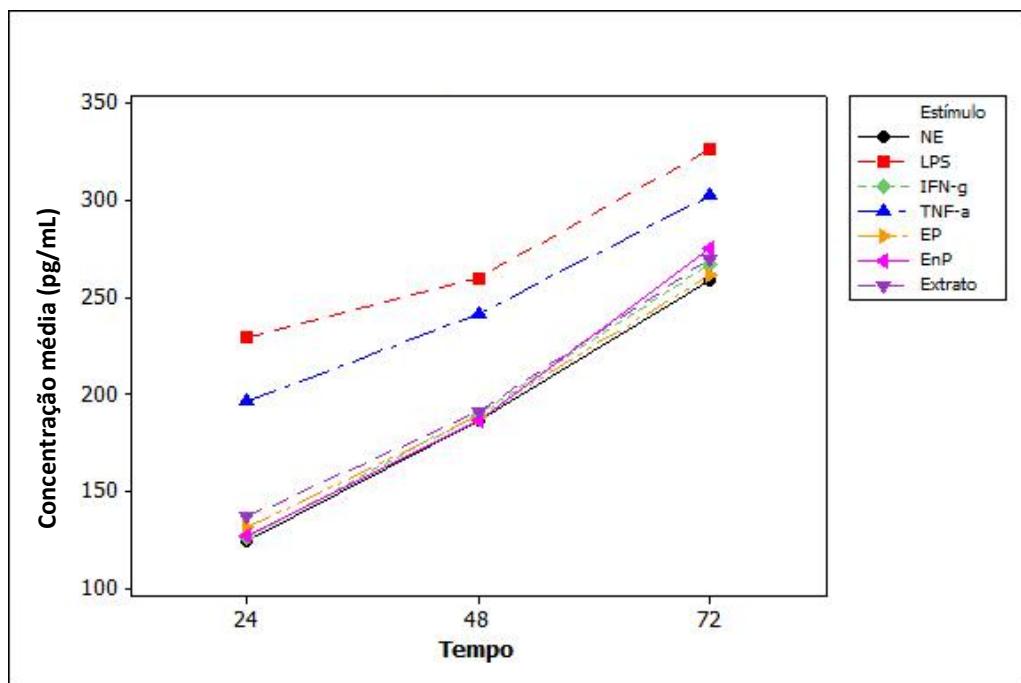
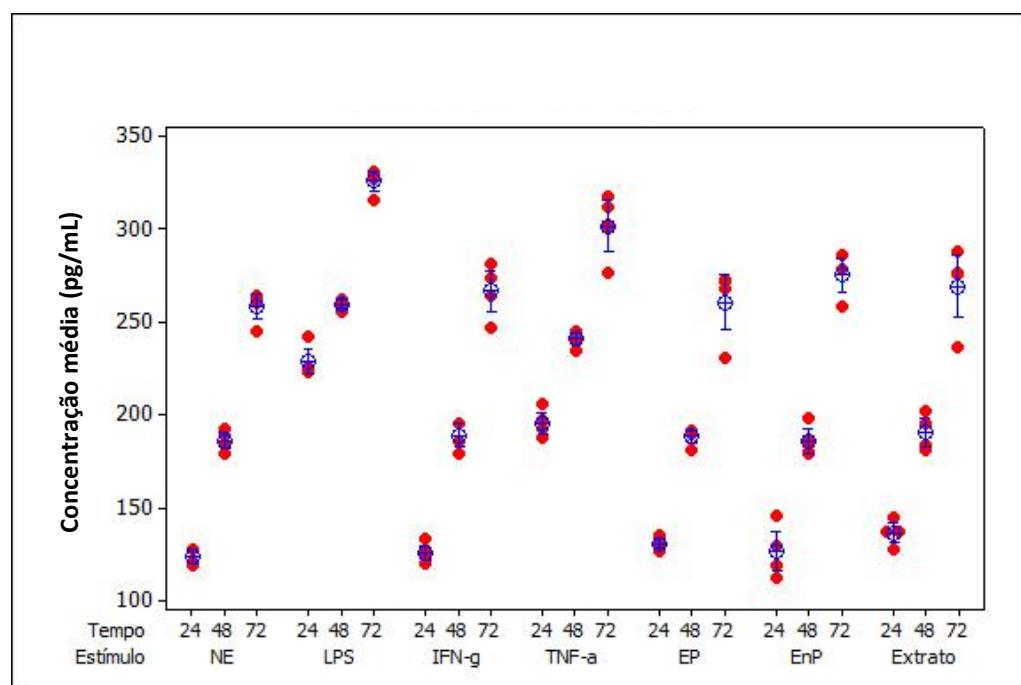


Gráfico B33 – Gráfico de perfis de médias de concentração para o experimento de expressão de VEGF



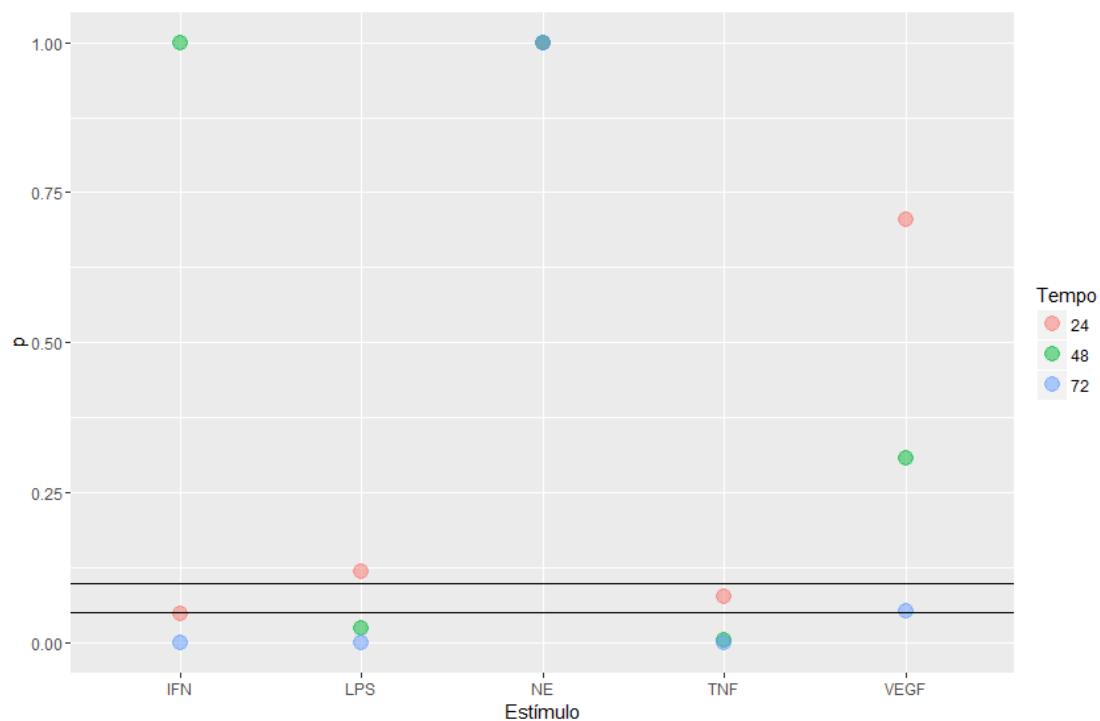


Gráfico B35 – valores-p para os testes de qui-quadrado de homogeneidade de cada estímulo em cada tempo versus controle (NE) para o experimento LO08 de adesão – com linhas representando os níveis 5% e 10%

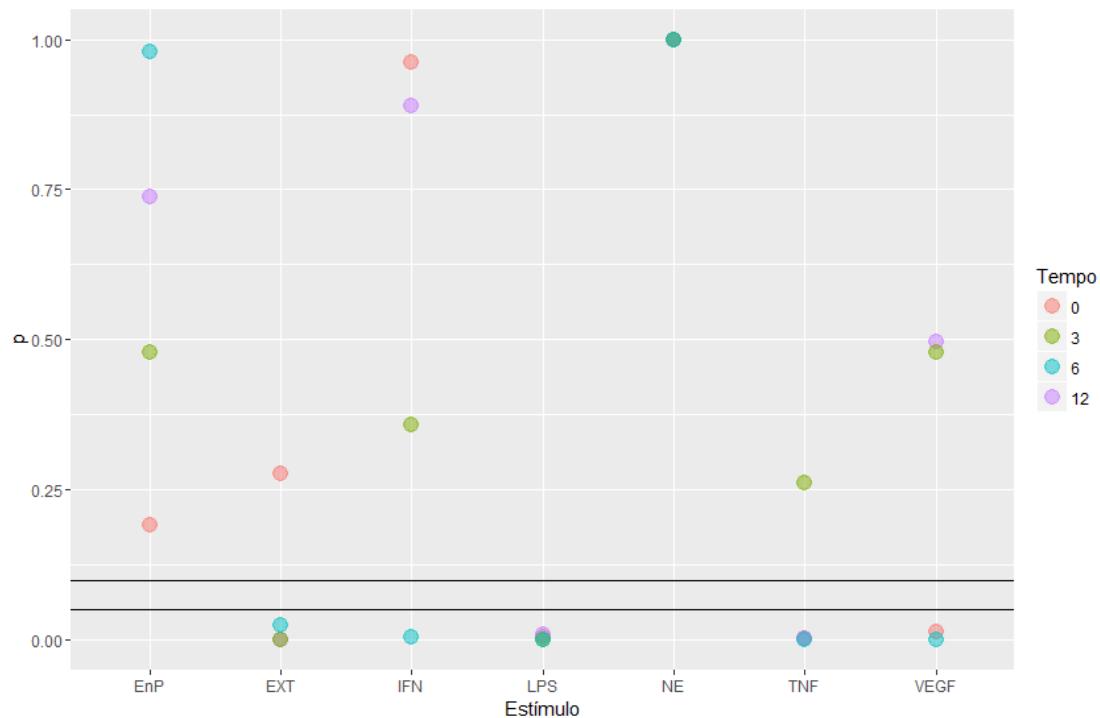


Gráfico B36 – valores-p para os testes de qui-quadrado de homogeneidade de cada estímulo em cada tempo versus controle (NE) para o experimento LO11-14-25 de adesão – com linhas representando os níveis 5% e 10%

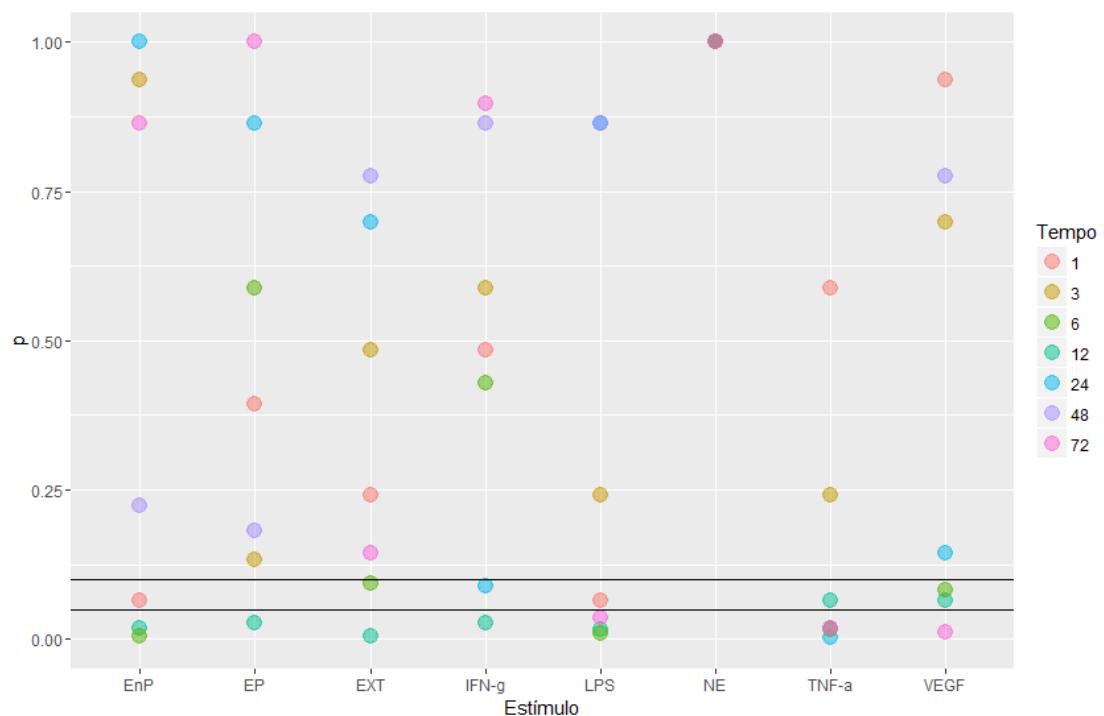


Gráfico B37 – valores-p para os testes de Mann-Whitney de cada estímulo em cada tempo versus controle (NE) para o experimento de quantificação de CD36 por PCR em tempo real – com linhas representando os níveis 5% e 10%

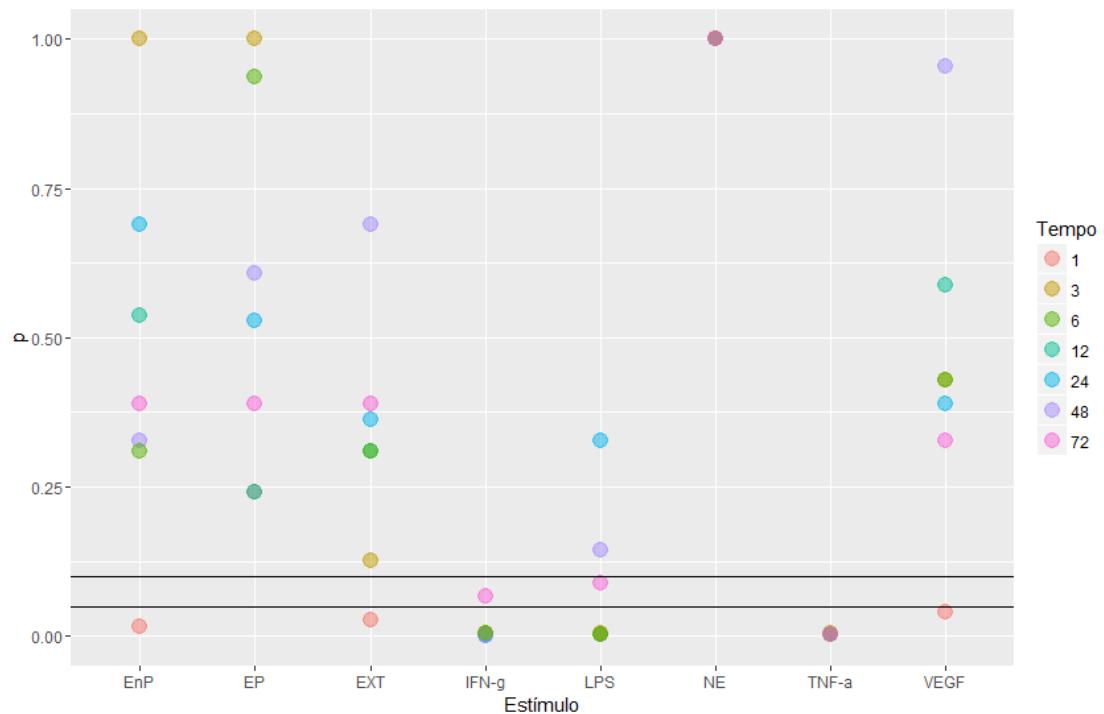


Gráfico B38 – valores-p para os testes de Mann-Whitney de cada estímulo em cada tempo versus controle (NE) para o experimento de quantificação de ICAM-1 por PCR em tempo real – com linhas representando os níveis 5% e 10%

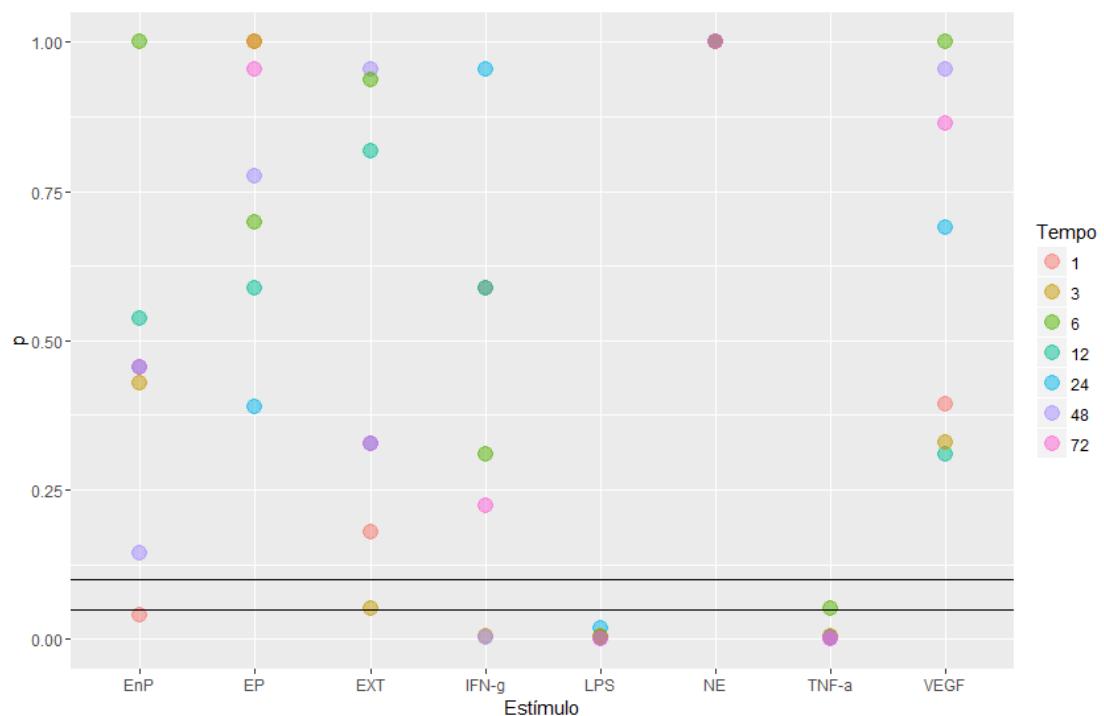


Gráfico B39 – valores-p para os testes de Mann-Whitney de cada estímulo em cada tempo versus controle (NE) para o experimento de quantificação de VCAM por PCR em tempo real – com linhas representando os níveis 5% e 10%

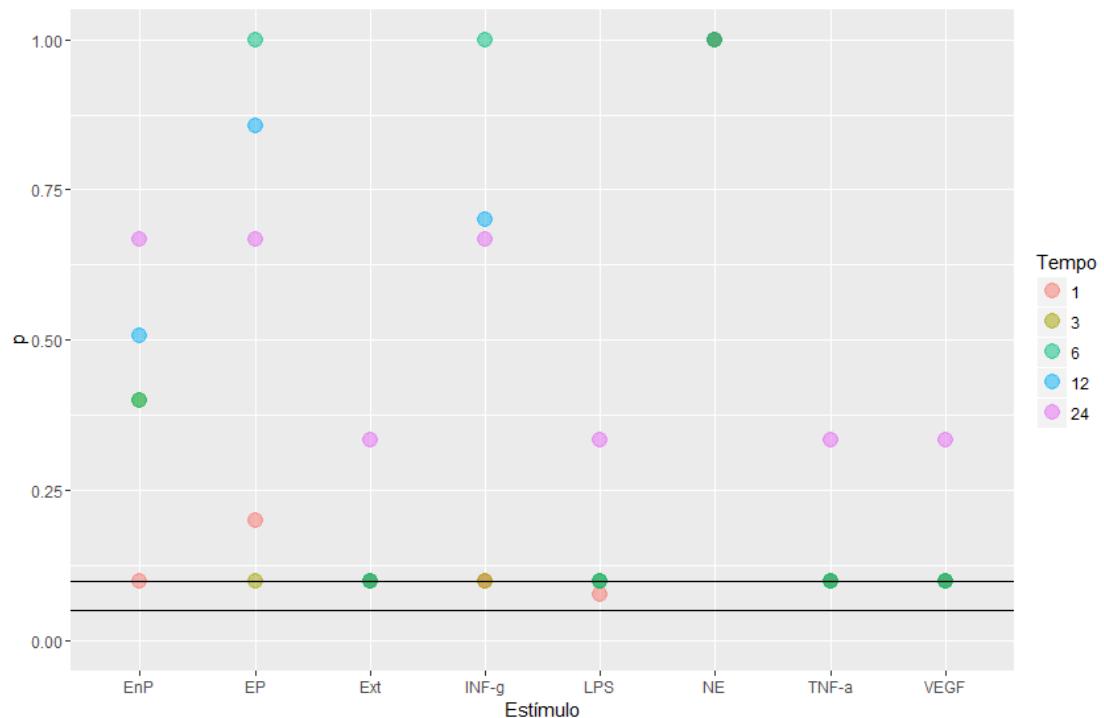


Gráfico B40 – valores-p para os testes de Mann-Whitney de cada estímulo em cada tempo versus controle (NE) para o experimento de quantificação de GM-CSF por CBA – com linhas representando os níveis 5% e 10%

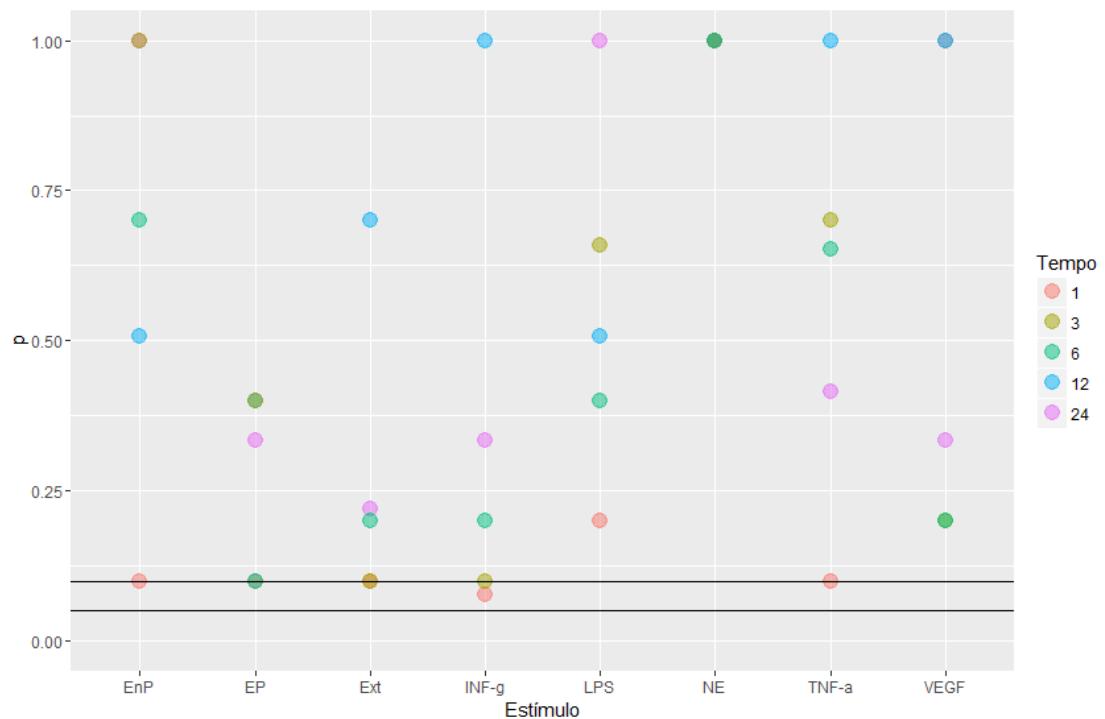


Gráfico B41 – valores-p para os testes de Mann-Whitney de cada estímulo em cada tempo versus controle (NE) para o experimento de quantificação de IL1-B por CBA – com linhas representando os níveis 5% e 10%

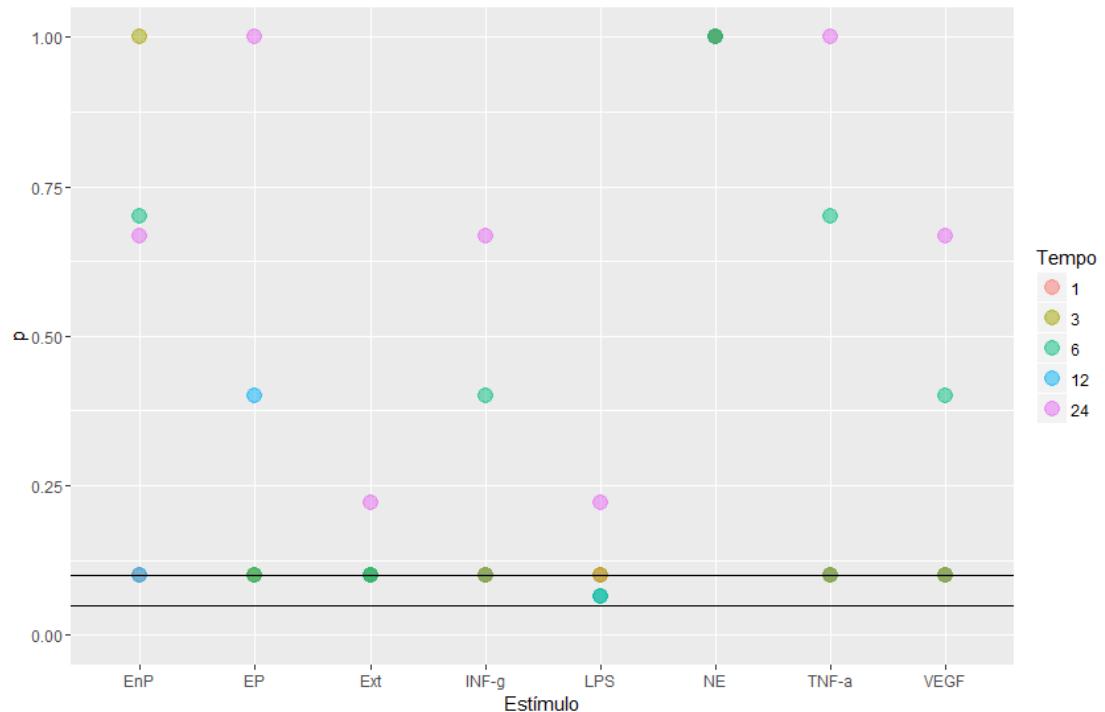


Gráfico B42 – valores-p para os testes de Mann-Whitney de cada estímulo em cada tempo versus controle (NE) para o experimento de quantificação de IL6. por CBA – com linhas representando os níveis 5% e 10%

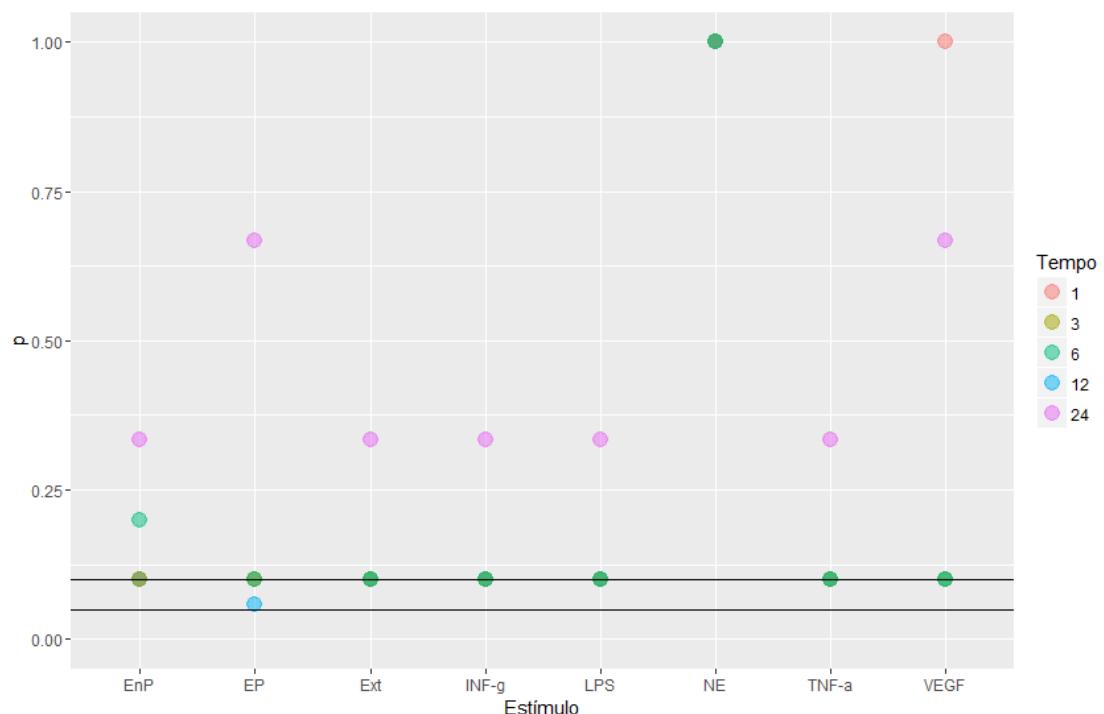


Gráfico B43 – valores-p para os testes de Mann-Whitney de cada estímulo em cada tempo versus controle (NE) para o experimento de quantificação de KC por CBA – com linhas representando os níveis 5% e 10%

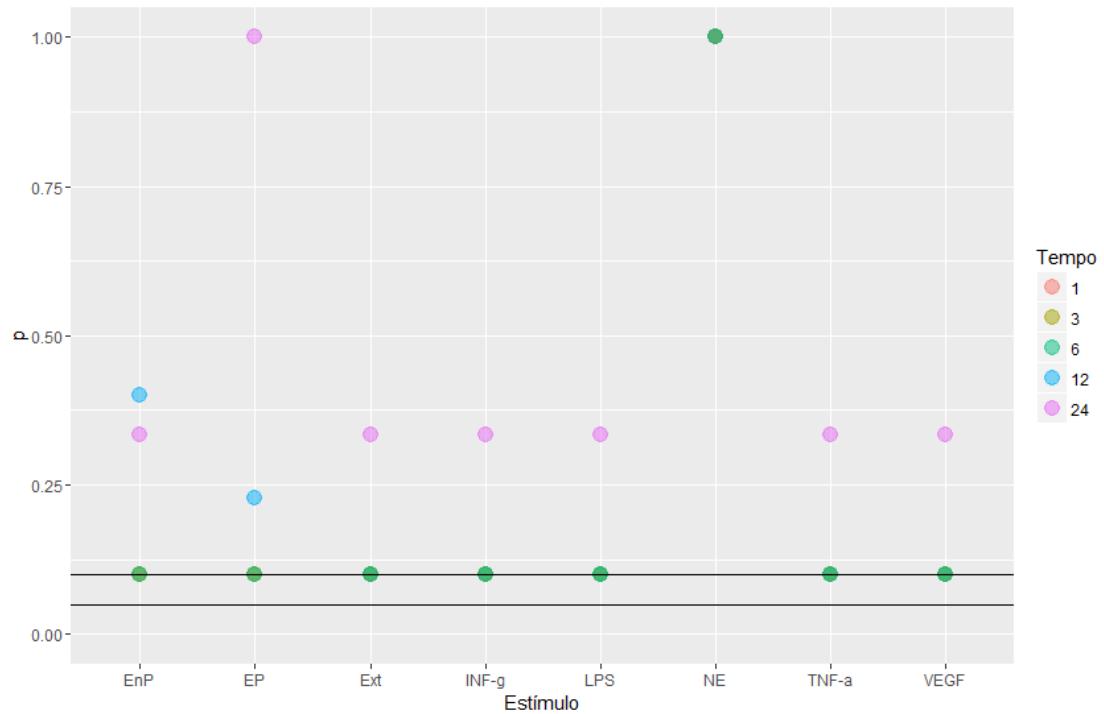


Gráfico B44 – valores-p para os testes de Mann-Whitney de cada estímulo em cada tempo versus controle (NE) para o experimento de quantificação de MCP por CBA – com linhas representando os níveis 5% e 10%

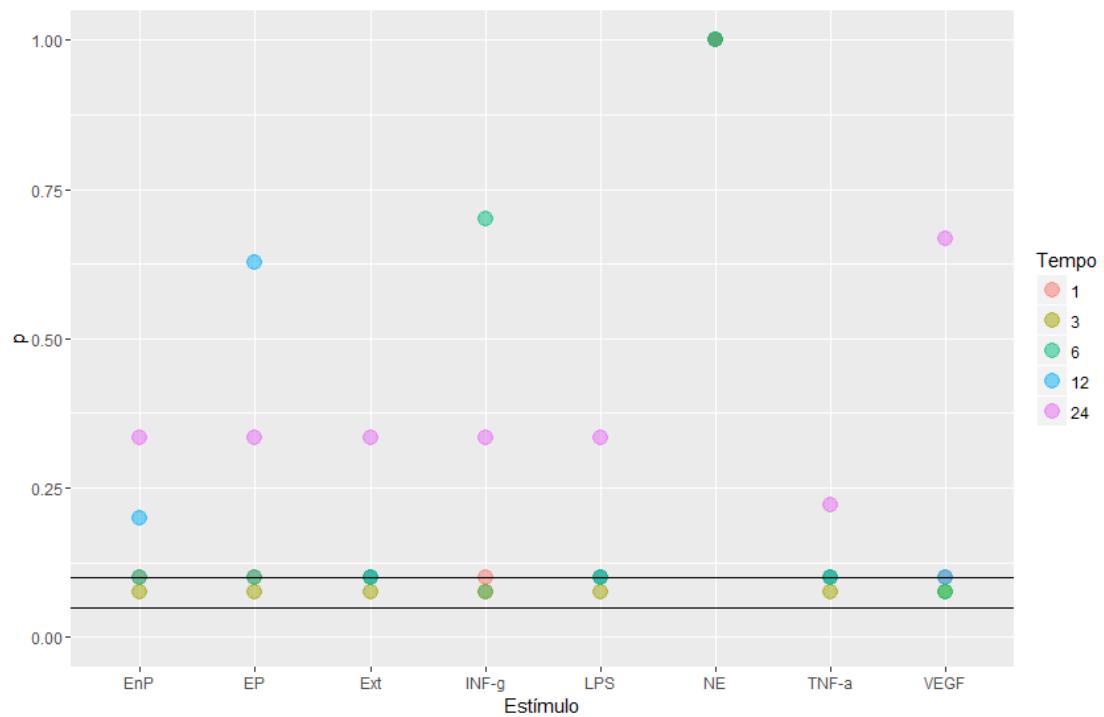


Gráfico B45 – valores-p para os testes de Mann-Whitney de cada estímulo em cada tempo versus controle (NE) para o experimento de quantificação de RANTES por CBA – com linhas representando os níveis 5% e 10%

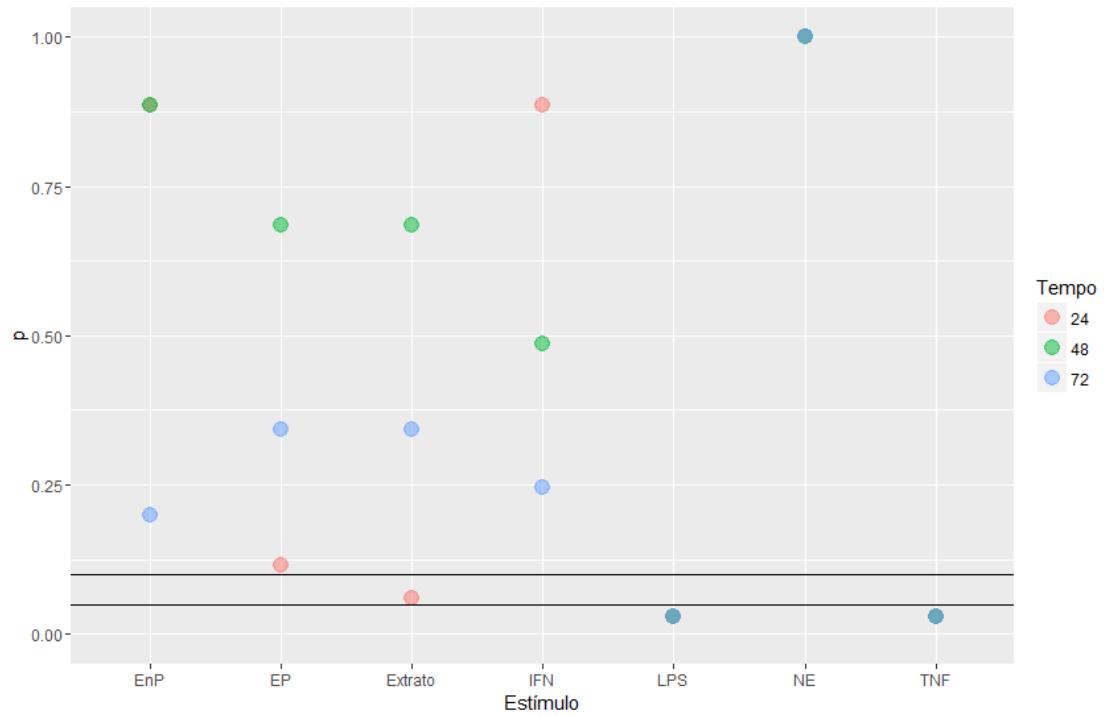


Gráfico B46 – valores-p para os testes de Mann-Whitney de cada estímulo em cada tempo versus controle (NE) para o experimento de quantificação de VEGF – com linhas representando os níveis 5% e 10%

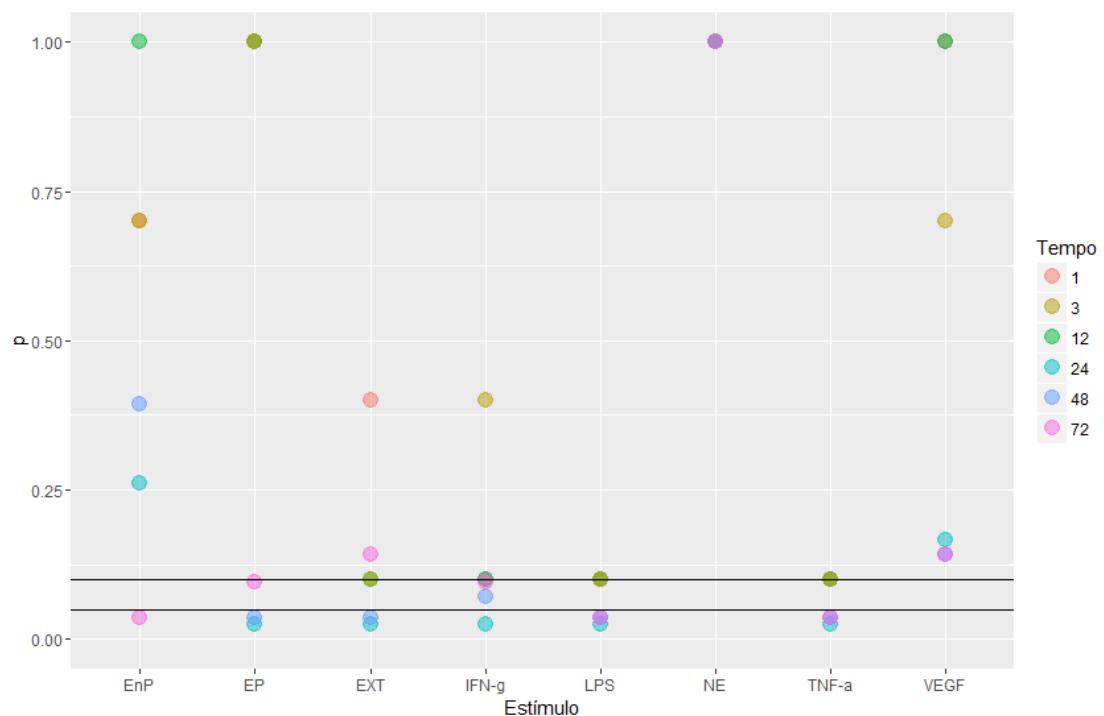


Gráfico B47 – valores-p para os testes de Mann-Whitney de cada estímulo em cada tempo versus controle (NE) para o experimento de quantificação de TLR2 por PCR em tempo real – com linhas representando os níveis 5% e 10%

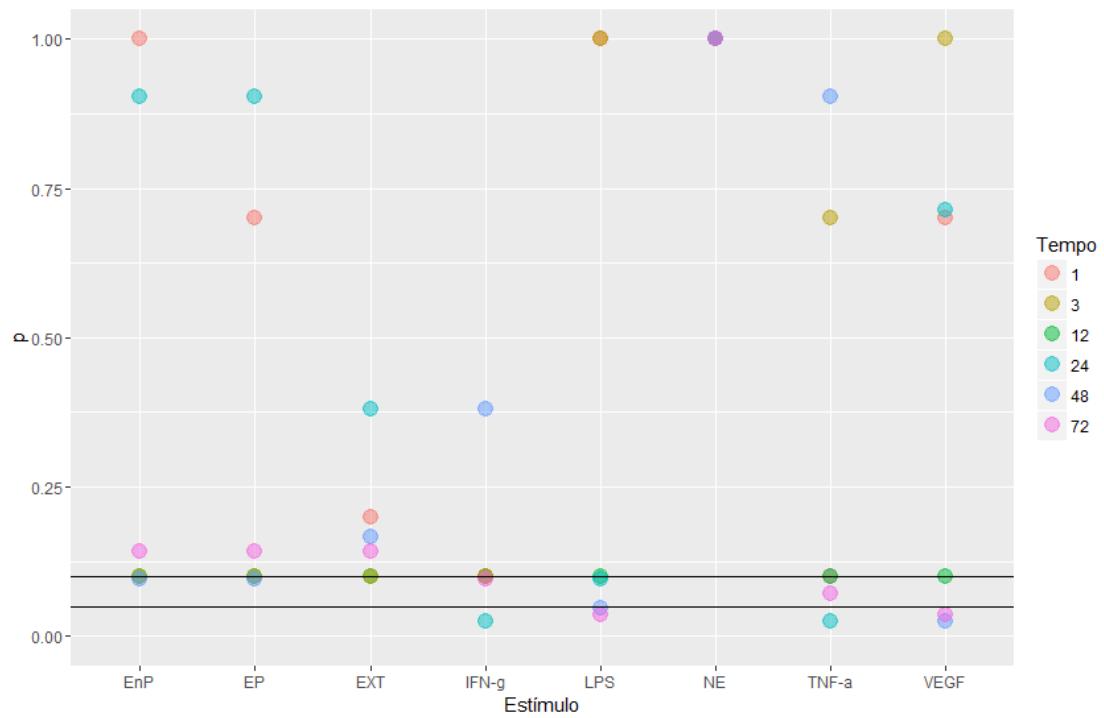


Gráfico B48 – valores-p para os testes de Mann-Whitney de cada estímulo em cada tempo versus controle (NE) para o experimento de quantificação de TLR4 por PCR em tempo real – com linhas representando os níveis 5% e 10%

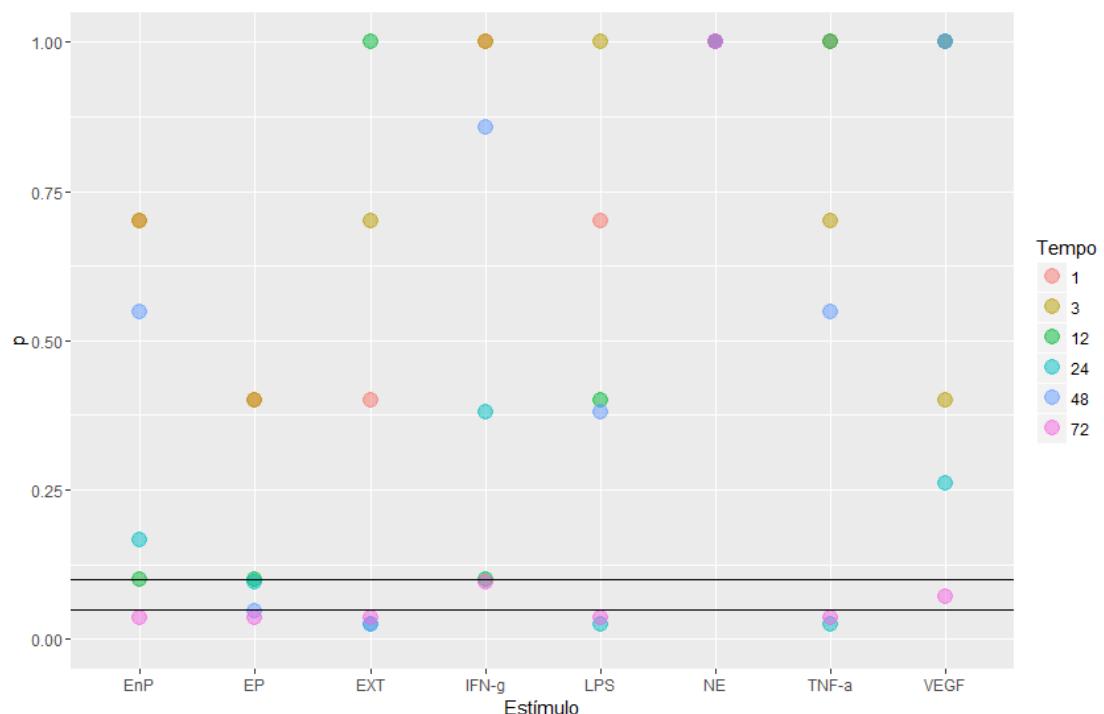


Gráfico B49 – valores-p para os testes de Mann-Whitney de cada estímulo em cada tempo versus controle (NE) para o experimento de quantificação de TLR9 por PCR em tempo real – com linhas representando os níveis 5% e 10%

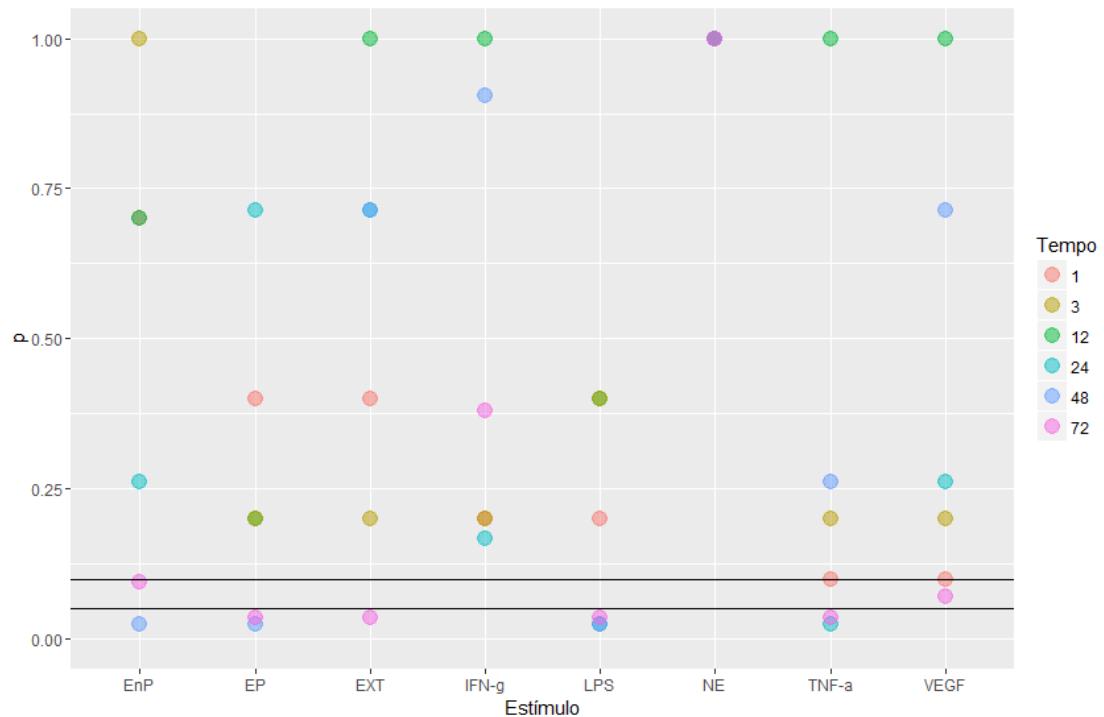
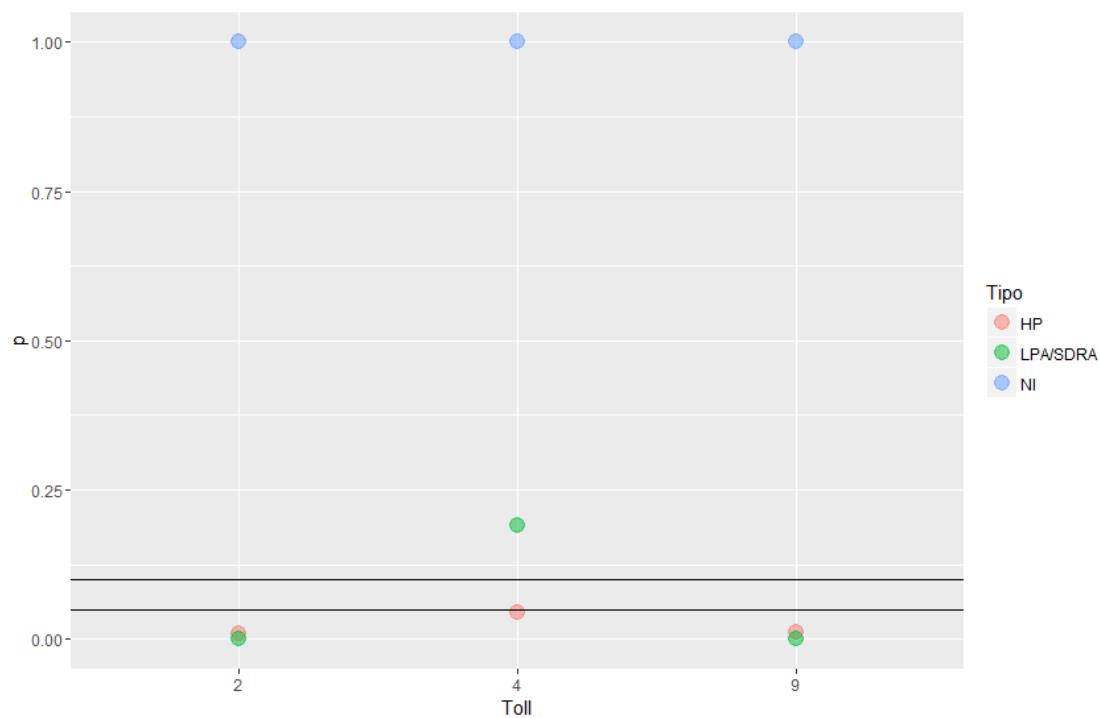
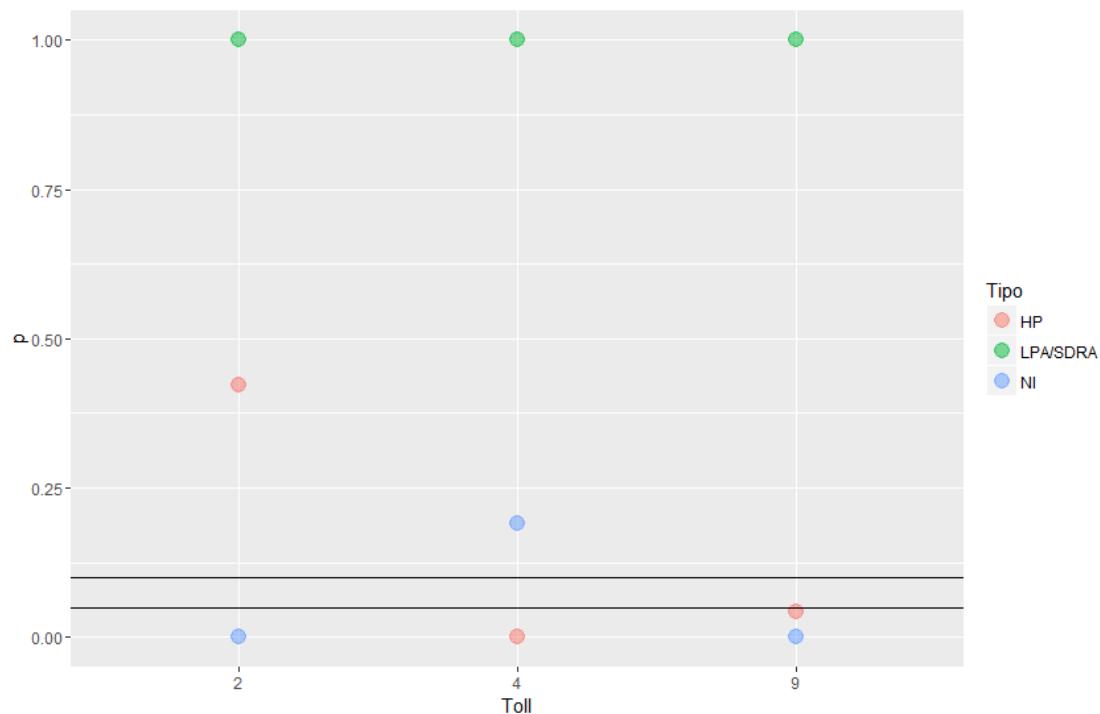


Gráfico B50 – valores-p para os testes de Mann-Whitney de cada estímulo em cada tempo versus controle (NE) para o experimento de quantificação de MyD88 por PCR em tempo real – com linhas representando os níveis 5% e 10%



*Gráfico B51 – valores-p para os testes de Mann-Whitney para o experimento de Imunoistoquímica – grupos comparados versus grupo NI – com linhas representando os níveis 5% e 10%*



*Gráfico B52 – valores-p para os testes de Mann-Whitney para o experimento de Imunoistoquímica – grupos comparados versus grupo LPA/SDRA – com linhas representando os níveis 5% e 10%*