

**Universidade de São Paulo
Instituto de Matemática e Estatística**

Centro de Estatística Aplicada

Relatório de Análise Estatística

RAE-CEA–25P10

RELATÓRIO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA SOBRE O PROJETO:

**Análise da eficácia da L-asparaginase em inibir o processo metastático em
linhagens de melanoma humano**

Arthur Henrique dos Santos Araujo
Igor Massaki Chinen
João Pedro Apolonio de Souza Matos
Carmen Diva Saldiva de André

São Paulo, junho de 2025

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

TÍTULO: Relatório de Análise Estatística sobre o Projeto: Análise da eficácia da L-asparaginase em inibir o processo metastático em linhagens de melanoma humano

PESQUISADORA: Carolina Silva

ORIENTADORA: Prof. Dra. Gisele Monteiro

INSTITUIÇÃO: FCF/USP

FINALIDADE DO PROJETO: Doutorado

RESPONSÁVEIS PELA ANÁLISE: Arthur Henrique dos Santos Araujo
Igor Massaki Chinen
João Pedro Apolonio de Souza Matos
Carmen Diva Saldiva de André

REFERÊNCIA DESTE TRABALHO: Araujo, A.H.; Chinen, I.M.; Matos, J.P.A.; Saldiva, C.D. **Relatório de análise estatística sobre o projeto: “Análise da eficácia da L-asparaginase em inibir o processo metastático em linhagens de melanoma humano”**. São Paulo, IME-USP, 2025. (RAE–CEA-25P10).

FICHA TÉCNICA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ANDRADE, K.C.R.; FERNANDES, R.A.; PINHO, D.B. (2021). Sequencing and characterization of an L-asparaginase gene from a new species of *Penicillium* section *Citrina* isolated from Cerrado. **Sci. Rep.**, 11, 17861. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97316-1>

CURTIN, J.A.; FRIDLYAND, J.; KAGESHITA, T.; PATEL, H.N.; BUSAM, K.J.; KUTZNER, H.; CHO, K.H.; AIBA S.; BROCKER, E.B.; LEBOT, P.E.; PINKEL, D.; BASTIAN, B.C. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **N Engl J Med**, 353, (20), 2135–2147.

DAVIES, H.; BIGNELL, G.R.; COX, C. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, 417, 949–954.

GARBARINO O.; VALENTI G.E.; MONTELEONE L.; PIETRA G.; MINGARI M.C.; BENZI A.; BRUZZONE S.; RAVERA S.; LEARDI R.; FARININI E.; VERNAZZA S.; GROTTOLI M.; MARENGO B.; DOMENICOTTI C. (2023). PLX4032 resistance of patient-derived melanoma cells: crucial role of oxidative metabolism. **Front. Oncol.**, 13, 1210130. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1210130>

HOUBEN R.; BECKER J.C.; KAPPEL A.; TERHEYDEN P.; BROCKER E.B.; GOETZ R.; RAPP U.R. (2004). Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. **J. Carcinog.** doi: 10.1186/1477-3163-3-6

SCHADENDORF, D.; FISHER, D.; GARBE, C. et al. (2015). Melanoma. **Nat. Rev. Dis. Primers**, 1, 15003. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.3>

ZHANG S.; GONG L.; SUN Y.; ZHANG F.; GAO W. (2025). An ultra-long-acting L-asparaginase synergizes with an immune checkpoint inhibitor in starvation-immunotherapy of metastatic solid tumors. **Biomaterials**, 312, 122740. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2024.122740>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961224002746>).

PATHRIA, G.; LEE, J.S.; HASNIS, E. (2019). Translational reprogramming marks adaptation to asparagine restriction in cancer. **Nat. Cell. Biol.** 21, 1590–1603. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0415-1>

KUTNER, M.H.; NACHTSHEIM, C.J.; NETER, J.; LI, W. (2005). **Applied Linear Statistical Models**. 5. ed. Boston: McGraw-Hill Irwin. 1415p.

PINHEIRO, J.C.; BATES, D.M. (2000). **Mixed-effects models in S and S-PLUS**. 1. Ed. New York: Springer. 528p.

SOUZA, P.H.M.; ANDRÉ, C. D. S. (2022). **Relatório de análise estatística sobre o projeto: “Efetividade da intervenção breve no consumo prejudicial de álcool e a relação do padrão de uso com o estado de saúde de mulheres atendidas em um serviço de atenção primária à saúde”**. São Paulo, IME-USP, 68p. (RAE–CEA-22P11).

FITZMAURICE, G.M.; LAIRD, N.M.; WARE, J.H. (2011). **Applied Longitudinal Analysis**. 2. ed. Wiley Series in Probability and Statistics. 752p.

PROGRAMAS COMPUTACIONAIS UTILIZADOS:

Microsoft Word for Windows (versão 2019)

Microsoft Excel for Windows (versão 2019)

R for Windows (versão 4.3.1)

RStudio for Windows (versão 6.1.524)

TÉCNICAS ESTATÍSTICAS UTILIZADAS

Análise Descritiva Multidimensional (03:020)

Análise de Dados Categorizados (06:030)

Análise de Variância com Efeitos Fixos (08:010)

Análise de Variância com Modelos Mistos (08:030)

Outros (03:990)

ÁREA DE APLICAÇÃO

Medicina – Ciências Farmacêuticas (14:040)

Resumo

A resistência adquirida aos inibidores de BRAF, como o PLX4032, compromete a eficácia terapêutica no melanoma metastático. Nesse contexto, a L-asparaginase tem se destacado como uma alternativa promissora em estudos recentes, com potencial aplicação também em tumores sólidos como o melanoma.

Neste contexto, foi conduzida uma análise comparativa, *in vitro*, de três estratégias terapêuticas: tratamento isolado com o inibidor de BRAF (PLX4032), tratamento isolado com L-asparaginase (EcASNase) e tratamento combinado com ambas as drogas. Com esse objetivo foram conduzidos seis ensaios experimentais: ensaio de viabilidade celular por MTT, ensaio de ferida, ensaio de migração com inserto Transwell, ensaio de invasão com inserto Transwell com Matrigel e ensaio esferóide tumoral tridimensional (com e sem Matrigel).

No ensaio de viabilidade celular (MTT), o tratamento combinatório mostrou-se mais eficaz do que o PLX-4032 isolado tanto nas linhagens sensíveis quanto nas linhagens resistentes, já a EcASNase isolada foi mais eficaz do que o PLX4032 isolado somente nas linhagens resistentes.

No ensaio de migração com inserto Transwell, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

No ensaio de invasão com Matrigel, o tratamento combinado não foi superior ao PLX-4032 na linhagem sensível, mas apresentou maior eficácia na linhagem resistente.

Nos ensaios de esferóide tridimensional sem Matrigel, observou-se que, na linhagem sensível, o tratamento combinado e o PLX-4032 apresentaram eficácia semelhante ao longo do tempo, enquanto o PLX-4032 foi mais eficaz que a EcASNase isolada a partir de 96h. Já na linhagem resistente, o tratamento combinado superou o PLX-4032 a partir de 96h, e a EcASNase foi mais eficaz do que o PLX4032 isolado apenas no tempo de 168h.

No ensaio de esferóide tridimensional com Matrigel, o tratamento combinatório é mais eficaz do que o PLX4032 isolado e do que o EcASNase isolado a partir de 72h, já a EcASNase isolada é mais eficaz do que a PLX4032 isolada a partir de 96h.

Para a linhagem resistente, não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo.

Esses resultados indicam que a EcASNase possui efeito antitumoral em linhagens de melanoma, com eficácia ampliada quando combinada ao PLX-4032, especialmente em contextos de resistência. Os achados reforçam o potencial da L-asparaginase como estratégia complementar em terapias contra o melanoma.

Sumário

1. Introdução	6
2. Objetivo	7
3. Descrição do estudo	8
4. Descrição das variáveis	17
5. Análise descritiva	19
6. Análise Inferencial	22
7. Conclusões	41
Apêndice A	42
Apêndice B	69

1. Introdução

O melanoma é um tipo raro, porém altamente agressivo de câncer de pele, caracterizado pela sua elevada capacidade de se espalhar para outras partes do corpo (metástase) e por apresentar resistência frequente aos tratamentos convencionais. Apesar de representar menos de 1% dos casos de câncer de pele no mundo, o melanoma é responsável por cerca de 80% das mortes relacionadas a esse tipo de câncer (Schadendorf et al, 2015).

No início dos anos 2000, projetos de sequenciamento genético em larga escala levaram à identificação de mutações no gene (proteína) BRAF presente em aproximadamente 40 a 50% dos melanomas cutâneos (Davies et al., 2002; Houben et al, 2004; Curtin et al, 2005), o que levou ao desenvolvimento de tratamentos que utilizam inibidores específicos dessa proteína, como o PLX-4032. Contudo, embora esses tratamentos demonstrem sucesso inicial significativo, observa-se uma redução considerável de sua eficácia clínica após cerca de seis meses de terapia, culminando em recidiva tumoral associada ao desenvolvimento de resistência ao medicamento (Garbarino et al., 2023).

Nesse contexto, torna-se crucial explorar novas estratégias terapêuticas alternativas ou complementares que possam superar ou minimizar os mecanismos de resistência aos tratamentos atuais. Uma abordagem promissora consiste no uso da enzima L-asparaginase (ASNase), já amplamente empregada na prática clínica para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda (Andrade et al, 2021). A ASNase atua através da degradação do aminoácido essencial L-asparagina, reduzindo drasticamente sua disponibilidade para as células tumorais, o que resulta na indução da morte celular tumoral. Recentemente, estudos têm evidenciado que a restrição desse aminoácido também pode reduzir significativamente a capacidade metastática e o crescimento tumoral em outros tipos de câncer, reforçando seu potencial terapêutico no contexto do melanoma (Zhang et al., 2025).

Portanto, investigar a aplicação clínica da ASNase como agente antitumoral no melanoma, especialmente em combinação com tratamentos convencionais ou outras abordagens inovadoras, pode oferecer perspectivas importantes para melhorar os desfechos terapêuticos desses pacientes.

2. Objetivo

O objetivo geral do estudo é avaliar o impacto do tratamento combinado com L-asparaginase e a droga inibidora de BRAF (PLX-4032) no processo metastático do melanoma humano, a partir de uma análise comparativa entre três abordagens terapêuticas: tratamento isolado com inibidor de BRAF (droga PLX-4032), tratamento isolado com L-asparaginase e o tratamento combinado com ambas as drogas, quando aplicadas a determinadas linhagens de melanoma humano e suas variantes resistentes à PLX-4032.

Em particular, o estudo busca investigar, em ambiente in vitro, os efeitos do tratamento na viabilidade celular, crescimento celular, migração e invasão das linhagens celulares de melanoma.

3. Descrição do estudo

Para a realização do estudo, foram utilizadas as drogas PLX-4032 (inibidor de BRAF, já usado no tratamento de melanoma) e dois tipos de L-asparaginase: EcASNase e ErASNase (fármacos novos para esse tipo de câncer).

Além disso, foram consideradas duas linhagens celulares de melanoma humano: SK-MEL-28 e WM164, juntamente com suas variantes resistentes ao PLX4032 (inibidor de BRAF), denominadas SK-MEL-28R e WM164R.

Foram realizados seis ensaios:

- Ensaio de viabilidade celular por MTT
- Ensaio de ferida
- Ensaio de migração com inserto Transwell
- Ensaio de invasão com inserto Transwell com matrigel
- Esferoide tumoral tridimensional sem matrigel
- Esferoide tumoral tridimensional com matrigel

que serão descritos a seguir.

Todas as observações foram obtidas a partir de amostras de duas culturas de células: uma de um melanoma SK-MEL-28 e outra de um melanoma WM164. As variantes resistentes foram obtidas a partir das originais (sensíveis).

Observação: Toda a análise inferencial realizada levou em consideração que as observações em experimentos diferentes são independentes e que dentro de um mesmo experimento, as observações da linhagem parental e resistente são independentes conforme orientado pela pesquisadora.

3.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT

O ensaio de viabilidade celular por MTT avalia a quantidade de células viáveis (células vivas) em uma amostra, permitindo a análise da citotoxicidade de drogas. Nesse tipo de ensaio experimental, as células são inicialmente expostas à droga em estudo e, posteriormente, é feita a adição do reagente MTT. As células viáveis (células vivas) metabolizam o MTT em um composto de coloração roxa, que é então solubilizado. A seguir, a absorbância desta solução é medida por espectrofotometria de tal forma que, quanto maior a absorbância, maior é a viabilidade celular (quantidade de células vivas) e menor é a eficácia da droga. Dessa maneira, é possível analisar os efeitos das diferentes concentrações e drogas na viabilidade das linhagens de câncer.

Para que a comparação entre as drogas PLX4032, EcASNase e ErASNase seja possível, é necessário estabelecer concentrações de cada droga equivalentes entre si, ou seja, doses que promovam efeitos semelhantes entre si. Com esse objetivo, foram realizados ensaios de viabilidade celular por MTT para cada uma das drogas, com o intuito de estimar suas concentrações inibidoras 50% (IC₅₀). A IC₅₀ é definida como a concentração da droga necessária para alcançar 50% da inibição do crescimento do número de células vivas, quando comparado ao crescimento do controle não tratado. A partir das IC₅₀ estimadas, são obtidas concentrações comparáveis entre as drogas, que servirão como base para as análises comparativas de eficácia nos experimentos subsequentes.

3.1.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT para PLX4032

Para o ensaio de viabilidade por MTT da droga PLX4032, foram realizados 3 experimentos considerados independentes, todos seguindo o mesmo protocolo de coleta de dados, conforme ilustrado na Figura B.1. Em cada experimento foi utilizada uma amostra das culturas de células das linhagens SK-MEL-28 e WM164 a partir das quais foram obtidas as suas variantes resistentes, SK-MEL-28R e WM164. A seguir, descreve-se somente o fluxo experimental do Experimento 1.

Cada linhagem celular foi exposta às seguintes concentrações, em micromolar, da droga PLX4032: 0 μ M; 0,01 μ M; 0,03 μ M; 0,1 μ M; 0,3 μ M, 1 μ M e 3 μ M. Vale ressaltar que, para cada linhagem, a dose de 0 μ M de PLX4032 é definida como controle (ausência de tratamento).

Para cada concentração da droga PLX4032, as leituras de absorbância foram realizadas em triplicata, conforme apresentado na Tabela ① da Figura B.1. As leituras de absorbância de cada linhagem foram então normalizadas em relação à média do seu respectivo grupo controle, utilizando a seguinte fórmula:

$$(I) \text{ Absorbância normalizada} = \frac{\text{Absorbância}}{\text{Absorbância média do controle}} \times 100$$

Depois da normalização dos dados, obtém-se a média das absorbâncias normalizadas para cada triplicata. Essas médias são denominadas de viabilidade celular relativa.

O mesmo procedimento descrito para o Experimento 1 foi repetido nos Experimentos 2 e 3, permitindo a obtenção dos dados ilustrados na Tabela ② da Figura B.1, que esquematiza as viabilidades celulares relativas para cada experimento, linhagem e concentração de PLX4032.

A partir das viabilidades celulares relativas obtidas para cada linhagem e dose da droga nos 3 experimentos, obtém-se o IC50 da droga PLX4032 para cada linhagem e experimento, como ilustra a Tabela ③ da Figura B.1. O cálculo desses IC50 foi realizado pela pesquisadora utilizando curvas de dose-resposta ajustadas através do software GraphPad Prism.

Por fim, os valores de IC50 obtidos nos três experimentos foram utilizados para calcular o IC50 médio da droga PLX4032 para cada linhagem. Esses valores médios foram adotados como referência para a seleção da concentração fixa de PLX4032 a ser utilizada nos experimentos comparativos.

3.1.2. Ensaio de viabilidade celular por MTT para EcASNase e ErASNase

Os ensaios de viabilidade celular por MTT para as drogas EcASNase e ErASNase foram conduzidos seguindo o mesmo protocolo experimental descrito na seção anterior. A única diferença entre os ensaios refere-se às concentrações utilizadas para cada droga. As concentrações usadas, expressas em unidades por mililitro (U/mL), foram as seguintes:

- EcASNase: 0 ; 0,02 ; 0,05 ; 0,2 ; 0,5 ; 2 ; 5
- ErASNase: 0 ; 0,002 ; 0,005 ; 0,02 ; 0,05 ; 0,2 ; 2

Vale ressaltar que, embora tenham sido feitos ensaios de viabilidade celular por MTT para ambas as composições de L-asparaginase (EcASNase e ErASNase), apenas a EcASNase foi utilizada nos experimentos comparativos.

3.1.3. Ensaio comparativo de viabilidade celular por MTT

A Figura B.2 apresenta o fluxo experimental utilizado para a coleta dos dados desse ensaio. As concentrações das drogas PLX4032 e EcASNase foram determinadas a partir dos ensaios de viabilidade celular por MTT descritos nas Seções 3.1.1 e 3.1.2, respectivamente. Com base nesses resultados, foram definidos quatro grupos de tratamento a serem aplicados em cada linhagem celular:

- Tratamento PLX4032: aplicação isolada da droga PLX4032, em concentração próxima do IC50 de cada linhagem celular;
- Tratamento EcASNase: aplicação isolada da enzima EcASNase, também em concentração próxima do IC50 de cada linhagem;
- Tratamento Combinatório: aplicação simultânea das drogas PLX4032 e EcASNase, combinando as respectivas concentrações de cada droga;

- Tratamento Controle: as células não foram expostas a nenhuma das drogas (ausência de tratamento).

A Figura B.2 resume as concentrações utilizadas em cada tratamento para as diferentes linhagens celulares (SK-MEL-28, SK-MEL-28R, WM164 e WM164R), expressas em U/mL para EcASNase e em μ M para PLX4032.

Após a definição dos tratamentos a serem aplicados, foram realizados três experimentos considerados independentes. Os 3 experimentos seguiram o mesmo protocolo de coleta de dados e, portanto, é descrito abaixo somente o fluxo do Experimento 2, esquematizado na Figura B.2.

Para o Experimento 2, foram utilizadas as linhagens SK-MEL-28 e WM164, assim como suas respectivas variantes resistentes, SK-MEL-28R e WM164R. Essas linhagens foram expostas aos quatro tratamentos definidos anteriormente (Controle, EcASNase, PLX4032, Combinatório).

As leituras de absorbância foram realizadas em triplicata para cada condição experimental. Em seguida, os valores obtidos foram normalizados em relação à média do grupo controle, e a média das absorbâncias normalizadas foi utilizada como medida de viabilidade celular relativa, conforme descrito anteriormente na Seção 3.1.1 (Ensaio de viabilidade de MTT para a droga PLX4032).

Os dados resultantes estão esquematizados na Tabela ③ da Figura B.2, que indica as viabilidades celulares relativas obtidas para cada linhagem, tratamento e experimento.

3.2. Ensaio de ferida

O ensaio de ferida é utilizado para avaliar a capacidade de migração celular, simulando o processo de regeneração tecidual *in vitro*. A técnica consiste em criar uma “ferida” ou espaço livre em uma monocamada de células e capturar imagens dessa “ferida” no tempo zero e após 24h. Em seguida, calcula-se a área da ferida (em pixels ao quadrado) nesses 2 instantes de tempo e a taxa de fechamento da ferida dada por:

$$(II) \text{ Fechamento da Ferida} = \left(1 - \frac{\text{Tamanho da Ferida após 24h}}{\text{Tamanho da Ferida no tempo 0}}\right) \times 100$$

Dessa forma, esse ensaio permite analisar os efeitos das drogas na capacidade de migração das células: quanto maior a eficácia da droga, menor é a capacidade migratória das células e, portanto, menor a taxa de fechamento da ferida.

Para comparar a eficácia das drogas PLX4032, EcASNase e combinatório das duas drogas na capacidade migratória das células, foram realizados 3 experimentos considerados independentes que estão esquematizados na Figura B.3.

Os 3 experimentos seguiram o mesmo protocolo de coleta de dados e, portanto, é descrito abaixo somente o fluxo do Experimento 2.

Para o Experimento 2, foram utilizadas as linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R. Essas linhagens foram expostas aos quatro tratamentos definidos na Seção 3.1.3, a saber:

- Controle
- EcASNase
- PLX4032
- Combinatório de EcASNase e PLX4032

Para cada tratamento, as medições da área da ferida foram realizadas nos tempos de 0h e 24h, em duplicata, conforme ilustrado na Tabela ① da Figura B.3.

Em seguida, a pesquisadora calculou a taxa de fechamento da ferida utilizando a fórmula (II), descrita anteriormente, resultando no esquema de dados apresentado na Tabela ② da Figura B.3. Com base nas taxas obtidas para cada duplicata, foi calculada a média da taxa de fechamento correspondente a cada tratamento em cada linhagem celular.

Por fim, repetindo-se o processo do experimento 2 para os experimentos 1 e 3, a pesquisadora obteve o esquema de dados mostrados na Tabela ③ da Figura B.3 com o fechamento médio da ferida para cada experimento, linhagem e tratamento.

3.3. Ensaio de migração com inserto Transwell

O ensaio de migração celular com inserto de Transwell avalia a capacidade de locomoção das células de câncer através de uma membrana porosa, permitindo a avaliação da capacidade de migração celular. Nesse tipo de ensaio experimental, as células são semeadas na câmara superior de um filtro com fundo poroso, denominado de inserto Transwell. No fim do ensaio, é feita a contagem manual das células que migraram, isto é, passaram para o lado inferior do filtro.

Com base na quantidade de células que passaram para o lado inferior do filtro, podemos avaliar a eficácia das drogas na capacidade migratória das células de câncer: quanto mais eficaz a droga, menor será o número de células que atingem a parte inferior do filtro (redução na capacidade migratória).

Para comparar a eficácia das drogas PLX4032, EcASNase e combinatório das duas drogas na capacidade migratória das células, foram realizados 3 experimentos considerados independentes, que estão esquematizados na Figura B.4. Uma vez que os 3 experimentos seguiram o mesmo protocolo experimental, descreveremos abaixo somente o fluxo do Experimento 1.

Para o Experimento 1, foi utilizada apenas a linhagem SK-MEL-28R. Essa linhagem foi exposta aos quatro tratamentos definidos na Seção 3.1.3, a saber:

- Controle
- EcASNase
- PLX4032
- Combinatório de EcASNase e PLX4032

As medidas foram feitas em duplicata em cada tratamento e então esses valores foram normalizados em relação ao grupo Controle conforme descrito a seguir. Para facilitar a compreensão, denominaremos essa variável de migração normalizada:

$$(III) \text{ Migração normalizada} = \frac{\text{Número de células que migraram}}{\text{Média do número de células que migraram no Controle}}$$

Depois da normalização dos dados, obtém-se a média da migração normalizada para cada triplicata. Essas médias são denominadas de migração celular relativa.

Por fim, realizando-se o mesmo procedimento para os Experimentos 2 e 3, obtemos a migração celular relativa para cada tratamento em cada experimento, como mostrado na Tabela ② da Figura B.4.

3.4. Ensaio de invasão com inserto Transwell com Matrigel

O ensaio de invasão com inserto Transwell recoberto com Matrigel é utilizado para avaliar a capacidade invasiva das células de câncer, por meio da adição de uma matriz extracelular (Matrigel) que só permite a passagem de células que possuem propriedade invasiva, como o câncer. Nesse tipo de ensaio experimental, as células são semeadas na câmara superior de um inserto contendo uma membrana porosa revestida com matrigel. No fim do ensaio, é feita a contagem manual das células que atravessaram o inserto poroso e o matrigel, isto é, passaram para o lado inferior do filtro.

Logo, esse ensaio permite a avaliação da eficácia das diferentes drogas estudadas na capacidade invasiva das células de câncer: quanto mais eficaz a droga, menor será o número de células que atingem a parte inferior do filtro (redução na capacidade invasiva).

Para comparar os efeitos das drogas e da sua combinação na capacidade de invasão celular, foram realizados três experimentos considerados independentes. Em cada experimento, foram conduzidos dois ensaios experimentais: (i) o ensaio de viabilidade celular cristal violeta e (ii) o ensaio de invasão celular utilizando inserto Transwell recoberto com Matrigel.

O ensaio de viabilidade celular cristal violeta, assim como o ensaio de viabilidade celular por MTT, gera medidas de absorbância que permitem mensurar a viabilidade celular. A interpretação dos resultados é similar: quanto mais eficaz a droga, menores os valores de absorbância e, portanto, menor a viabilidade celular.

A realização conjunta desses ensaios teve como objetivo confirmar se a redução observada na capacidade de invasão celular era de fato um efeito direto das drogas testadas, ou se poderia ser atribuída a alterações na viabilidade celular, isto é, à maior ou menor disponibilidade de células viáveis na amostra. Dessa forma, será calculado também a razão entre as medidas de invasão e as medidas de viabilidade.

Ademais, como os três experimentos seguiram o mesmo protocolo de coleta de dados, será descrito abaixo apenas o fluxo do Experimento 2, conforme esquematizado na Figura B.5.

Para o Experimento 2, foi utilizada a linhagem SK-MEL-28, e sua variante resistente, SK-MEL-28R. Com essas 2 linhagens celulares, foram realizados 2 ensaios experimentais: o ensaio de invasão com inserto Transwell com Matrigel e o ensaio de viabilidade cristal violeta.

Em ambos os ensaios (de invasão e de viabilidade), foram utilizados os quatro tratamentos previamente definidos na Seção 3.1.3, a saber:

- Controle
- EcASNase
- PLX4032
- Combinatório de EcASNase e PLX4032

Como indicado na Tabela ① da Figura B.5, a contagem das células no ensaio de invasão foi realizada em duplicata para cada tratamento, já o ensaio de viabilidade celular foi feito em triplicata para cada tratamento.

Em seguida, os valores medidos de invasão (quantidade de células que invadiram) e de viabilidade foram normalizados em relação ao Controle da seguinte forma:

$$(IV) \text{ Absorbância normalizada} = \frac{\text{Absorbância}}{\text{Absorbância média do controle}}$$

$$(V) \text{ Invasão normalizada} = \frac{\text{Número de células que invadiram}}{\text{Média da quantidade de células que invadiram no Controle}}$$

Depois da normalização dos dados, calcula-se a média das duplicatas para obter a invasão celular relativa para cada tratamento e linhagem no Experimento 2. Similarmente, calcula-se a média das triplicatas para obter a viabilidade celular relativa para cada tratamento e linhagem.

Utilizando os valores normalizados, foi calculada a razão entre a invasão normalizada e a viabilidade celular relativa para cada tratamento e linhagem. Em

seguida, calcula-se a média dessas razões para cada tratamento e linhagem do Experimento 2.

Por fim, repetindo-se o mesmo processo descrito acima para os Experimentos 1 e 3, obtemos o esquema de dados mostrados na Tabela ② da Figura B.5.

3.5. Esferoide tumoral tridimensional sem e com Matrigel

O esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel é um modelo que permite o estudo da proliferação e crescimento das células de câncer. Nesse tipo de ensaio, as células são cultivadas de modo a se formar uma esfera compacta e essa esfera é avaliada nos tempos 0h, 24h, 48h, 72h, 96h e 168h com a medição da área das esferas, medidas em micrômetros ao quadrado (μm^2). Após a medição das áreas nos tempos propostos, as áreas são normalizadas em relação à área da esfera no tempo inicial (tempo 0), com base na seguinte fórmula:

$$(VI) \text{ Área normalizada} = \frac{\text{Área da esfera no tempo } T}{\text{Área da esfera no tempo } 0} \times 100, T = 0, 24, 48, 72, 96, 168h$$

O esferoide tumoral tridimensional com Matrigel segue a mesma estrutura de experimentação, porém as esferas celulares são cultivadas em um ambiente contendo matriz extracelular.

Esses 2 ensaios experimentais permitem a avaliação dos efeitos das drogas no crescimento das esferas tumorais: quanto mais eficaz a droga, menor é a área normalizada da esfera em cada instante de tempo.

A Figura B.6 ilustra o processo de coleta dos dados para os dois modelos de esferoides tumorais tridimensionais (com e sem Matrigel). Como indicado na figura, foram realizados três experimentos considerados independentes para cada modelo e em cada experimento foram utilizados somente as células da linhagem WM164 e WM164R.

Considerando que todos os 3 experimentos seguiram o mesmo protocolo de coleta e tratamento de dados, a descrição a seguir apresenta em detalhes apenas o fluxo do Experimento 2.

Inicialmente, as células (da linhagem WM164 e WM164R) foram expostas a quatro tratamentos, formados a partir de concentrações fixas das drogas EcASNase

e PLX4032. Vale ressaltar que as concentrações de cada droga na definição desses tratamentos dependem da linhagem considerada. Dessa forma, para a linhagem WM164, os tratamentos a serem aplicados nessa linhagem foram definidos da seguinte forma:

- Controle: concentrações zero de ambas as drogas
- EcASNase: 2 U/ml EcASNase
- PLX4032: 3 μ M de PLX4032
- Combinatório de EcASNase e PLX4032: 2 U/ml de EcASNase + 3 μ M de PLX4032

Para a linhagem WM164R, os tratamentos a serem aplicados nessa linhagem foram definidos da seguinte forma:

- Controle: concentrações zero de ambas as drogas
- EcASNase: 5 U/ml de EcASNase
- PLX4032: 6 μ M de PLX4032
- Combinatório de EcASNase e PLX4032: 5 U/ml de EcASNase + 6 μ M de PLX4032

As medidas foram feitas em triplicata em cada tratamento, conforme indicado na Tabela ① da Figura B.8. A seguir, as medições de cada replicata são normalizadas em relação à área de sua esfera no tempo 0, seguindo a fórmula (VI). Após a normalização das medições, calcula-se a área normalizada média para os tempos 0h, 24h, 72h, 96h, 168h para cada tratamento aplicado a cada uma das linhagens.

Por fim, repetindo-se o mesmo processo descrito acima para os Experimentos 1 e 3, obtemos o esquema de dados mostrados na Tabela ② da Figura B.6 com as áreas normalizadas médias para cada tempo, linhagem, tratamento e experimento.

4. Descrição das variáveis

As variáveis que serão consideradas na análise estatística dos dados de cada ensaio são descritas a seguir.

4.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT

4.1.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT para PLX4032

- Linhagens celulares: SK-MEL-28, SK-MEL-28R, WM164, WM164R;
- Concentrações da droga PLX4032 em μM : 0 ; 0,01 ; 0,03 ; 0,1 ; 0,3 , 1 e 3;
- Experimentos: Experimento 1, Experimento 2, Experimento 3.

Variável resposta:

- Viabilidade celular relativa (%): variável definida na Seção 3.1.1.

4.1.2. Ensaio de viabilidade celular por MTT para EcASNase e ErASNase

- Linhagens celulares: SK-MEL-28, SK-MEL-28R, WM164, WM164R;
- Concentrações da droga EcASNase, em U/ml: 0 ; 0,02 ; 0,05 ; 0,2 ; 0,5 ; 2 ; 5;
- Concentrações da droga ErASNase, em U/ml: 0 ; 0,002 ; 0,005 ; 0,02 ; 0,05 ; 0,2 ; 2;
- Experimentos: Experimento 1, Experimento 2, Experimento 3.

Variável resposta:

- Viabilidade celular relativa (%): variável definida na Seção 3.1.1.

4.1.3. Ensaio comparativo de viabilidade celular por MTT

- Linhagens celulares: SK-MEL-28, SK-MEL-28R, WM164, WM164R
- Tratamentos aplicados: Controle (sem tratamento), PLX4032, EcASNase, ErASNase e EcASNase + PLX4032 (combinatório de EcASNase e PLX4032)
- Experimentos: Experimento 1, Experimento 2, Experimento 3

Variável resposta:

- Viabilidade celular relativa (%): variável definida na Seção 3.1.1.

4.2. Ensaio de ferida

- Linhagem celular: SK-MEL-28 e SK-MEL-28R
- Tratamento aplicado: Controle (sem tratamento), PLX4032, EcASNase e EcASNase + PLX4032 (combinatório de EcASNase e PLX4032)
- Experimentos: Experimento 1, Experimento 2, Experimento 3

Variável resposta:

- Fechamento da ferida (%): área migrada ao longo do tempo, calculada conforme descrito na Seção 3.2.

4.3. Ensaio de migração com inserto Transwell

- Linhagem celular: SK-MEL-28R
- Tratamento aplicado: Controle (sem tratamento), PLX4032, EcASNase, EcASNase + PLX4032 (combinatório de EcASNase e PLX4032)
- Experimentos: Experimento 1, Experimento 2, Experimento 3

Variável resposta:

- Migração celular relativa: razão entre a quantidade de células migradas (número de células) definida na Seção 3.3.

4.4. Ensaio de invasão com inserto Transwell com Matrigel

- Linhagem celular: SK-MEL-28, SK-MEL-28R
- Tratamento aplicado: Controle (sem tratamento), PLX4032, EcASNase, EcASNase + PLX4032 (combinatório de EcASNase e PLX4032)
- Experimentos: Experimento 1, Experimento 2, Experimento 3

Variável resposta:

- Invasão celular relativa definida na Seção 3.4.
- Invasão/Viabilidade definida na Seção 3.4

4.5. Esferóide tumoral tridimensional sem e com Matrigel

- Linhagem celular: WM164, WM164R
- Tratamento aplicado: Controle (sem tratamento), PLX4032, EcASNase, EcASNase + PLX4032 (combinatório de EcASNase e PLX4032)
- Experimentos: Experimento 1, Experimento 2, Experimento 3

Variável resposta:

- Área do esferóide (μm^2): crescimento do esferóide ao longo do tempo definida na Seção 3.5.

5. Análise descritiva

O objetivo da análise descritiva é resumir os resultados obtidos em cada ensaio por meio da construção de tabelas com medidas resumo e gráficos que permitam fazer, de forma preliminar, uma análise comparativa das abordagens terapêuticas consideradas no estudo.

5.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT

No ensaio de viabilidade celular por MTT, os resultados apresentados na Tabela A.1 e na Figura B.7 indicam que o tratamento com PLX4032 promove uma redução progressiva na média da viabilidade celular relativa (%) da linhagem SK-MEL-28 à medida que a concentração da droga aumenta, sugerindo uma resposta dose-dependente. Por outro lado, na linhagem resistente SK-MEL-28R, observa-se inicialmente uma diminuição na viabilidade celular relativa nas concentrações mais baixas de PLX4032, seguida de um aumento nas concentrações mais elevadas, refletida no aumento da diferença dada na Tabela A.1. Esse padrão sugere um possível efeito contrário ao desejado na linhagem resistente.

A partir da análise da Figura B.7 e das Tabelas A.2 e A.3, observa-se que os tratamentos com EcASNase e ErASNase apresentam comportamentos semelhantes. Em ambas as linhagens celulares (SK-MEL-28 e SK-MEL-28R), verifica-se uma tendência consistente de redução na viabilidade celular relativa (%) à medida que a concentração das drogas aumenta. Esse padrão sugere que ambas as formulações — EcASNase e ErASNase — exercem efeito citotóxico progressivo nas duas linhagens, o que é compatível com a ação esperada da L-asparaginase. Os resultados indicam, inicialmente, que a L-asparaginase mantém sua eficácia em reduzir a viabilidade celular mesmo na linhagem resistente.

Conclusões similares foram obtidas para as linhagens WM164 e WM164R nesse mesmo ensaio (ver Tabelas A.4, A.5, A.6 e a Figura B.8).

A Tabela A.7 e a Figura B.9 e a Tabela A.8 e a Figura B.10, mostram os valores médios da Viabilidade celular relativa (%) para os tratamentos PLX4032, EcASNase e combinatório EcASNase + PLX4032, quando são consideradas doses dessas drogas próximas às suas IC₅₀, para as linhagens SK-MEL-28 e sua versão resistente

e para WM164 e sua versão resistente, respectivamente. As menores médias da viabilidade foram observadas quando é aplicado o tratamento combinado.

5.2. Ensaio de ferida

No experimento de migração ensaio de ferida, podemos ver pela Tabela A.9 e a Figura B.11, que o uso isolado das duas drogas reduz a média do Fechamento da ferida (%) em relação ao controle, na linhagem sensível SK-MEL-28, o que não ocorre na resistente SK-MEL-28R. Em ambas as linhagens, vemos que o combinado surte o maior efeito, pois neste tratamento foram observadas as menores médias da variável resposta.

5.3. Ensaio de migração com inserto Transwell

No ensaio de migração com transwell, no qual só foi considerada a linhagem resistente da SK-MEL-28, vemos que o uso isolado das drogas não provoca redução na Migração celular relativa (razão), com a média da migração aumentando em relação ao controle, enquanto o uso combinado das drogas provoca a redução sugerindo uma ação sinérgica entre as drogas, como podemos ver na Tabela A.10 e a Figura B.12.

5.4. Ensaio de invasão com inserto Transwell com Matrigel

No ensaio de invasão, vemos que, tanto o uso isolado quanto combinado das drogas reduzem a média da Invasão celular relativa (razão) na linhagem sensível SK-MEL-28, enquanto na SK-MEL-28R, o uso da PLX-4032 provoca aumento da Invasão celular relativa (razão) e parece inibir a EcASNase, visto que a média no tratamento combinatório é muito próxima da média no controle (Tabela A.11 e Figura B.13).

No ensaio de invasão, foi realizado o experimento de viabilidade celular cristal violeta. Para as medidas obtidas de viabilidade, vemos, pela Tabela A.12 e a Figura B.14, uma diferença entre as linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R nos tratamentos que recebem a PLX-4032, pois nesses tratamentos, só a linhagem sensível tem redução na Viabilidade celular relativa (razão). Em ambas as linhagens, a EcASNase isolada reduz a Viabilidade celular relativa (razão), mas é o tratamento de menor redução, enquanto o combinatório é o tratamento de maior redução.

Ainda no ensaio de invasão, vemos na Tabela A.13 e a Figura B.15 os valores da média e desvio padrão da Invasão/Viabilidade (razão), onde notamos que na

linhagem sensível tanto o uso isolado das drogas quanto o uso combinado reduzem em grande quantidade a Invasão/Viabilidade (razão). Já na linhagem resistente, temos redução apenas no uso isolado da EcASNase, e vemos que a presença da PLX-4032 parece inibir o efeito da EcASNase, uma vez que podemos ver que no combinatório, a média da linhagem resistente é maior do que a do controle.

5.5. Esferóide tumoral tridimensional sem e com Matrigel

No ensaio de esferóide sem matrigel vemos que apenas o tratamento combinado foi capaz de provocar a redução da Área total relativa (%) ao longo do tempo nas duas linhagens, WM164 e WM164R, enquanto o uso isolado da PLX-4032 faz com que apenas a linhagem WM164 sofra redução na Área total relativa da esfera. A Área total relativa (%) da esfera se mantém constante na linhagem WM164R quando se usa as drogas de maneira isolada (Tabelas A.14, A.15, A.16, A.17 e na Figura B.16).

No ensaio de esferoide com matrigel (Tabelas A.18, A.19, A.20, A.21 e na Figura B.17), apenas o tratamento combinatório consegue conter, em média, a Área total relativa (%) ao longo do tempo nas duas linhagens, com a média dessa variável aumentando até o tempo de 72h e diminuindo a partir de então. Nos demais tratamentos, a Área total relativa apresenta crescimento nas duas linhagens.

6. Análise Inferencial

Nessa parte da análise, avaliamos de que maneira os tratamentos impactam a variável resposta em cada um dos ensaios em vitro realizados.

Na análise inferencial, foram consideradas as seguintes observações dadas pelas pesquisadoras: medidas realizadas em diferentes experimentos são independentes, em cada ensaio em vitro; medidas feitas no mesmo experimento, mas em linhagens diferentes, são independentes.

Nos ensaios de esferoide, foram feitas medidas repetidas em um mesmo experimento ao longo do tempo, isto é, a natureza longitudinal do ensaio foi considerada na análise.

6.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT

A comparação entre as médias da viabilidade celular relativa (%), nos diferentes tratamentos, dentro de cada linhagem, foi feita usando um modelo de análise de variância (ANOVA) com dois fatores fixos. Como nesse experimento há dois pares de linhagens, sensível e resistente, foram ajustados dois modelos: um considerando SK-MEL-28 e SK-MEL-28R e outro com WM164 e WM164R.

Começamos a análise com o modelo ANOVA para o par SK-MEL-28 e SK-MEL-28R. Os fatores são tratamento, com três níveis: EcASNase, PLX4032, e o tratamento combinatório entre EcASNase e PLX4032 e linhagem celular, com dois níveis.

O modelo supõe que os erros são independentes, com distribuição normal com média zero e variância constante (KUTNER; NACHTSHEIM; NETER, 2005).

Vemos, na Tabela A.22, que o teste de hipótese de significância do efeito de interação resultou em um valor-p de 0,003; assim, ao nível de significância de 5%, rejeitamos a hipótese nula e concluímos que existe efeito de interação entre linhagem e tratamento, ou seja, a diferença entre as médias da viabilidade celular relativa (%) nos tratamentos dependem da linhagem.

Podemos ver, na Figura B.18, os gráficos de resíduos obtidos no ajuste do modelo. O primeiro gráfico é o de resíduo padronizado por valor ajustado. Nesse gráfico, não são observadas tendências na nuvem de pontos, o que sugere que não houve fuga da suposição de homoscedasticidade.

No segundo gráfico estão representados os resíduos padronizados pelos quantis teóricos da distribuição normal padrão, com um envelope de confiança global de 95% de confiança. Esse gráfico não sugere desvios grosseiros da suposição de normalidade.

Para localizar as diferenças entre as médias da viabilidade celular relativa (%) em cada linhagem, continuamos a análise fazendo comparações múltiplas pelo método de Bonferroni (KUTNER; NACHTSHEIM; NETER, 2005). Os resultados obtidos na comparação das médias duas a duas são encontrados Tabela A.23 e indicam que, na linhagem sensível:

- não há diferença entre as médias da viabilidade celular relativa (%) nos tratamentos EcASNase e PLX4032 (valor-p = 0,611);
- há diferença entre as médias da viabilidade celular relativa (%) nos tratamentos EcASNase e Combinatório (valor-p = 0,014) sendo a média no EcASNase maior que no Combinatório;
- há diferença entre as médias da viabilidade celular relativa (%) nos tratamentos PLX4032 e Combinatório (valor-p <0,001) sendo a média no PLX4032 maior que no Combinatório.

Para a linhagem resistente, as conclusões foram:

- há diferença entre as médias da viabilidade celular relativa iva (%) nos tratamentos EcASNase e PLX4032 (valor-p <0,001), sendo a média da PLX4032 maior do que na EcASNase;
- não há diferença entre as médias da viabilidade celular relativa (%) nos tratamentos EcASNase e Combinatório (valor-p > 0,999);
- há diferença entre as médias da viabilidade celular relativa (%) nos tratamentos PLX4032 e Combinatório (valor-p <0,001) sendo a média no PLX4032 maior que no Combinatório.

Na análise das linhagens WM164 e WM164R foram utilizados os mesmos métodos que na análise das linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R

Podemos ver na Tabela A.24, que o teste de hipóteses de significância do efeito de interação, resultou em um valor-p menor do que 0,001; assim, rejeitamos a hipótese nula ao nível de 5% de significância e concluímos que existe efeito de interação entre linhagem e tratamento, ou seja, a diferença entre as médias da viabilidade celular relativa (%) nos tratamentos dependem da linhagem.

Podemos ver pela Figura B.19 os gráficos de resíduos para o ajuste desse modelo. O primeiro gráfico é o de resíduo padronizado por valor ajustado. Nesse gráfico, podemos observar uma forma de funil nos resíduos, de modo que a dispersão dos resíduos aumenta, conforme o valor ajustado aumenta. Esse gráfico sugere que houve fuga na suposição de homoscedasticidade.

O segundo gráfico é um *qqplot* dos resíduos padronizados pelos quantis teóricos da normal padrão, com um envelope de confiança global de 95% de confiança. Vemos que todos os pontos caem dentro do envelope de confiança, porém, é notável um afastamento da reta nas extremidades, indicando cauda pesada e sendo difícil de dizer se houve ou não fuga de normalidade.

Após esse resultado apontando que o ajuste não foi muito bom, fizemos uma análise de sensibilidade, removendo os pontos 4 e 14 e realizando novamente o ajuste.

Antes de prosseguir, é importante explicitar quais são esses pontos. A observação 4 corresponde ao valor 54,2 para a viabilidade celular relativa (%), que é a medida obtida no experimento 2, na linhagem WM164 com o tratamento EcASNase. A observação 14 corresponde ao valor de 77,4, que é a medida obtida no experimento 2, na linhagem WM164R com o tratamento PLX4032. Outra observação que aparece em destaque no *qqplot*, é a observação 17, que corresponde ao valor 103,3, que é a medida obtida no experimento 3, na linhagem WM164, com o tratamento PLX4032.

O ajuste do modelo sem as observações 4 e 14, produziu a tabela ANOVA exibida na Tabela A.25.

Vemos na Tabela A.25, que o teste de hipótese de significância do efeito de interação resultou em um valor-p menor do que 0,001; assim, ao nível de significância de 5%, rejeitamos a hipótese nula e concluímos que existe efeito de interação entre linhagem e tratamento, mesmo sem as duas observações.

Podemos ver pela Figura B.20 os gráficos de resíduos para o ajuste do modelo sem as observações 4 e 14. O primeiro gráfico é o de resíduo padronizado por valor ajustado. Nesse gráfico, ver que sem essas observações, houve uma correção no comportamento dos resíduos, onde não houve tendência observada na nuvem de pontos, em particular sem a forma de funil, o que sugere que não há fuga na suposição de homoscedasticidade.

O segundo gráfico, é um *qqplot* dos resíduos pelos quantis teóricos da normal padrão, com um envelope de confiança de 95%. Vemos que dessa vez todos os

pontos ficam próximos da reta, não observamos afastamento e todos caem dentro do envelope. Esse gráfico não sugere desvios grosseiros da normalidade.

A análise de sensibilidade nos mostra que, ao remover dois pontos influentes do ajuste, o modelo ANOVA resultante traz a mesma conclusão do ponto de vista inferencial na significância dos parâmetros, e a análise de resíduos não sugere fuga das suposições. Assim, continuamos a análise com o modelo completo, com todas as observações, uma vez que a análise de sensibilidade nos mostrou que o modelo ANOVA é robusto em relação a essas observações.

Para localizar as diferenças entre as médias da viabilidade celular relativa (%) em cada linhagem, continuamos a análise fazendo comparações múltiplas pelo método de Bonferroni (KUTNER; NACHTSHEIM; NETER, 2005). Os resultados obtidos na comparação das médias duas a duas são encontrados na Tabela A.26 e indicam que na linhagem sensível:

- não há diferença entre as médias da viabilidade celular relativa (%) nos tratamentos EcASNase e PLX4032 (valor-p = 0,835);
- há diferença entre as médias da viabilidade celular relativa (%) nos tratamentos EcASNase e Combinatório (valor-p = 0,002) sendo a média no EcASNase maior que no Combinatório;
- há diferença entre as médias da viabilidade celular relativa (%) nos tratamentos PLX4032 e Combinatório (valor-p = 0,030) sendo a média no PLX4032 maior que no Combinatório.

Para a linhagem resistente, as conclusões foram:

- há diferença entre as médias da viabilidade celular relativa (%) nos tratamentos EcASNase e PLX4032 (valor-p <0,001), sendo a média da PLX4032 maior do que na EcASNase;
- não há diferença entre as médias da viabilidade celular relativa (%) nos tratamentos EcASNase e Combinatório (valor-p > 0,999);
- há diferença entre as médias da viabilidade celular relativa (%) nos tratamentos PLX4032 e Combinatório (valor-p <0,001) sendo a média no PLX4032 maior que no Combinatório.

6.2. Ensaio de ferida

A comparação entre as médias do fechamento da ferida (% t0), nos diferentes tratamentos, dentro de cada linhagem, foi feita por meio do ajuste de um modelo ANOVA com dois fatores fixos: linhagem, com dois níveis (SK-MEL-28 e SK-MEL-28R), e tratamento, com quatro níveis (Controle, EcASNase, PLX4032 e combinatório de EcASNase e PLX4032).

Os resultados na Tabela A.27 mostram que há efeito de interação entre tratamento e linhagem (valor-p = 0,008), ou seja, a diferença entre as médias do fechamento da ferida (% t0) nos tratamentos dependem da linhagem.

A Figura B.21 nos mostra os gráficos de resíduos desse modelo. À esquerda, temos o gráfico de resíduos padronizados por valores ajustados e, à direita, o dos resíduos padronizados pelos quantis teóricos da normal padrão com um envelope de confiança de 95% de confiança global.

No gráfico da esquerda, vemos que os pontos estão distribuídos aleatoriamente, sem nenhuma tendência ou forma explícita, enquanto no gráfico da direita, todos os pontos estão bem próximos da reta, e todos caem dentro do envelope de confiança, dentro do intervalo de (-2,2).

Esses resultados apontam que não houve fuga das suposições do modelo.

Prosseguimos então a análise com o objetivo de localizar as diferenças entre as médias do fechamento da ferida (% t0) nos tratamentos em cada linhagem. Adotamos para isto o método de Bonferroni (KUTNER; NACHTSHEIM; NETER, 2005). Os resultados obtidos são encontrados na Tabela A.28.

Os resultados indicam que na linhagem sensível:

- há diferença entre as médias do fechamento da ferida (% t0) nos tratamentos Controle e EcASNase (valor-p = 0,004), sendo a média do Controle maior do que na EcASNase;

- há diferença entre as médias do fechamento da ferida (% t0) nos tratamentos Controle e Combinatório (valor-p < 0,001), sendo a média do Controle maior que no Combinatório;
- há diferença entre as médias do fechamento da ferida (% t0) nos tratamentos Controle e PLX4032 (valor-p = 0,001) sendo a média no Controle maior que no PLX4032.
- não há diferença entre as médias do fechamento da ferida (% t0) nos tratamentos EcASNase e Combinatório (valor-p = 0,065);
- não há diferença entre as médias do fechamento da ferida (% t0) nos tratamentos EcASNase e PLX4032 (valor-p > 0,999);
- não há diferença entre as médias do fechamento da ferida (% t0) nos tratamentos PLX4032 e Combinatório (valor-p = 0,188).

Para a linhagem resistente, as conclusões foram:

- não há diferença entre as médias do fechamento da ferida (% t0) nos tratamentos Controle e EcASNase (valor-p > 0,999);
- há diferença entre as médias do fechamento da ferida (% t0) nos tratamentos Controle e Combinatório (valor-p = 0,047), sendo a média do Controle maior que no Combinatório;
- não há diferença entre as médias do fechamento da ferida (% t0) nos tratamentos Controle e PLX4032 (valor-p > 0,999).
- não há diferença entre as médias do fechamento da ferida (% t0) nos tratamentos EcASNase e Combinatório (valor-p = 0,456);
- não há diferença entre as médias do fechamento da ferida (% t0) nos tratamentos EcASNase e PLX4032 (valor-p > 0,999);
- há diferença entre as médias do fechamento da ferida (% t0) nos tratamentos PLX4032 e Combinatório (valor-p = 0,019), sendo a média do PLX4032 maior do que no Combinatório.

6.3. Ensaio de migração com inserto Transwell

Nesse ensaio, há apenas uma linhagem, a SK-MEL-28R. O tratamento possui três categorias: EcASNase, PLX4032 e combinatório de EcASNase e PLX4032.

Para medir e quantificar o efeito do tratamento na migração celular relativa (razão), utilizamos um modelo de Análise de Variância (ANOVA) com um fator fixo, com o fator sendo o tratamento com três níveis.

O modelo supõe que os erros são independentes, com distribuição normal com média zero e variância constante (KUTNER; NACHTSHEIM; NETER, 2005).

Os resultados apresentados na Tabela A.29 indicam que, ao nível de 5% de significância, não há diferença entre as médias da migração celular relativa nos três tratamentos (valor-p = 0,114). Este resultado pode ser devido ao pequeno número de observações neste ensaio.

Na Figura B.22, temos os gráficos de resíduos padronizados por valor ajustado na esquerda e dos resíduos padronizados pelos quantis da normal padrão com envelope de 95% de confiança na direita.

No gráfico da esquerda, vemos que os resíduos estão distribuídos aleatoriamente, e a direita vemos que os pontos estão próximos da reta e dentro do envelope de confiança.

6.4. Ensaio de invasão com inserto Transwell com Matrigel

Nesse ensaio, tínhamos três variáveis respostas originalmente, sendo elas a invasão celular relativa (razão), viabilidade celular relativa (razão), e a invasão/viabilidade (razão). As pesquisadoras do estudo, porém, informaram que possuíam interesse apenas em duas dessas respostas, a invasão celular relativa (razão) e a invasão/viabilidade (razão). A análise considerou então apenas essas duas respostas.

A comparação entre as médias de cada uma das respostas, invasão celular relativa (razão) e invasão/viabilidade (razão), nos diferentes tratamentos e dentro de cada linhagem, foi feita por meio de modelos de análise de variância com dois fatores fixos, um modelo para cada resposta. Vale lembrar que o ensaio de invasão com inserto Transwell com Matrigel, foi conduzido apenas no par de linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R. Assim, para cada resposta, ajustamos apenas um modelo ANOVA.

Os fatores envolvidos são os mesmos do estudo de viabilidade, ou seja, tratamento, com 3 níveis (EcASNase, PLX4032, e o tratamento combinatório entre EcASNase e PLX4032) e a linhagem celular com 2 níveis (SK-MEL-28 e SK-MEL-28R).

O modelo supõe que os erros são independentes, com distribuição normal com média zero e variância constante (KUTNER; NACHTSHEIM; NETER, 2005).

Começamos a análise com o modelo ANOVA para a invasão celular relativa (razão).

Os resultados obtidos na ANOVA com a invasão celular relativa (razão) como variável resposta são encontrados na Tabela A.30 e indicam, ao nível de significância de 5% que há efeito de interação entre os dois fatores (valor-p $<0,001$), ou seja, a diferença entre as médias da invasão celular relativa (razão) nos tratamentos dependem da linhagem.

Partindo para a análise de resíduos do modelo, podemos ver na Figura B.23 os gráficos dos resíduos padronizados por valores ajustados e dos resíduos padronizados e os quantis teóricos da normal padrão, com um envelope de confiança de 95%.

No primeiro gráfico, vemos que os resíduos aparecem distribuídos aleatoriamente, sem tendência aparentes na nuvem de pontos, sugerindo não haver fuga da suposição de homocedasticidade. No segundo gráfico, notamos que os pontos ficam perto da reta, e todos os pontos caem dentro do envelope de confiança, sugerindo que não há fuga da normalidade.

Prosseguimos então a análise com o objetivo de localizar as diferenças entre as médias da Invasão Celular Relativa (razão) nos tratamentos por meio do método de Bonferroni (KUTNER; NACHTSHEIM; NETER, 2005).

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela A.31, e indicam que na linhagem sensível:

- não há diferença entre as médias da invasão celular relativa (razão) nos tratamentos EcASNase e PLX4032 (valor-p = 0,409);
- há diferença entre as médias da invasão celular relativa (razão) nos tratamentos EcASNase e Combinatório (valor-p = 0,045) sendo a média no EcASNase maior que no Combinatório;
- não há diferença entre as médias da invasão celular relativa (razão) nos tratamentos PLX4032 e Combinatório (valor-p >0,999).

Para a linhagem resistente, as conclusões foram:

- há diferença entre as médias da invasão celular relativa (razão) nos tratamentos EcASNase e PLX4032 (valor-p <0,001), sendo a média da PLX4032 maior do que na EcASNase;
- há diferença entre as médias da invasão celular relativa (razão) nos tratamentos EcASNase e Combinatório (valor-p = 0,015), sendo a média do Combinatório maior do que na EcASNase;
- há diferença entre as médias da invasão celular relativa (razão) nos tratamentos PLX4032 e Combinatório (valor-p = 0,023) sendo a média no PLX4032 maior que no Combinatório.

Na Tabela A.32 são encontrados os resultados obtidos na ANOVA considerando invasão/viabilidade (razão) como variável resposta. Notamos que há efeito significativo de interação entre tratamento e linhagem, ao nível de significância de 5% (valor-p < 0,001), ou seja, a diferença entre as médias da invasão/viabilidade (razão) nos tratamentos depende da linhagem.

Os gráficos de resíduos apresentados na Figura B.24 indicam que não há desvios grosseiros das suposições do modelo.

Os resultados obtidos nas comparações das médias da invasão/viabilidade (razão) duas a duas, em cada linhagem, pelo método de Bonferroni (KUTNER; NACHTSHEIM; NETER, 2005), são encontrados na Tabela A.33, e indicam que, na linhagem sensível:

- não há diferença entre as médias da invasão/viabilidade (razão) nos tratamentos EcASNase e PLX4032 (valor-p = 0,637);

- há diferença entre as médias da invasão/viabilidade (razão) nos tratamentos EcASNase e Combinatório (valor-p = 0,048) sendo a média no EcASNase maior que no Combinatório;
- não há diferença entre as médias da invasão/viabilidade (razão) nos tratamentos PLX4032 e Combinatório (valor-p >0,999).

Para a linhagem resistente, as conclusões foram:

- há diferença entre as médias da invasão/viabilidade (razão) nos tratamentos EcASNase e PLX4032 (valor-p <0,001), sendo a média da PLX4032 maior do que na EcASNase;
- há diferença entre as médias da invasão/viabilidade (razão) nos tratamentos EcASNase e Combinatório (valor-p = 0,008), sendo a média do Combinatório maior do que na EcASNase;
- há diferença entre as médias da invasão/viabilidade (razão) nos tratamentos PLX4032 e Combinatório (valor-p = 0,029) sendo a média no PLX4032 maior que no Combinatório.

6.5. Esferóide tumoral tridimensional sem Matrigel

Para avaliar o efeito das diferentes drogas sobre a área total relativa dos esferóides, foram ajustados dois modelos lineares mistos: um para a linhagem WM164 e outro para a linhagem WM164R. Ambos os modelos incluíram os seguintes efeitos:

- Efeito fixo do tratamento;
- Efeito fixo do tempo;
- Efeito de interação entre tratamento e tempo;
- Efeito aleatório do experimento.

Os modelos lineares mistos assumem que (FITZMAURICE; LAIRD; WARE, 2011):

- Os erros aleatórios seguem uma distribuição normal com média zero e variância constante σ^2_e ;

- Os efeitos aleatórios seguem uma distribuição normal com média zero e variância constante σ^2_b ;
- Os erros e os efeitos aleatórios são independentes entre si.

A análise foi conduzida seguindo o seguinte fluxo: ajuste do modelo, avaliação da qualidade do ajuste por meio da análise dos resíduos e dos efeitos aleatórios, e, uma vez satisfeitas as suposições, realização de testes post-hoc (comparações múltiplas) por meio do procedimento de Bonferroni.

6.5.1. Esferóide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164

A Tabela A.34 exibe a tabela de análise de variância (ANOVA) obtida no ajuste do modelo linear misto para a área total relativa da esfera na linhagem WM164, que denominaremos de modelo 1. Segundo ela, nota-se que há efeito de interação de tratamento e tempo (valor-p < 0,001), indicando que o efeito do tratamento na área total relativa da esfera depende do tempo.

A análise de resíduos do modelo 1 ajustado indicou violação da suposição de homocedasticidade dos resíduos, como é possível observar na Figura B.25 em que a dispersão dos resíduos padronizados é menor para os tratamentos Combinatório e PLX4032 em comparação ao tratamento Controle e ao tratamento EcASNase. Além disso, a suposição de normalidade também parece ser violada (Figura B.26) com a presença de caudas mais pesadas.

Já a análise dos efeitos aleatórios não parece indicar violação da suposição de normalidade (Figura B.27) dos efeitos aleatórios, mas temos a violação da suposição de homocedasticidade dos efeitos aleatórios (Figura B.28). Em especial, nota-se que o efeito aleatório do Experimento 2 realizado na aplicação do tratamento Controle possui um valor muito maior que os demais.

Diante dessas violações, foi ajustado um modelo misto heterocedástico para permitir que as variâncias dos erros sejam diferentes em cada tratamento, que denominaremos de modelo 2. A Tabela A.35 exibe a tabela de ANOVA obtido no ajuste do modelo 2 e apontam que há efeito de interação de tratamento e tempo

(valor- $p < 0,001$). Além disso, no teste de razão de verossimilhanças indicou que o modelo heterocedástico (modelo 2) ajusta melhor os dados (valor- $p < 0,001$).

A análise de resíduos do modelo 2 não indicou violações graves das suposições de homocedasticidade (Figuras B.29 e B.30) ou normalidade dos resíduos (Figura B.31).

As Figuras B.32 e B.33 são os gráficos de diagnóstico para análise das suposições de efeitos aleatórios. A Figura B.32 mostra que os efeitos aleatórios não violam a normalidade, exceto pela observação indicada por 2 que está associada ao Experimento 2 do tratamento Controle. A Figura B.33 indica que houve violação da suposição de homocedasticidade dos efeitos aleatórios que também pode ser atribuída, em grande parte, ao Experimento 2 associado ao tratamento Controle.

Com o objetivo de verificar a robustez do modelo heterocedástico em relação a essas observações, foi realizada uma análise de sensibilidade ajustando um novo modelo heterocedástico após a exclusão das observações do experimento 2 do grupo Controle, que denominaremos de modelo 3 e cujos gráficos de diagnóstico são mostrados nas Figuras B.34 a B.37. A Tabela A.37 mostra a tabela de ANOVA do modelo 3 e indica que a interação entre tratamento e tempo permaneceu significativa (valor- $p < 0,001$).

O modelo 2 (modelo heterocedástico com todas as observações) e o modelo 3 (modelo heterocedástico ajustado sem as observações do experimento 2 do Controle) levaram às mesmas conclusões, indicando que o primeiro é robusto a essas observações atípicas. Assim, o modelo heterocedástico com todas as observações (modelo 2) foi adotado como modelo final.

Com base no modelo final, foram realizadas comparações múltiplas entre os tratamentos, ajustadas pelo método de Bonferroni, com o objetivo de comparar as médias dos tratamentos duas a duas, em cada tempo. Os resultados estão apresentados na Tabela A.36 e as interpretações são descritas abaixo.

Com base na Tabela A.36 conclui-se que para o tempo 24h que:

- EcASNase é mais eficaz do que o Controle (valor- $p = 0,035$);

- Combinatório é mais eficaz do que o Controle (valor-p = 0,010);
- PLX4032 é mais eficaz do que o Controle (p=0,025);
- EcASNase e Combinatório não tem diferenças significativas entre si (valor-p >0,999);
- EcASNase e PLX4032 não tem diferenças significativas entre si (valor-p = 0,999);
- PLX4032 e Combinatório não tem diferenças significativas entre si (valor-p > 0.999).

Para o tempo 48h:

- EcASNase é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- Combinatório é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- PLX4032 é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- EcASNase e Combinatório não tem diferenças significativas entre si (valor-p = 0,322)
- EcASNase e PLX4032 não tem diferenças significativas entre si (valor-p > 0,999);
- PLX4032 e Combinatório não tem diferenças significativas entre si (valor-p > 0.999).

Para o tempo 72h:

- EcASNase é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- Combinatório é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- PLX4032 é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- Combinatório é mais eficaz do que EcASNase (valor-p = 0,019)
- EcASNase e PLX4032 não tem diferenças significativas entre si (valor-p = 0,092);
- PLX4032 e Combinatório não tem diferenças significativas entre si (valor-p > 0,999).

Já para o tempo 96h:

- EcASNase é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- Combinatório é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);

- PLX4032 é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- Combinatório é mais eficaz do que o EcASNase (valor-p = 0,002);
- PLX4032 é mais eficaz do que o EcASNase (valor-p = 0,005);
- Combinatório e PLX4032 não tem diferenças entre si (valor-p > 0,999).

Para o tempo 168h:

- EcASNase é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- Combinatório é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- PLX4032 é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- Combinatório é mais eficaz do que o EcASNase (valor-p < 0,001);
- PLX4032 é mais eficaz do que o EcASNase (valor-p < 0,001);
- Combinatório e PLX4032 não tem diferenças entre si (valor-p > 0,999).

6.5.2. Esferóide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164R

A Tabela A.37 exibe a tabela de ANOVA obtida no ajuste do modelo linear misto para a área total relativa da esfera na linhagem WM164. De acordo com ela, temos efeito de interação de tratamento e tempo (valor-p < 0,001), indicando que o efeito do tratamento na área total relativa da esfera depende do tempo.

A análise de resíduos do modelo ajustado não indicou violações graves das suposições do modelo. A Figura B.38 apresenta os valores observados da área total relativa da esfera versus os valores ajustados pelo modelo, e indica uma tendência linear que é esperado de um modelo bem ajustado. A Figura B.39 exibe o gráfico *qqplot* para a verificação da suposição de normalidade dos resíduos do modelo e não indica desvios grosseiros dessa suposição. As Figuras B.40 e B.41 exibem os resíduos padronizados versus valores ajustados e os resíduos padronizados versus valores ajustados pelo modelo misto para cada tratamento, indicando que não há violações graves da suposição de homocedasticidade, uma vez que os resíduos aparentam estar distribuídos em torno do zero e dispersão relativamente uniforme entre -2 e 2.

Similarmente, a análise dos efeitos aleatórios não indicou violações grosseiras das suposições do modelo (Figuras B.42 e B.43).

Dessa forma, considerando a interação significativa identificada pelo modelo e o seu bom ajuste, foram realizadas comparações múltiplas ajustadas pelo método de Bonferroni. Em cada tempo, os tratamentos foram comparados entre si, dois a dois, como mostrado na Tabela A.39.

Com base na Tabela A.39, observa-se que nos tempos de 24h e 72h não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. No tempo de 48h, apenas a comparação entre o tratamento Combinatório e o tratamento PLX4032 apresentou diferença significativa, indicando maior eficácia do tratamento Combinatório (valor-p = 0,036).

No tempo de 96h, o tratamento Combinatório mostrou-se mais eficaz tanto em relação ao Controle (valor-p = 0,022) quanto ao tratamento PLX4032 (valor-p = 0,024).

Por fim, no tempo de 168h tivemos 3 diferenças significativas:

- Combinatório é mais eficaz do que o Controle (valor-p = 0,014);
- EcASNase é mais eficaz do que o PLX4032 (valor-p = 0,010);
- Combinatório é mais eficaz do que o PLX4032 (valor-p = 0,002).

6.6. Esferóide tumoral tridimensional com Matrigel

Igualmente ao que foi feito no ensaio anterior, foram ajustados dois modelos lineares mistos: um para a linhagem WM164 e outro para a linhagem WM164R. Ambos os modelos incluíram os seguintes efeitos:

- Efeito fixo do tratamento;
- Efeito fixo do tempo;
- Efeito de interação entre tratamento e tempo;
- Efeito aleatório do experimento.

As suposições do modelo são as mesmas listadas na Seção 6.5.

A análise foi conduzida seguindo o seguinte fluxo: ajuste do modelo, avaliação da qualidade do ajuste por meio da análise dos resíduos e dos efeitos aleatórios, e,

uma vez satisfeitas as suposições, realização de testes post-hoc (comparações múltiplas) pelo método de Bonferroni.

6.6.1. Esferóide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164

A Tabela A.40 exibe a tabela de ANOVA obtida no ajuste do modelo linear misto para a área total relativa da esfera na linhagem WM164, mostrando que há efeito de interação de tratamento e tempo (valor- $p < 0,001$), isto é, indicando que o efeito do tratamento na área total relativa da esfera depende do tempo.

A análise de resíduos do modelo ajustado não indicou violações graves das suposições do modelo. A Figura B.44 apresenta os valores observados da área total relativa da esfera versus os valores ajustados pelo modelo, e indica uma tendência linear que é esperada de um modelo bem ajustado. A Figura B.47 exibe o gráfico *qqplot* para a verificação da suposição de normalidade dos resíduos do modelo e não indica desvios grosseiros dessa suposição. As Figuras B.45 e B.46 exibem os resíduos padronizados versus valores ajustados e os resíduos padronizados versus valores ajustados pelo modelo misto para cada tratamento, indicando que não há violações graves da suposição de homocedasticidade, uma vez que os resíduos aparentam estar distribuídos em torno do zero e dispersão relativamente uniforme entre -2 e 2.

Similarmente, a análise dos efeitos aleatórios não indicou desvios grosseiros das suposições, o que pode ser observado nas Figuras B.48 e B.49.

Dessa forma, para identificar em quais tempos os tratamentos diferem entre si, foram realizadas comparações múltiplas ajustadas pelo método de Bonferroni. Para cada tempo, temos as comparações das médias da área total relativa da esfera nos tratamentos duas a duas, conforme apresentado na Tabela A.41.

Com base na Tabela A.41 conclui-se que, para o tempo 24h:

- Combinatório é mais eficaz do que o Controle (valor- $p = 0,040$)

Já para o tempo 48h:

- EcASNase é mais eficaz do que o Controle (valor- $p = 0,003$);
- Combinatório é mais eficaz do que o Controle (valor- $p < 0,001$);

- PLX4032 é mais eficaz do que o Controle (valor-p = 0,001).

Para o tempo 72h:

- EcASNase é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- Combinatório é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- PLX4032 é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- Combinatório é mais eficaz do que o EcASNase (valor-p = 0,001);
- Combinatório é mais eficaz do que o PLX4032 (valor-p = 0,039).

Para o tempo 96h:

- EcASNase é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- Combinatório é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- PLX4032 é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- Combinatório é mais eficaz do que o EcASNase (valor-p < 0,001);
- PLX4032 é mais eficaz do que o EcASNase (valor-p = 0,009);
- Combinatório é mais eficaz do que PLX4032 (valor-p = 0,014).

Para o tempo 168h:

- EcASNase é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- Combinatório é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- PLX4032 é mais eficaz do que o Controle (valor-p < 0,001);
- Combinatório é mais eficaz do que o EcASNase (valor-p < 0,001);
- PLX4032 é mais eficaz do que o EcASNase (valor-p < 0,001);
- Combinatório é mais eficaz do que PLX4032 (valor-p = 0,002).

6.6.2. Esferóide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164R

A Tabela A.42 exibe a tabela de ANOVA obtida no ajuste do modelo linear misto para a área total relativa da esfera na linhagem WM164R e mostra que há efeito de interação de tratamento e tempo (valor-p < 0.001), indicando que o efeito do tratamento na área total relativa da esfera depende do tempo.

A análise de resíduos do modelo inicialmente ajustado indicou violação da suposição de homocedasticidade dos resíduos, como é possível observar na Figura B.50 em que a dispersão dos resíduos padronizados é menor para os tratamentos Combinatório e PLX4032 em comparação ao tratamento Controle e ao tratamento EcASNase. Além disso, a suposição de normalidade também parece ser violada

(Figura B.51) com a presença de caudas mais pesadas. Por fim, a análise dos efeitos aleatórios não parece indicar violação da suposição de normalidade (Figura B.52), mas a suposição de homocedasticidade (Figura B.53) dos efeitos aleatórios parece estar sendo violada devido ao efeito aleatório do Experimento 3 do tratamento EcASNase.

Diante dessas violações, foi ajustado um modelo misto heterocedástico para permitir que as variâncias dos erros sejam diferentes em cada tratamento. A Tabela A.43 exibe a tabela de ANOVA obtida no ajuste do modelo misto heterocedástico e aponta que há efeito de interação de tratamento e tempo (valor- $p < 0,001$). Além disso, no teste de razão de verossimilhanças indicou que o modelo heterocedástico ajusta melhor os dados (valor- $p = 0,001$).

A análise de resíduos do modelo heterocedástico não indicou violações graves das suposições de homocedasticidade (Figuras B.54 e B.55) nem da normalidade dos resíduos (Figura B.56).

As Figuras B.57 e B.58 mostram os gráficos de diagnóstico para análise das suposições de efeitos aleatórios e não indicam desvios grosseiros das suposições do modelo.

Dessa forma, utilizando o modelo heterocedástico foram realizadas comparações múltiplas ajustadas pelo método de Bonferroni para identificar em quais tempos os tratamentos diferem entre si, mostradas na Tabela A.44. Para cada tempo, temos as comparações dois a dois entre os tratamentos.

Com base na Tabela A.44 temos que, para os tempos 24h, 48h e 72h não há diferença significativa entre as médias da área total relativa da esfera nos tratamentos. Já para o tempo 96h, a única diferença significativa foi a do Combinatório com o EcASNase, indicando que o tratamento Combinatório é mais eficaz do que o EcASNase (valor- $p = 0,017$).

Por fim, para o tempo 168h, temos que:

- Combinatório é mais eficaz do que o Controle (valor- $p < 0,001$);
- Combinatório é mais eficaz do que o EcASNase (valor- $p = 0,002$);
- Combinatório é mais eficaz do que PLX4032 (valor- $p = 0,013$).

7. Conclusões

No ensaio de viabilidade celular por MTT, temos que as conclusões acerca da análise comparativa variam segundo a linhagem (sensível ou resistente) considerada. Na linhagem sensível, conclui-se que o tratamento combinatório apresenta maior eficácia na redução da viabilidade celular em comparação aos tratamentos isolados, indicando possível efeito aditivo entre as drogas. Já na linhagem resistente, a EcASNase isolada demonstrou maior eficácia do que o PLX4032, enquanto isso, o tratamento combinatório apresentou eficácia semelhante à da EcASNase isolada e eficácia superior à do PLX4032, indicando que embora não haja evidência de efeito sinérgico entre as drogas, temos que a associação com PLX4032 não compromete a ação da EcASNase.

No ensaio da ferida, as conclusões também variam de acordo com a linhagem analisada. Na linhagem sensível, os resultados indicam que todos os tratamentos (isolados e o combinatório) possuem a mesma eficácia na inibição do fechamento da ferida. Já na linhagem resistente, conclui-se que nem os tratamentos isolados nem o tratamento combinatório são capazes de inibir o fechamento da ferida.

No ensaio de migração celular, não foram identificadas evidências de diferenças entre os tratamentos, indicando que as drogas não apresentam efeito na diminuição da migração celular da linhagem resistente (SK-MEL-28R).

Nos ensaios de invasão com inserto Transwell, as conclusões variam entre as linhagens. Temos que para a linhagem sensível, não é possível afirmar a superioridade de uma droga em relação à outra de forma clara, apesar de haver indícios de maior eficácia do tratamento combinatório em relação ao EcASNase isolado. Já para a linhagem resistente, conclui-se que o EcASNase isolado é o tratamento mais eficaz na redução da invasão celular, seguido pelo tratamento combinatório e, por último, pelo PLX4032 isolado, o que indica que a associação entre as drogas atenua o efeito inibitório da EcASNase e sugerindo uma possível interferência negativa do PLX4032 quando administrado em combinação ao PLX4032.

Nos ensaios de esferóide tridimensional sem Matrigel, observou-se que, na linhagem sensível, todos os tratamentos (isolados e combinatório) se apresentam eficazes já a partir de 24h. Além disso, verifica-se que o tratamento combinatório e o PLX-4032 apresentam eficácia semelhante ao longo do tempo, enquanto o PLX-4032 foi mais eficaz que a EcASNase isolada a partir de 96h.

Já na linhagem resistente do ensaio de esferóide tridimensional sem Matrigel, o tratamento combinado superou o PLX-4032 a partir de 96h, e a EcASNase foi mais eficaz do que o PLX4032 isolado apenas no tempo de 168h.

No ensaio de esferóide tridimensional com Matrigel, conclui-se para a linhagem sensível que os tratamentos (isolados e combinatório) são todos eficazes a partir de 72h e, além disso, o tratamento combinatório é mais eficaz que ambos os tratamentos isolados a partir de 96h.

Já na linhagem resistente, apenas o tratamento combinatório se mostrou eficaz, com efeito observado apenas a partir de 168h, sugerindo um possível mecanismo de interação entre as drogas que confere eficácia à combinação e que está ausente nos tratamentos isolados.

Apêndice A

Tabelas

Tabela A.1 - Medidas resumo da Viabilidade celular relativa (%) no ensaio viabilidade por MMT, nas linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R e da diferença entre as viabilidades nas linhagens SK-MEL-28R e SK-MEL-28, por concentração do tratamento PLX4032.

Trat	Conc	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
PLX4032	0,01 (μM)	SK-MEL-28	3	89,97	3,00	87,01	94,09
		SK-MEL-28R	3	86,77	1,02	85,48	87,99
		Diferença	3	-3,20	2,89	-7,26	-0,81
	0,03 (μM)	SK-MEL-28	3	91,58	2,88	88,22	95,26
		SK-MEL-28R	3	91,23	8,45	79,30	97,61
		Diferença	3	-0,35	11,08	-15,97	-8,57
	0,1 (μM)	SK-MEL-28	3	72,96	15,22	55,08	92,27
		SK-MEL-28R	3	92,52	6,23	85,43	100,60
		Diferença	3	19,56	18,91	-6,83	36,45
	0,3 (μM)	SK-MEL-28	3	43,35	5,28	37,14	50,04
		SK-MEL-28R	3	94,75	2,84	91,33	98,27
		Diferença	3	51,40	8,11	41,29	61,13
	1 (μM)	SK-MEL-28	3	23,16	5,07	18,44	30,20
		SK-MEL-28R	3	104,38	15,86	90,58	126,60
		Diferença	3	81,22	10,80	72,14	96,39
	3 (μM)	SK-MEL-28	3	15,17	2,88	11,85	18,87
		SK-MEL-28R	3	103,11	6,42	94,23	109,14
		Diferença	3	87,94	7,32	79,42	97,29

Tabela A.2 - Medidas resumo da Viabilidade celular relativa (%) no ensaio viabilidade por MMT, nas linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R e da diferença entre as viabilidades nas linhagens SK-MEL-28R e SK-MEL-28, por concentração do tratamento EcASNase.

Trat	Conc	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
EcASNase	0,02 (μ M)	SK-MEL-28	3	100,1	6,56	92,72	108,67
		SK-MEL-28R	3	97,62	13,92	79,19	112,82
		Diferença	3	-2,48	7,86	-13,53	4,15
	0,05 (μ M)	SK-MEL-28	3	88,09	7,35	77,88	94,88
		SK-MEL-28R	3	95,46	19,35	74,73	121,29
		Diferença	3	7,37	15,86	-4,52	29,79
	0,2 (μ M)	SK-MEL-28	3	68,11	4,5	62,06	72,84
		SK-MEL-28R	3	58,28	9,45	47,77	70,67
		Diferença	3	-9,83	5,44	-14,3	-2,16
	0,5 (μ M)	SK-MEL-28	3	18,02	3,36	14,86	22,68
		SK-MEL-28R	3	26,26	5,16	18,99	30,40
		Diferença	3	8,23	4,13	4,12	13,88
	2 (μ M)	SK-MEL-28	3	10,76	2,19	7,71	12,76
		SK-MEL-28R	3	15,64	4,94	10,19	22,15
		Diferença	3	4,89	3,18	2,48	9,38
	5 (μ M)	SK-MEL-28	3	9,38	1,95	6,82	11,54
		SK-MEL-28R	3	15,49	6,18	7,59	22,69
		Diferença	3	6,11	5,06	0,76	12,91

Tabela A.3 - Medidas resumo da Viabilidade celular relativa (%) no ensaio viabilidade por MMT, nas linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R e da diferença entre as viabilidades nas linhagens SK-MEL-28R e SK-MEL-28, por concentração do tratamento ErASNase.

Trat	Conc	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
ErASNase	0,002 (μM)	SK-MEL-28	3	102,38	8,46	93,66	113,83
		SK-MEL-28R	3	98,01	3,98	93,73	103,32
		Diferença	3	-4,37	8,95	-16,85	3,68
	0,005 (μM)	SK-MEL-28	3	92,45	5,58	84,78	97,89
		SK-MEL-28R	3	99,44	5,23	93,85	106,43
		Diferença	3	6,99	4,95	0,15	11,74
	0,02 (μM)	SK-MEL-28	3	54,24	16,26	34,76	74,55
		SK-MEL-28R	3	50,28	4,61	44,50	55,79
		Diferença	3	-3,96	11,66	-18,76	9,75
	0,05 (μM)	SK-MEL-28	3	13,59	1,85	11,47	15,97
		SK-MEL-28R	3	22,25	2,59	19,42	25,67
		Diferença	3	8,67	2,77	5,69	12,36
	0,2 (μM)	SK-MEL-28	3	9,26	1,15	8,20	10,85
		SK-MEL-28R	3	14,59	0,86	13,44	15,51
		Diferença	3	5,33	1,16	3,96	6,79
	2 (μM)	SK-MEL-28	3	9,57	1,41	7,83	11,29
		SK-MEL-28R	3	13,12	1,86	10,85	15,40
		Diferença	3	3,54	2,82	-0,43	5,80

Tabela A.4 - Medidas resumo da Viabilidade celular relativa (%) no ensaio viabilidade por MMT, nas linhagens WM164 e WM164R e da diferença entre as viabilidades nas linhagens WM164R e WM164, por concentração do tratamento PLX4032.

Trat	Conc	Linhagem	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
PLX4032	0,01 (μ M)	WM164	3	112,98	13,3	100,12	131,3
		WM164R	3	101,67	4,43	95,41	104,88
		Diferença	3	-11,31	12,81	-26,59	4,77
	0,03 (μ M)	WM164	3	107,96	10,44	94,37	119,77
		WM164R	3	103,67	4,54	97,62	108,54
		Diferença	3	-4,29	7,74	-14,93	3,25
	0,1 (μ M)	WM164	3	75,56	22,03	53,86	105,77
		WM164R	3	104,07	9,57	92,35	115,8
		Diferença	3	28,51	21,78	-1,72	48,75
	0,3 (μ M)	WM164	3	31,64	13,32	21,34	50,44
		WM164R	3	113,31	0,71	112,57	114,26
		Diferença	3	81,68	12,63	63,83	91,23
	1 (μ M)	WM164	3	18,55	5,70	10,58	23,61
		WM164R	3	118,19	4,49	111,85	121,64
		Diferença	3	99,64	9,09	88,24	110,49
	3 (μ M)	WM164	3	13,92	5,98	6,58	21,22
		WM164R	3	107,06	10,76	91,90	115,79
		Diferença	3	93,15	11,88	77,94	106,93

Tabela A.5 - Medidas resumo da Viabilidade celular relativa (%) no ensaio viabilidade por MMT, nas linhagens WM164 e WM164R e da diferença entre as viabilidades nas linhagens WM164R e WM164, por concentração do tratamento EcASNase.

Trat	Conc	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
EcASNase	0,02 (µM)	WM164	3	57,33	5,27	49,96	61,95
		WM164R	3	86,51	7,51	79,17	96,82
		Diferença	3	29,18	6,19	21,58	36,75
	0,05 (µM)	WM164	3	53,76	6,76	46,06	62,52
		WM164R	3	76,08	9,28	63,00	83,42
		Diferença	3	22,32	6,01	16,94	30,70
	0,2 (µM)	WM164	3	32,19	6,92	24,62	41,35
		WM164R	3	60,03	2,47	57,67	63,45
		Diferença	3	27,85	7,22	17,64	33,05
	0,5 (µM)	WM164	3	11,68	2,51	8,22	14,07
		WM164R	3	24,00	4,86	20,46	30,87
		Diferença	3	12,31	3,63	7,90	16,80
	2 (µM)	WM164	3	6,44	2,25	3,85	9,34
		WM164R	3	10,57	2,93	8,06	14,68
		Diferença	3	4,12	1,03	2,82	5,34
	5 (µM)	WM164	3	6,01	2,04	4,46	8,89
		WM164R	3	8,25	2,69	6,12	12,04
		Diferença	3	2,24	0,70	1,45	3,15

Tabela A.6 - Medidas resumo da Viabilidade celular relativa (%) no ensaio viabilidade por MMT, nas linhagens WM164 e WM164R e da diferença entre as viabilidades nas linhagens WM164R e WM164, por concentração do tratamento ErASNase.

Trat	Conc	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
ErASNase	0,002 (μ M)	WM164	3	90,44	2,46	88,44	93,9
		WM164R	2	87,27	5,93	81,34	93,19
		Diferença	2	-1,45	5,65	-7,10	4,20
	0,005 (μ M)	WM164	3	86,09	6,90	78,98	95,44
		WM164R	2	83,40	4,94	78,47	88,34
		Diferença	2	1,99	7,36	-5,37	9,35
	0,02 (μ M)	WM164	3	58,26	9,45	46,05	69,06
		WM164R	2	65,40	0,29	65,11	65,69
		Diferença	2	12,54	7,10	5,44	19,65
	0,05 (μ M)	WM164	3	21,11	4,62	16,00	27,19
		WM164R	2	38,50	0,10	38,40	38,60
		Diferença	2	20,43	2,18	18,25	22,60
	0,2 (μ M)	WM164	3	15,05	5,40	8,03	21,17
		WM164R	2	32,42	5,09	27,33	37,51
		Diferença	2	20,42	9,06	11,36	29,48
	2 (μ M)	WM164	3	15,96	7,81	6,30	25,42
		WM164R	2	25,25	2,36	22,89	27,61
		Diferença	2	14,02	7,29	6,73	21,31

Tabela A.7 - Medidas resumo da Viabilidade celular relativa (%) no ensaio comparativo de viabilidade por MMT, nas linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28 e da diferença entre as viabilidades nas linhagens SK-MEL-28R e SK-MEL-28, por tratamento.

Trat	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
EcASNase	SK-MEL-28	3	45,82	8,12	34,56	53,38
	SK-MEL-28R	3	57,87	2,37	55,22	60,98
	Diferença	3	12,05	10,18	4,03	26,42
PLX4032	SK-MEL-28	3	54,29	2,26	51,30	56,75
	SK-MEL-28R	3	96,22	2,46	93,79	99,60
	Diferença	3	41,93	2,59	38,52	44,78
EcASNase + PLX4032	SK-MEL-28	3	27,36	6,88	17,70	33,16
	SK-MEL-28R	3	55,56	2,64	52,18	58,63
	Diferença	3	28,20	4,84	22,71	34,48

Tabela A.8 - Medidas resumo da Viabilidade celular relativa (%) no ensaio comparativo de viabilidade por MMT, nas linhagens WM164 e WM164R e da diferença entre as viabilidades nas linhagens WM164R e WM164, por tratamento.

Trat	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
EcASNase	WM164	3	63,42	6,54	54,16	68,15
	WM164R	3	54,25	2,92	51,62	58,32
	Diferença	3	-9,17	9,44	-16,53	4,16
PLX4032	WM164	3	54,37	1,73	52,93	56,80
	WM164R	3	92,56	11,04	77,38	103,30
	Diferença	3	38,19	12,75	20,58	50,38
EcASNase + PLX4032	WM164	3	34,77	0,56	34,13	35,49
	WM164R	3	53,17	4,40	47,13	57,49
	Diferença	3	18,40	4,95	11,64	23,36

Tabela A.9 - Medidas resumo do Fechamento da ferida (% t0) no experimento de migração ensaio de ferida nas linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R e da diferença entre o Fechamento da ferida (% t0) nas linhagens SK-MEL-28R e SK-MEL-28, por tratamento.

Trat	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Controle	SK-MEL-28	3	75,96	5,34	70,34	83,14
	SK-MEL-28R	3	41,31	4,94	35,12	47,21
	Diferença	3	34,65	9,48	27,19	48,02
EcASNase	SK-MEL-28	3	54,73	3,38	51,33	59,34
	SK-MEL-28R	3	36,15	4,05	31,04	40,96
	Diferença	3	18,57	4,39	12,55	22,88
PLX4032	SK-MEL-28	3	52,35	2,56	48,85	54,9
	SK-MEL-28R	3	43,32	6,97	35,78	52,59
	Diferença	3	9,02	5,89	0,7	13,31
EcASNase + PLX4032	SK-MEL-28	3	39,77	2,32	37,43	42,94
	SK-MEL-28R	3	25,63	5,63	17,75	30,60
	Diferença	3	14,14	4,63	8,34	19,68

Tabela A.10 - Medidas resumo da Migração celular relativa (razão) no ensaio de migração transwell na linhagem SK-MEL-28R, por tratamento.

Trat	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Controle	SK-MEL-28R	3	1	0	1	1
EcASNase	SK-MEL-28R	3	1,03	0,16	0,9	1,26
PLX4032	SK-MEL-28R	3	1,11	0,12	0,98	1,26
EcASNase + PLX4032	SK-MEL-28R	3	0,75	0,17	0,51	0,91

Tabela A.11 - Medidas resumo da Invasão celular relativa (razão) no ensaio de invasão (Transwell com Matrigel) nas linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R e da diferença entre a Invasão celular relativa (razão) nas linhagens SK-MEL-28R e SK-MEL-28, por tratamento.

Trat	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
EcASNase	SK-MEL-28	3	0,25	0,10	0,17	0,40
	SK-MEL-28R	3	0,74	0,03	0,70	0,77
	Diferença	3	0,48	0,11	0,34	0,60
PLX4032	SK-MEL-28	3	0,13	0,03	0,10	0,16
	SK-MEL-28R	3	1,19	0,09	1,06	1,28
	Diferença	3	1,06	0,10	0,92	1,18
EcASNase + PLX4032	SK-MEL-28	3	0,06	0,01	0,05	0,07
	SK-MEL-28R	3	0,97	0,04	0,91	1,02
	Diferença	3	0,91	0,04	0,85	0,95

Tabela A.12 - Medidas resumo da Viabilidade celular relativa (razão) no ensaio de invasão (Transwell com Matrigel) nas linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R e da diferença entre a Viabilidade celular relativa (razão) nas linhagens SK-MEL-28R e SK-MEL-28, por tratamento.

Trat	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
EcASNase	SK-MEL-28	3	0,901	0,005	0,895	0,907
	SK-MEL-28R	3	0,920	0,014	0,907	0,940
	Diferença	3	0,020	0,019	0,000	0,045
PLX4032	SK-MEL-28	3	0,790	0,017	0,766	0,803
	SK-MEL-28R	3	0,915	0,021	0,886	0,937
	Diferença	3	0,125	0,035	0,084	0,170
EcASNase + PLX4032	SK-MEL-28	3	0,802	0,022	0,778	0,831
	SK-MEL-28R	3	0,905	0,022	0,874	0,926
	Diferença	3	0,103	0,033	0,077	0,149

Tabela A.13 - Medidas resumo da Invasão/Viabilidade (razão) no ensaio de invasão (Transwell com Matrigel) nas linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R e da diferença entre a Invasão/Viabilidade (razão) nas linhagens SK-MEL-28R e SK-MEL-28, por tratamento.

Trat	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
EcASNase	SK-MEL-28	3	0,282	0,109	0,191	0,436
	SK-MEL-28R	3	0,800	0,023	0,768	0,823
	Diferença	3	0,518	0,108	0,373	0,632
PLX4032	SK-MEL-28	3	0,167	0,031	0,128	0,204
	SK-MEL-28R	3	1,299	0,107	1,148	1,384
	Diferença	3	1,132	0,110	0,979	1,237
EcASNase + PLX4032	SK-MEL-28	3	0,072	0,010	0,059	0,084
	SK-MEL-28R	3	1,072	0,033	1,043	1,117
	Diferença	3	0,999	0,026	0,969	1,033

Tabela A.14 - Medidas resumo da Área total relativa (% t0) no ensaio de esferoide tumoral tridimensional sem matrigel, nas linhagens WM164 e WM164R e da diferença entre a Área total relativa (% t0) nas linhagens WM164R e WM164, nos diferentes instantes de tempo do tratamento Controle.

Trat	Tempo	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Controle	24h	WM164	3	141,99	4,73	137,73	148,58
		WM164R	3	93,31	3,48	88,39	95,95
		Diferença	3	-48,68	8,17	-60,19	-42,15
	48h	WM164	3	188,35	11,08	178,03	203,78
		WM164R	3	94,00	4,19	88,38	98,44
		Diferença	3	-94,35	14,9	-115,4	-83,12
	72h	WM164	3	234,00	14,02	224,03	253,84
		WM164R	3	98,47	5,57	90,85	103,99
		Diferença		-135,53	19,47	-162,99	-120,04
	96h	WM164	3	271,2	19,63	256,57	298,95
		WM164R	3	99,88	7,15	90,53	107,88
		Diferença	3	-171,32	26,44	-208,42	-148,69
	168h	WM164	3	358,59	24,03	335,40	391,69
		WM164R	3	94,26	6,13	86,67	101,69
		Diferença	3	-264,33	29,97	-305,02	-233,71

Tabela A.15 - Medidas resumo da Área total relativa (% t0) no ensaio de esferoide tumoral tridimensional sem matrigel, nas linhagens WM164 e WM164R e da diferença entre a Área total relativa (% t0) nas linhagens WM164R e WM164, nos diferentes instantes de tempo do tratamento EcASNase.

Trat	Tempo	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
EcASNase	24h	WM164	3	93,83	2,09	91,16	96,26
		WM164R	3	88,48	3,38	83,87	91,89
		Diferença	3	-5,35	5,40	-12,39	0,73
	48h	WM164	3	99,49	2,94	96,66	103,55
		WM164R	3	84,03	4,51	77,80	88,30
		Diferença	3	-15,46	5,15	-20,46	-8,37
	72h	WM164	3	108,12	7,64	101,68	115,39
		WM164R	3	82,34	5,13	75,55	87,96
		Diferença		-25,78	5,14	-31,89	-19,32
	96h	WM164	3	118,66	7,64	108,92	127,57
		WM164R	3	81,60	3,87	78,16	87,01
		Diferença	3	-37,07	7,72	-47,94	-30,77
	168h	WM164	3	160,79	13,62	141,56	171,25
		WM164R	3	77,29	7,63	70,98	88,02
		Diferença	3	-83,51	11,44	-98,39	-70,58

Tabela A.16 - Medidas resumo da Área total relativa (% t0) no ensaio de esferoide tumoral tridimensional sem matrigel, nas linhagens WM164 e WM164R e da diferença entre a Área total relativa (% t0) nas linhagens WM164R e WM164, nos diferentes instantes de tempo do tratamento PLX4032.

Trat	Tempo	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
PLX4032	24h	WM164	3	95,31	1,15	93,98	96,78
		WM164R	3	92,14	0,96	90,93	93,29
		Diferença	3	-3,16	1,04	-4,24	-1,76
	48h	WM164	3	81,36	3,19	77,78	85,53
		WM164R	3	102,53	2,58	100,59	106,18
		Diferença	3	21,17	1,18	20,05	22,81
	72h	WM164	3	75,10	4,58	69,77	80,96
		WM164R	3	97,55	2,69	93,78	99,96
		Diferença	3	22,45	3,23	17,95	25,39
	96h	WM164	3	65,61	3,47	61,89	70,24
		WM164R	3	99,61	3,91	94,16	103,10
		Diferença	3	34,00	2,05	32,27	36,88
	168h	WM164	3	52,49	5,08	45,69	57,91
		WM164R	3	104,27	7,78	93,61	111,93
		Diferença	3	51,78	4,48	47,92	58,05

Tabela A.17 - Medidas resumo da Área total relativa (% t0) no ensaio de esferoide tumoral tridimensional sem matrigel, nas linhagens WM164 e WM164R e da diferença entre a Área total relativa (% t0) nas linhagens WM164R e WM164, nos diferentes instantes de tempo do tratamento EcASNase + PLX4032.

Trat	Tempo	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
EcASNase + PLX4032	24h	WM164	3	88,56	0,59	87,76	89,15
		WM164R	3	85,88	2,52	82,61	88,73
		Diferença	3	-2,68	2,50	-6,16	-0,43
	48h	WM164	3	73,65	2,51	71,58	77,18
		WM164R	3	80,35	4,03	74,76	84,12
		Diferença	3	6,71	6,48	-2,42	11,94
	72h	WM164	3	82,34	5,13	75,55	87,96
		WM164R	3	78,98	2,37	75,98	81,77
		Diferença	3	13,31	3,84	7,95	16,77
	96h	WM164	3	57,16	1,71	54,77	58,68
		WM164R	3	76,02	1,78	74,17	78,43
		Diferença	3	18,86	3,49	15,49	23,66
	168h	WM164	3	44,19	2,37	42,47	47,54
		WM164R	3	68,68	2,49	65,71	71,80
		Diferença	3	24,49	4,68	18,17	29,33

Tabela A.18 - Medidas resumo da Área total relativa (% t0) no ensaio de esferóide tumoral tridimensional com matrigel, nas linhagens WM164 e WM164R e da diferença entre a Área total relativa (% t0) nas linhagens WM164R e WM164, nos diferentes instantes de tempo do tratamento Controle.

Trat	Tempo	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Controle	24h	WM164	3	160,27	3,54	156,19	164,82
		WM164R	3	146,46	2,07	143,81	148,85
		Diferença	3	-13,81	3,08	-18,09	-10,97
	48h	WM164	3	237,17	8,39	225,88	245,98
		WM164R	3	203,02	6,72	194,83	211,28
		Diferença	3	-34,15	6,38	-43,03	-28,35
	72h	WM164	3	315,45	12,11	298,34	324,65
		WM164R	3	227,28	11,12	298,34	242,39
		Diferença		-88,17	9,20	-101,16	-80,97
	96h	WM164	3	386,99	10,45	373,73	399,27
		WM164R	3	246,30	19,08	222,19	268,85
		Diferença	3	-140,69	15,25	-151,54	-119,12
	168h	WM164	3	612,03	19,35	590,31	637,30
		WM164R	3	325,69	43,83	270,57	377,81
		Diferença	3	-286,33	39,63	-319,74	-230,66

Tabela A.19 - Medidas resumo da Área total relativa (% t0) no ensaio de esferoide tumoral tridimensional com matrigel, nas linhagens WM164 e WM164R e da diferença entre a Área total relativa (% t0) nas linhagens WM164R e WM164, nos diferentes instantes de tempo do tratamento EcASNase.

Trat	Tempo	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
EcASNase	24h	WM164	3	125,41	0,81	124,47	126,45
		WM164R	3	135,12	9,99	125,76	148,96
		Diferença	3	9,70	10,57	0,43	24,50
	48h	WM164	3	160,75	4,04	156,79	166,29
		WM164R	3	186,33	21,71	163,00	215,29
		Diferença	3	25,58	21,85	6,21	56,12
	72h	WM164	3	198,21	6,55	188,99	203,55
		WM164R	3	236,32	29,73	208,47	277,52
		Diferença		38,11	36,05	6,37	88,53
	96h	WM164	3	234,19	10,55	219,35	242,93
		WM164R	3	282,82	38,31	245,72	335,56
		Diferença	3	48,63	48,4	5,43	116,21
	168h	WM164	3	307,92	10,16	297,65	321,76
		WM164R	3	316,19	55,75	262,27	392,97
		Diferença	3	8,27	61,81	-42,09	95,32

Tabela A.20 - Medidas resumo da Área total relativa (% t0) no ensaio de esferoide tumoral tridimensional com matrigel, nas linhagens WM164 e WM164R e da diferença entre a Área total relativa (% t0) nas linhagens WM164R e WM164, nos diferentes instantes de tempo do tratamento PLX4032.

Trat	Tempo	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
PLX4032	24h	WM164	3	177,05	8,19	129,21	149,00
		WM164R	3	146,54	8,12	135,08	152,89
		Diferença	3	8,37	5,01	3,89	15,36
	48h	WM164	3	151,95	14,18	133,33	167,71
		WM164R	3	183,55	17,98	158,52	199,96
		Diferença	3	31,61	9,59	24,47	45,16
	72h	WM164	3	162,49	16,46	140,60	180,30
		WM164R	3	198,73	14,76	181,33	217,43
		Diferença	3	36,24	14,13	17,14	50,85
	96h	WM164	3	169,94	14,23	151,96	186,76
		WM164R	3	212,66	13,19	195,69	227,86
		Diferença	3	42,72	11,90	27,66	56,76
	168h	WM164	3	177,05	11,51	165,76	192,85
		WM164R	3	247,69	10,17	234,73	259,57
		Diferença	3	70,65	12,74	55,95	87,03

Tabela A.21 - Medidas resumo da Área total relativa (% t0) no ensaio de esferoide tumoral tridimensional com matrigel, nas linhagens WM164 e WM164R e da diferença entre a Área total relativa (% t0) nas linhagens WM164R e WM164, nos diferentes instantes de tempo do tratamento EcASNase + PLX4032.

Trat	Tempo	Linhagem	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
EcASNase + PLX4032	24h	WM164	3	109,15	7,81	98,53	117,10
		WM164R	3	139,07	9,22	131,06	151,99
		Diferença	3	29,92	7,56	19,24	35,63
	48h	WM164	3	112,90	10,87	98,74	125,17
		WM164R	3	165,62	19,11	142,07	188,88
		Diferença	3	52,72	8,40	43,33	63,71
	72h	WM164	3	111,08	10,47	98,27	123,93
		WM164R	3	162,59	20,82	134,80	184,92
		Diferença	3	51,51	10,72	36,53	60,99
	96h	WM164	3	109,71	8,92	98,73	120,57
		WM164R	3	156,23	19,33	130,93	177,86
		Diferença	3	46,53	10,55	32,20	57,29
	168h	WM164	3	98,96	5,16	94,03	106,09
		WM164R	3	135,38	11,19	122,22	149,57
		Diferença	3	36,42	6,30	28,18	43,48

Tabela A.22 -Tabela de ANOVA no ensaio de viabilidade para as linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R.

Efeito	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Estatística do teste	Valor-p
Linhagem	1	3376	3376	98,583	<0,001
Tratamento	2	3595	1798	52,484	<0,001
Linhagem:Tratamento	2	671	336	9,801	0,003
Resíduos	12	411	34	-	-

Tabela A.23 - Comparações múltiplas entre as médias da Viabilidade celular relativa (%) nos tratamentos pelo método de Bonferroni nas linhagens SK-MEL-28 (Sensível) e SK-MEL-28R(Resistente).

Linhagem	Comparação	Estimativa da diferença	Erro-padrão	Estatística do teste	Valor-p
Sensível	EcASNase - Combinatório	18,46	4,78	3,863	0,014
	EcASNase – PLX4032	-8,47	4,78	-1,772	0,611
	Combinatório - PLX4032	-26,92	4,78	-5,634	<0,001
Resistente	EcASNase – Combinatório	2,31	4,78	0,483	>0.999
	EcASNase – PLX4032	-38,35	4,78	-8,026	<0,001
	Combinatório - PLX4032	-40,66	4,78	-8,509	<0,001

Tabela A.24 - Tabela de ANOVA do ensaio de viabilidade para as linhagens WM164 e WM164R.

Efeito	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Estatística do teste	Valor-p
Linhagem	1	1124,2	1124,2	22,97	<0,001
Tratamento	2	2609,1	1304,5	26,65	<0,001
Linhagem:Tratamento	2	1696,7	848,4	17,33	<0,001
Resíduos	12	587,3	48,9	-	-

Tabela A.25 - Tabela de ANOVA no ensaio de viabilidade para as linhagens WM164 e WM164R, sem as observações 4 e 11.

Efeito	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Estatística do teste	Valor-p
Linhagem	1	885,5	885,5	78,00	<0,001
Tratamento	2	2503,7	1251,9	110,27	<0,001
Linhagem:Tratamento	2	2134,5	1067,1	93,99	<0,001
Resíduos	10	113,5	11,4	-	-

Tabela A.26 - Comparações múltiplas entre as médias da Viabilidade celular relativa (%) nos tratamentos pelo método de Bonferroni nas linhagens WM164 (Sensível) e WM164R(Resistente).

Linhagem	Comparação	Estimativa da diferença	Erro-padrão	Estatística do teste	Valor-p
Sensível	EcASNase - Combinatório	28,64	5,71	5,014	0,002
	EcASNase – PLX4032	9,05	5,71	1,584	0,835
	Combinatório - PLX4032	-19,59	5,71	-3,430	0,030
Resistente	EcASNase – Combinatório	1,08	5,71	0,189	>0,999
	EcASNase – PLX4032	-38,30	5,71	-6,706	<0,001
	Combinatório - PLX4032	-39,39	5,71	-6,895	<0,001

Tabela A.27 - Tabela de ANOVA da migração ensaio de ferida, para as linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R.

Efeito	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados médios	Estatística do teste	Valor-p
Linhagem	1	2188	2188	67,441	<0,001
Tratamento	3	2040,8	680,3	20,969	<0,001
Linhagem:Tratamento	3	552,2	184,1	5,674	0,0077
Resíduos	16	519,1	32,4	-	-

Tabela A.28 - Comparações múltiplas entre as médias do Fechamento da ferida (% t0) nos tratamentos pelo método de Bonferroni nas linhagens SK-MEL-28 (Sensível) e SK-MEL-28R(Resistente).

Linhagem	Comparação	Estimativa da diferença	Erro-padrão	Estatística do teste	Valor-p
Sensível	Controle - EcASNase	21,23	4,65	4,566	0,004
	Controle - Combinatório	36,19	4,65	7,782	<0,001
	Controle - PLX4032	23,62	4,65	5,078	0,001
	EcASNase - Combinatório	14,96	4,65	3,216	0,065
	EcASNase - PLX4032	2,38	4,65	0,512	>0,999
	Combinatório - PLX4032	-12,58	4,65	-2,704	0,188
Resistente	Controle - EcASNase	5,16	4,65	1,11	>0,999
	Controle - Combinatório	15,68	4,65	3,372	0,047
	Controle - PLX4032	-2,01	4,65	-0,432	>0,999
	EcASNase - Combinatório	10,52	4,65	2,262	0,456
	EcASNase - PLX4032	-7,17	4,65	-1,542	>0,999
	Combinatório - PLX4032	-17,69	4,65	-3,803	0,019

Tabela A.29 - Tabela de ANOVA no ensaio de migração com inserto de Transwell para as linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R.

Efeito	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados médios	Estatística do teste	Valor-p
Tratamento	2	0,2174	0,10871	3,191	0,114
Resíduos	6	0,2044	0,03407	-	-

Tabela A.30 - Tabela de ANOVA no ensaio de invasão com inserto de transwell com matrigel para as linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R. (Resposta: Invasão celular relativa (razão)).

Efeito	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados médios	Estatística do teste	Valor-p
Linhagem	1	3,001	3,001	537,508	<0,001
Tratamento	2	0,0973	0,0487	8,718	0,005
Linhagem:Tratamento	2	0,2669	0,1335	23,905	<0,001
Resíduos	12	0,067	0,0056	-	-

Tabela A.31 - Comparações múltiplas entre as médias da Invasão celular relativa (razão) nos tratamentos pelo método de Bonferroni nas linhagens SK-MEL-28 (Sensível) e SK-MEL-28R(Resistente).

Linhagem	Comparação	Estimativa da diferença	Erro-padrão	Estatística do teste	Valor-p
Sensível	EcASNase - Combinatório	0,196	0,061	3,212	0,045
	EcASNase – PLX4032	0,1222	0,061	2,003	0,409
	Combinatório - PLX4032	-0,0737	0,061	-1,209	>0.999
Resistente	EcASNase – Combinatório	-0,2333	0,061	-3,823	0,015
	EcASNase – PLX4032	-0,4512	0,061	-7,396	<0,001
	Combinatório - PLX4032	-0,2179	0,061	-3,572	0,023

Tabela A.32 -Tabela de ANOVA no ensaio de invasão com inserto de transwell com matrigel para as linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R. (Resposta: Invasão/Viabilidade).

Efeito	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados médios	Estatística do teste	Valor-p
Linhagem	1	3,511	3,511	538,948	<0,001
Tratamento	2	0,127	0,064	9,761	0,003
Linhagem:Tratamento	2	0,313	0,157	24,035	<0,001
Resíduos	12	0,078	0,007	-	-

Tabela A.33 - Comparações múltiplas entre as médias da Invasão/Viabilidade (razão) nos tratamentos pelo método de Bonferroni nas linhagens SK-MEL-28 (Sensível) e SK-MEL-28R(Resistente).

Linhagem	Comparação	Estimativa da diferença	Erro-padrão	Estatística do teste	Valor-p
Sensível	EcASNase - Combinatório	0,2092	0,0659	3,175	0,048
	EcASNase – PLX4032	0,1151	0,0659	1,747	0,637
	Combinatório - PLX4032	-0,0941	0,0659	-1,428	>0,999
Resistente	EcASNase – Combinatório	-0,272	0,0659	-4,127	0,008
	EcASNase – PLX4032	-0,4989	0,0659	-7,571	<0,001
	Combinatório - PLX4032	-0,2269	0,0659	-3,444	0,029

Tabela A.34 - Tabela de análise de variância (ANOVA) para o modelo misto homocedástico no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

Efeito	Graus de liberdade do numerador	Graus de liberdade do denominador	Estatística F	Valor-p
Intercepto	1	32	1944,40	< 0,001
Droga	3	8	202,55	< 0,001
Tempo	4	32	111,42	< 0,001
Droga x Tempo	12	32	167,27	< 0,001

Tabela A.35 - Tabela de análise de variância (ANOVA) para o modelo misto heterocedástico no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

Efeito	Graus de liberdade do numerador	Graus de liberdade do denominador	Estatística F	Valor-p
Intercepto	1	32	2315,59	< 0,001
Droga	3	8	247,21	< 0,001
Tempo	4	32	138,01	< 0,001
Droga x Tempo	12	32	114,24	< 0,001

Tabela A.36 - Comparações múltiplas ajustadas pelo método de Bonferroni do modelo heterocedástico para o ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

Tempo	Comparação	Estimativa	Erro padrão	Estatística	valor-p ajustado
24h	Controle - EcASNase	48,1601	9,7936	4,9175	0,035
	Controle - Combinatório	53,4259	8,9246	5,9864	0,010
	Controle - PLX4032	46,6769	8,9902	5,1920	0,025
	EcASNase - Combinatório	5,2658	7,8129	0,6740	>0,999
	EcASNase - PLX4032	-1,4832	7,8877	-0,1880	>0,999
	Combinatório - PLX4032	-6,7491	6,7786	-0,9956	>0,999
48h	Controle - EcASNase	88,8604	9,7936	9,0733	<0,001
	Controle - Combinatório	114,7040	8,9246	12,8526	<0,001
	Controle - PLX4032	106,9894	8,9902	11,9007	<0,001
	EcASNase - Combinatório	25,8436	7,8129	3,3078	0,322
	EcASNase - PLX4032	18,1291	7,8877	2,2984	>0,999
	Combinatório - PLX4032	-7,7145	6,7786	-1,1381	>0,999
72h	Controle - EcASNase	125,8905	9,7936	12,8543	<0,001
	Controle - Combinatório	168,3244	8,9246	18,8607	<0,001
	Controle - PLX4032	158,9048	8,9902	17,6754	<0,001
	EcASNase - Combinatório	42,4339	7,8129	5,4313	0,019
	EcASNase - PLX4032	33,0143	7,8877	4,1855	0,092
	Combinatório - PLX4032	-9,4195	6,7786	-1,3896	>0,999
96h	Controle - EcASNase	152,5390	9,7936	15,5754	<0,001
	Controle - Combinatório	214,0437	8,9246	23,9836	<0,001
	Controle - PLX4032	205,5934	8,9902	22,8686	<0,001
	EcASNase - Combinatório	61,5047	7,8129	7,8722	0,002
	EcASNase - PLX4032	53,0544	7,8877	6,7262	0,005
	Combinatório - PLX4032	-8,4503	6,7786	-1,2466	>0,999
168h	Controle - EcASNase	197,7931	9,7936	20,1961	<0,001
	Controle - Combinatório	314,3993	8,9246	35,2284	<0,001
	Controle - PLX4032	306,0931	8,9902	34,0475	<0,001
	EcASNase - Combinatório	116,6062	7,8129	14,9248	<0,001
	EcASNase - PLX4032	108,3000	7,8877	13,7302	<0,001
	Combinatório - PLX4032	-8,3062	6,7786	-1,2253	>0,999

Tabela A.37 - Tabela de análise de variância (ANOVA) para o modelo misto heterocedástico sem as observações do Experimento 2 do tratamento Controle no ensaio esferóide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

Efeito	Graus de liberdade do numerador	Graus de liberdade do denominador	Estatística F	Valor-p
Intercepto	1	28	11.668,70	< 0,001
Droga	3	7	1.285,39	< 0,001
Tempo	4	28	29,79	< 0,001
Droga x Tempo	12	28	319,97	< 0,001

Tabela A.38 - Tabela de análise de variância (ANOVA) para o modelo misto homocedástico no ensaio esferóide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164R.

Efeito	Graus de liberdade do numerador	Graus de liberdade do denominador	Estatística F	Valor-p
Intercepto	1	32	4.163,13	< 0,001
Tempo	4	32	3,33	0,022
Droga	3	8	13,74	0,002
Tempo x Droga	12	32	7,83	< 0,001

Tabela A.39 - Comparações múltiplas ajustadas pelo método de Bonferroni do modelo heterocedástico ajustado para ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164R.

Tempo	Comparação	Estimativa	Erro-padrão	Estatística	Valor-p ajustado
24h	Controle - EcASNase	4,8280	4,5208	1,0679	>0,999
	Controle - Combinatório	7,4239	4,5208	1,6422	>0,999
	Controle - PLX4032	1,1612	4,5208	0,2569	>0,999
	EcASNase - Combinatório	2,5960	4,5208	0,5742	>0,999
	EcASNase - PLX4032	-3,6668	4,5208	-0,8111	>0,999
	Combinatório - PLX4032	-6,2627	4,5208	-1,3853	>0,999
48h	Controle - EcASNase	9,9661	4,5208	2,2045	>0,999
	Controle - Combinatório	13,6491	4,5208	3,0192	0,497
	Controle - PLX4032	-8,5324	4,5208	-1,8874	>0,999
	EcASNase - Combinatório	3,6830	4,5208	0,8147	>0,999
	EcASNase - PLX4032	-18,4985	4,5208	-4,0918	0,104
	Combinatório - PLX4032	-22,1815	4,5208	-4,9065	0,036
72h	Controle - EcASNase	16,1360	4,5208	3,5693	0,219
	Controle - Combinatório	19,4840	4,5208	4,3098	0,077
	Controle - PLX4032	0,9247	4,5208	0,2045	>0,999
	EcASNase - Combinatório	3,3480	4,5208	0,7406	>0,999
	EcASNase - PLX4032	-15,2113	4,5208	-3,3647	0,296
	Combinatório - PLX4032	-18,5593	4,5208	-4,1053	0,102
96h	Controle - EcASNase	18,2818	4,5208	4,0439	0,112
	Controle - Combinatório	23,8615	4,5208	5,2781	0,022
	Controle - PLX4032	0,2697	4,5208	0,0596	>0,999
	EcASNase - Combinatório	5,5798	4,5208	1,2342	>0,999
	EcASNase - PLX4032	-18,0121	4,5208	-3,9843	0,121
	Combinatório - PLX4032	-23,5919	4,5208	-5,2185	0,024
168h	Controle - EcASNase	16,9727	4,5208	3,7543	0,168
	Controle - Combinatório	25,5765	4,5208	5,6575	0,014
	Controle - PLX4032	-10,0121	4,5208	-2,2147	>0,999
	EcASNase - Combinatório	8,6038	4,5208	1,9031	>0,999
	EcASNase - PLX4032	-26,9848	4,5208	-5,9690	0,010
	Combinatório - PLX4032	-35,5886	4,5208	-7,8721	0,002

Tabela A.40 - Tabela de análise de variância (ANOVA) para o modelo misto homocedástico no ensaio esferóide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164.

Efeito	Graus de liberdade do numerador	Graus de liberdade do denominador	F-valor	Valor-p
Intercepto	1	32	3.518,61	< 0,001
Tempo	4	32	1.404,32	< 0,001
Droga	3	8	213,10	< 0,001
Tempo x Droga	12	32	559,67	< 0,001

Tabela A.41 - Comparações múltiplas ajustadas pelo método de Bonferroni do modelo homocedástico ajustado para ensaio esferoide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164.

Tempo	Contraste	Estimativa da diferença	Erro- padrão	Estatística	Valor-p ajustado
24h	Controle - EcASNase	34,8598	10,6224	3,2817	0,335
	Controle - Combinatório	51,1257	10,6224	4,8130	0,040
	Controle - PLX4032	22,1076	10,6224	2,0812	>0,999
	EcASNase - Combinatório	16,2659	10,6224	1,5313	>0,999
	EcASNase - PLX4032	-12,7523	10,6224	-1,2005	>0,999
	Combinatório - PLX4032	-29,0182	10,6224	-2,7318	0,773
48h	Controle - EcASNase	76,4175	10,6224	7,1940	0,003
	Controle - Combinatório	124,2688	10,6224	11,6987	<0,001
	Controle - PLX4032	85,2197	10,6224	8,0226	0,001
	EcASNase - Combinatório	47,8513	10,6224	4,5048	0,060
	EcASNase - PLX4032	8,8022	10,6224	0,8286	>0,999
	Combinatório - PLX4032	-39,0491	10,6224	-3,6761	0,188
72h	Controle - EcASNase	117,2371	10,6224	11,0368	<0,001
	Controle - Combinatório	204,3735	10,6224	19,2399	<0,001
	Controle - PLX4032	152,9593	10,6224	14,3997	<0,001
	EcASNase - Combinatório	87,1364	10,6224	8,2031	0,001
	EcASNase - PLX4032	35,7222	10,6224	3,3629	0,297
	Combinatório - PLX4032	-51,4142	10,6224	-4,8402	0,039
96h	Controle - EcASNase	152,7996	10,6224	14,3847	<0,001
	Controle - Combinatório	277,2862	10,6224	26,1039	<0,001
	Controle - PLX4032	217,0511	10,6224	20,4333	<0,001
	EcASNase - Combinatório	124,4866	10,6224	11,7193	<0,001
	EcASNase - PLX4032	64,2515	10,6224	6,0487	0,009
	Combinatório - PLX4032	-60,2351	10,6224	-5,6706	0,014
168h	Controle - EcASNase	304,1028	10,6224	28,6284	<0,001
	Controle - Combinatório	513,0699	10,6224	48,3007	<0,001
	Controle - PLX4032	434,9761	10,6224	40,9490	<0,001
	EcASNase - Combinatório	208,9671	10,6224	19,6723	<0,001
	EcASNase - PLX4032	130,8734	10,6224	12,3205	<0,001
	Combinatório - PLX4032	-78,0937	10,6224	-7,3518	0,002

Tabela A.42 - Tabela de análise de variância (ANOVA) para o modelo misto homocedástico no ensaio esferóide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164R.

Efeito	Graus de liberdade do numerador	Graus de liberdade do denominador	Estatística F	Valor-p
Intercepto	1	32	805,03	< 0,001
Tempo	4	32	91,21	< 0,001
Droga	3	8	6,81	0,014
Tempo x Droga	12	32	15,47	< 0,001

Tabela A.43 - Tabela de análise de variância (ANOVA) para o modelo misto heterocedástico no ensaio esferóide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164R.

Efeito	Graus de liberdade do numerador	Graus de liberdade do denominador	F-valor	Valor-p
Intercepto	1	32	854,32	< 0,001
Tempo	4	32	114,18	< 0,001
Droga	3	8	7,43	0,011
Tempo × Droga	12	32	24,64	< 0,001

Tabela A.44 - Comparações múltiplas ajustadas pelo método de Bonferroni do modelo heterocedástico ajustado para ensaio esferóide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164R.

Tempo	Contraste	Estimativa	Erro-padrão	Estatística	Valor-p ajustado
24h	Controle - EcASNase	11,3426	25,3267	0,4479	>0,999
	Controle - Combinatório	7,3936	22,5049	0,3285	>0,999
	Controle - PLX4032	-0,0793	22,2389	-0,0036	>0,999
	EcASNase - Combinatório	-3,9490	23,0062	-0,1716	>0,999
	EcASNase - PLX4032	-11,4219	22,7461	-0,5021	>0,999
	Combinatório - PLX4032	-7,4729	19,5554	-0,3821	>0,999
48h	Controle - EcASNase	16,6904	25,3267	0,6590	>0,999
	Controle - Combinatório	37,4014	22,5049	1,6619	>0,999
	Controle - PLX4032	19,4701	22,2389	0,8755	>0,999
	EcASNase - Combinatório	20,7110	23,0062	0,9002	>0,999
	EcASNase - PLX4032	2,7797	22,7461	0,1222	>0,999
	Combinatório - PLX4032	-17,9313	19,5554	-0,9170	>0,999
72h	Controle - EcASNase	-9,0384	25,3267	-0,3569	>0,999
	Controle - Combinatório	64,6883	22,5049	2,8744	0,621
	Controle - PLX4032	28,5493	22,2389	1,2838	>0,999
	EcASNase - Combinatório	73,7267	23,0062	3,2046	0,376
	EcASNase - PLX4032	37,5877	22,7461	1,6525	>0,999
	Combinatório - PLX4032	-36,1390	19,5554	-1,8480	>0,999
96h	Controle - EcASNase	-36,5167	25,3267	-1,4418	>0,999
	Controle - Combinatório	90,0666	22,5049	4,0021	0,118
	Controle - PLX4032	33,6427	22,2389	1,5128	>0,999
	EcASNase - Combinatório	126,5833	23,0062	5,5021	0,017
	EcASNase - PLX4032	70,1595	22,7461	3,0845	0,450
	Combinatório - PLX4032	-56,4239	19,5554	-2,8853	0,610
168h	Controle - EcASNase	9,4994	25,3267	0,3751	>0,999
	Controle - Combinatório	190,3154	22,5049	8,4566	<0,001
	Controle - PLX4032	77,9989	22,2389	3,5073	0,239
	EcASNase - Combinatório	180,8160	23,0062	7,8594	0,002
	EcASNase - PLX4032	68,4995	22,7461	3,0115	0,503
	Combinatório - PLX4032	-112,3165	19,5554	-5,7435	0,013

Apêndice B

Figuras

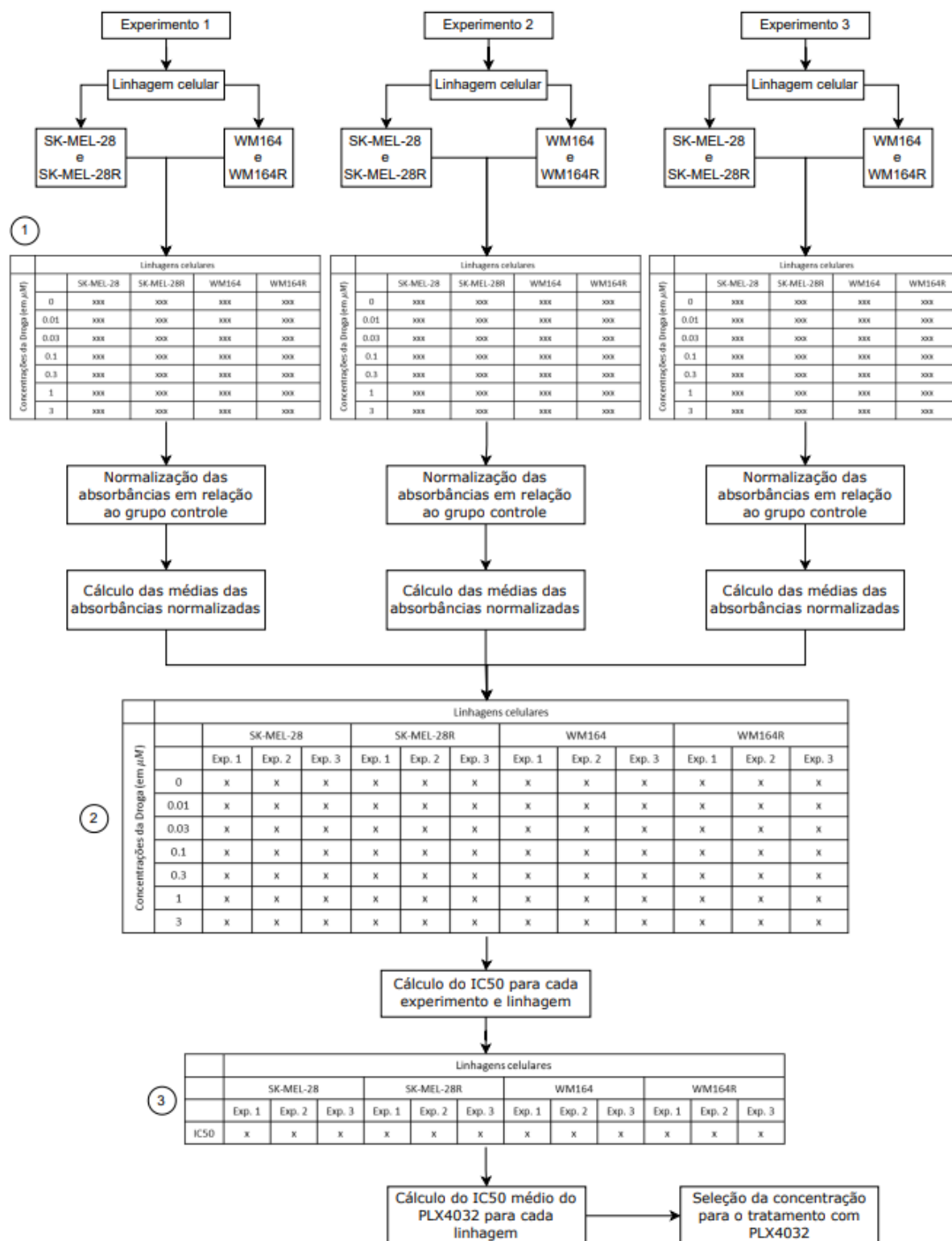


Figura B.1 - Fluxograma do processo de coleta dos dados para o ensaio de viabilidade celular por MTT utilizando a droga PLX4032.

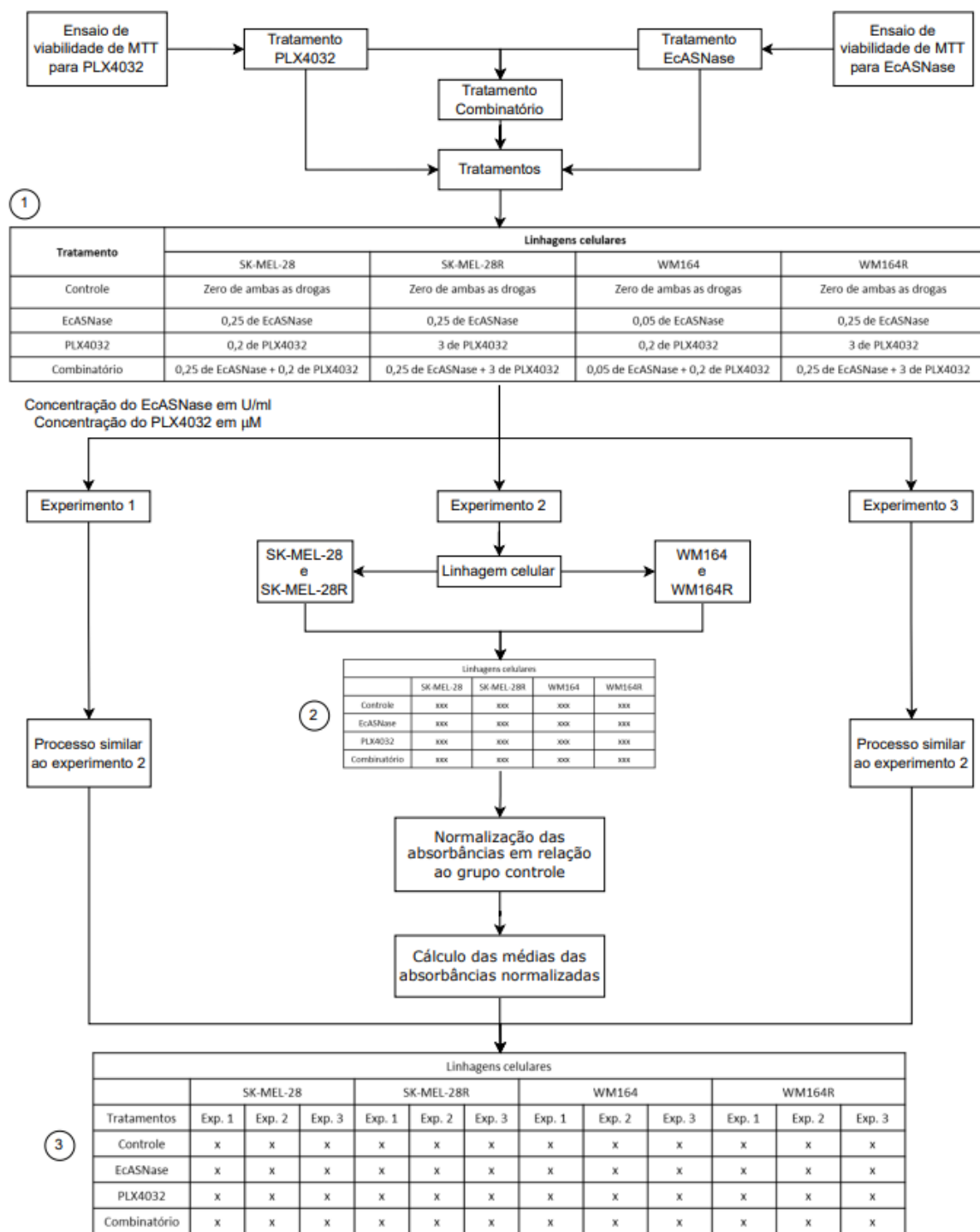


Figura B.2 - Fluxograma do processo de coleta dos dados para o ensaio de viabilidade celular por MTT para a análise comparativa dos tratamentos PLX4032, EcASNase e Combinatório PLX4032 + EcASNase

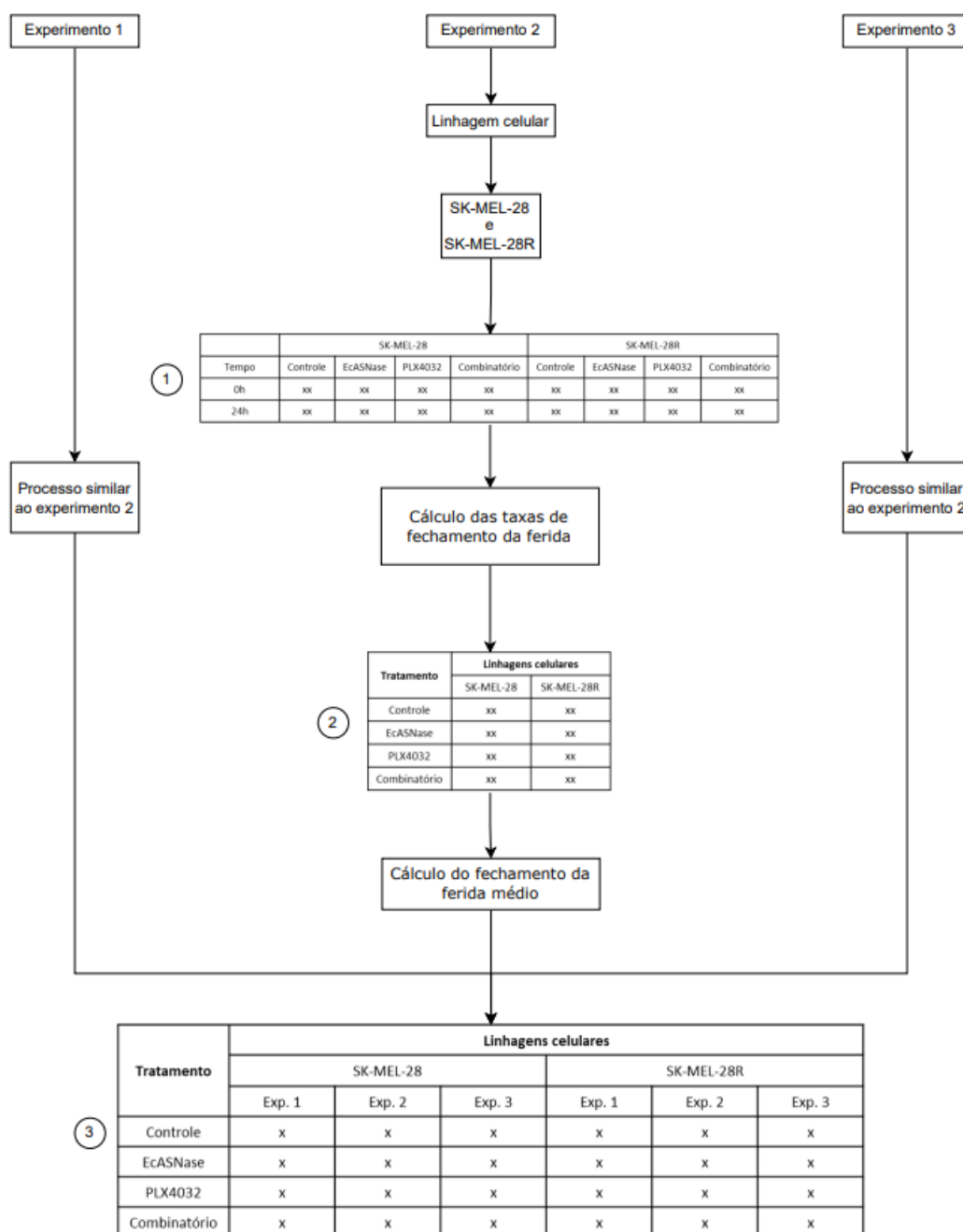


Figura B.3 - Fluxograma do processo de coleta dos dados para o ensaio de ferida utilizando os tratamentos definidos com as drogas PLX4032 e EcASNase.

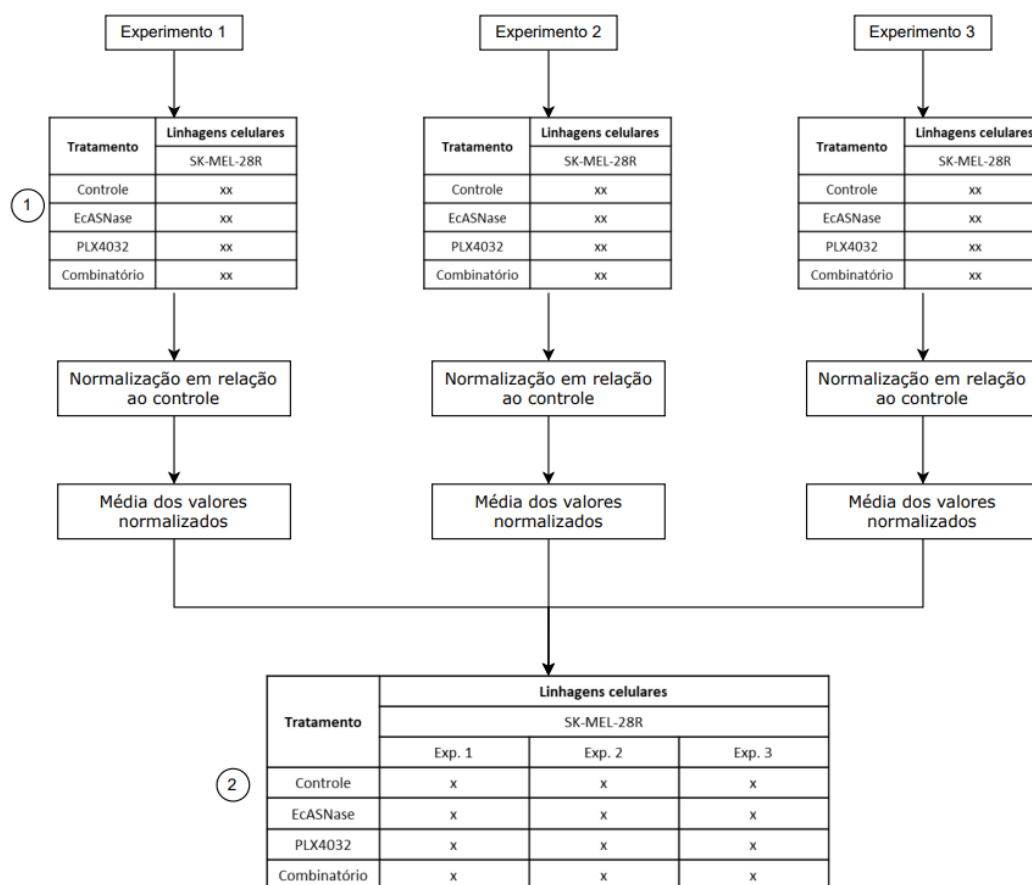


Figura B.4 - Fluxograma do processo de coleta para o ensaio de migração com inserto Transwell utilizando os tratamentos definidos com as drogas PLX4032 e EcASNase.

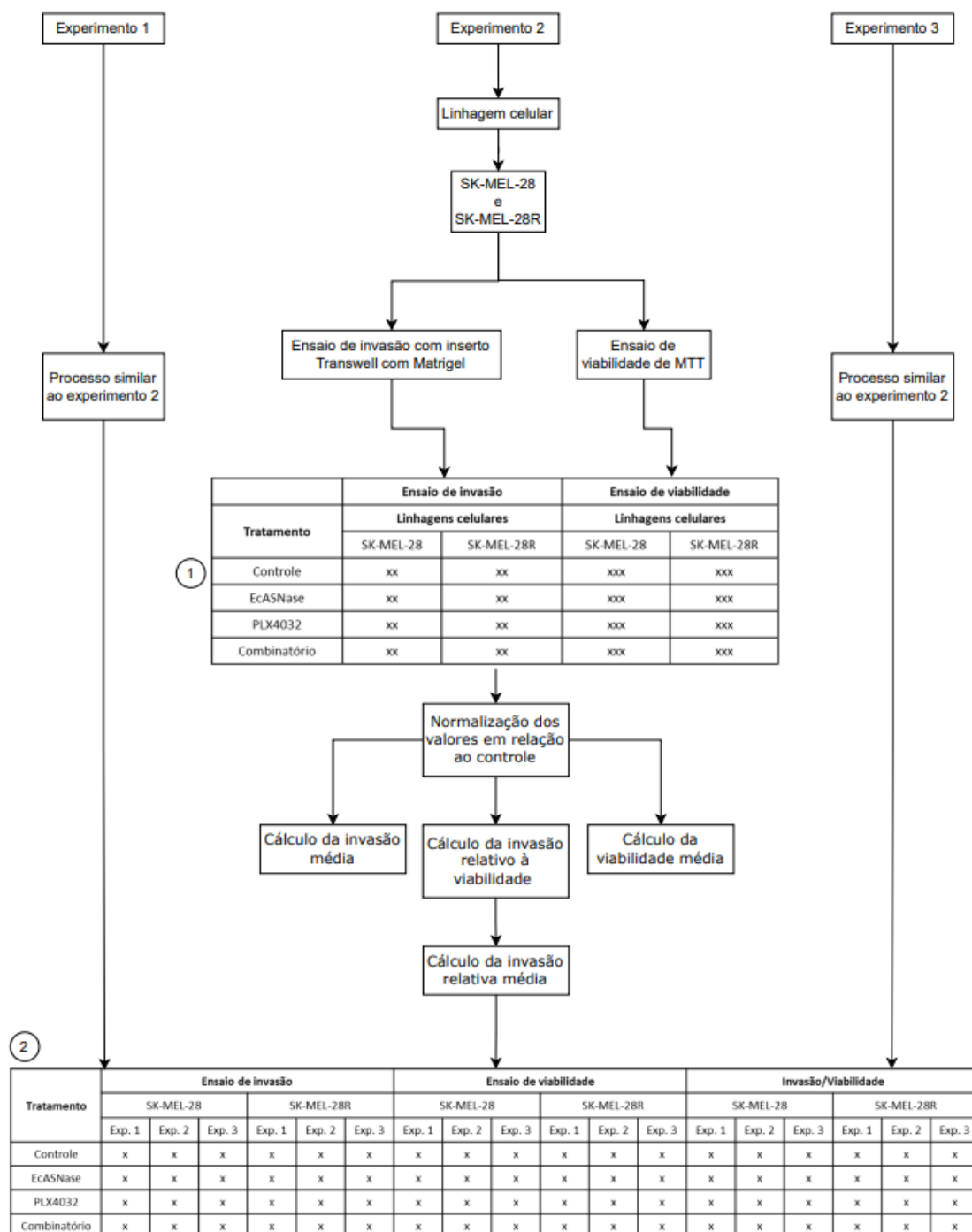


Figura B.5 - Fluxograma do processo de coleta dos dados para o ensaio de invasão com inserto Transwell com Matrigel utilizando os tratamentos definidos com as drogas PLX4032 e EcASNase.

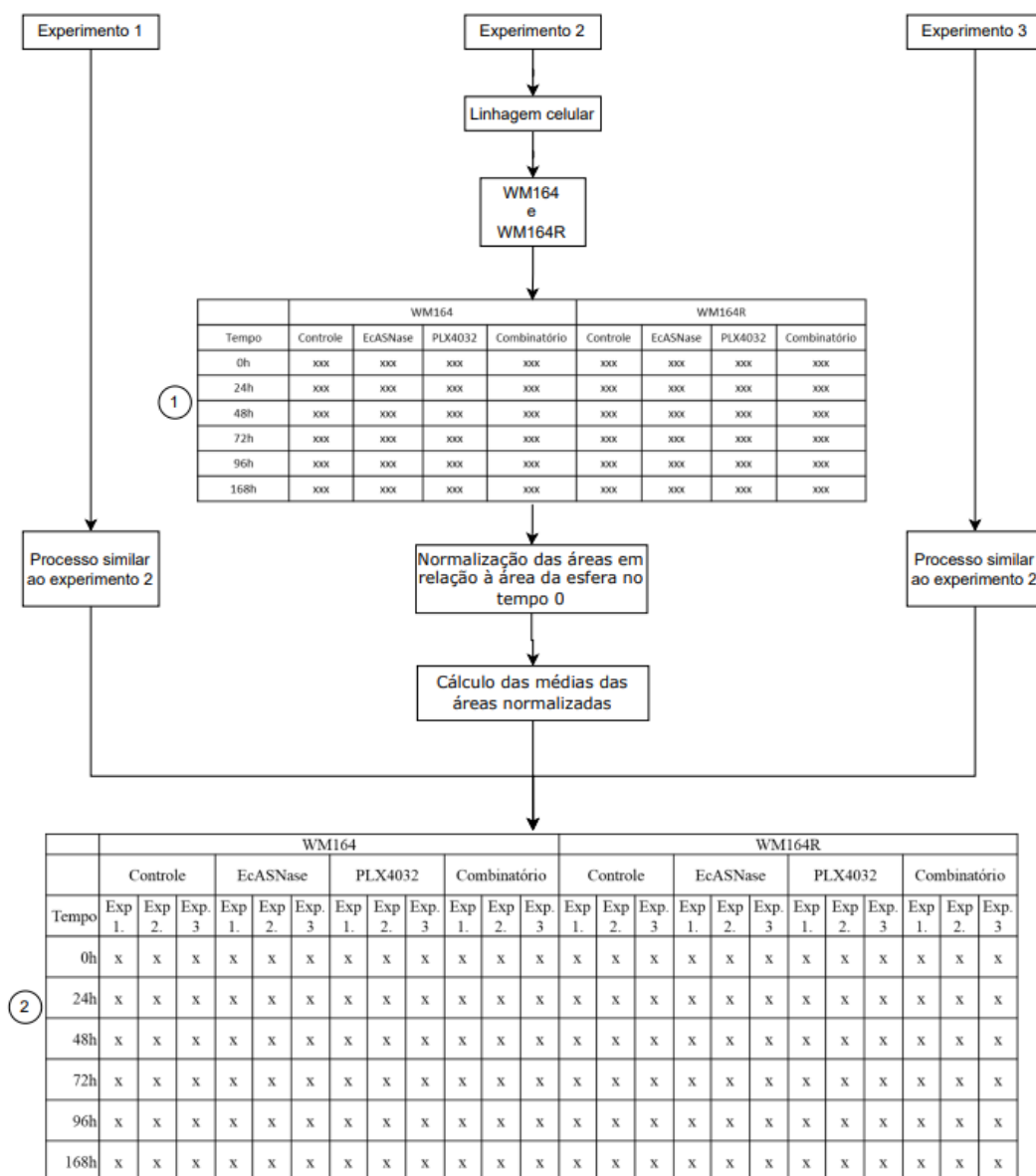


Figura B.6 - Fluxograma do processo de coleta dos dados para o esferoide tumoral tridimensional utilizando os tratamentos definidos com as drogas PLX4032 e EcASNase.

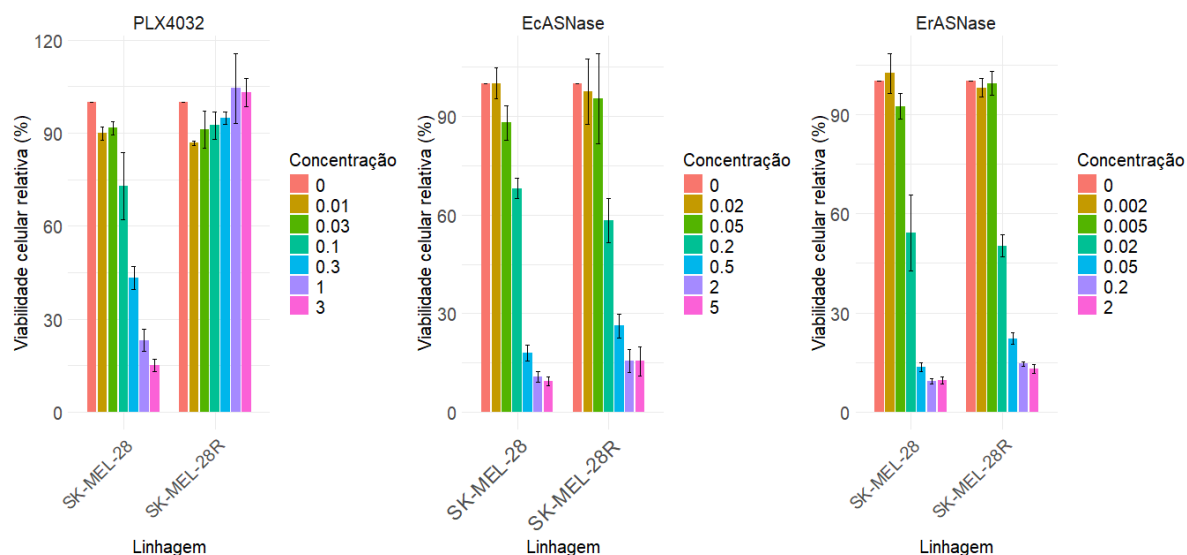


Figura B.7 Gráfico das médias e barras de desvio padrão da Viabilidade celular relativa (%) nas linhagens celulares SK-MEL-28 e SK-MEL-28R, nas diferentes concentrações das drogas PLX4032, EcASNase e ErASNase.

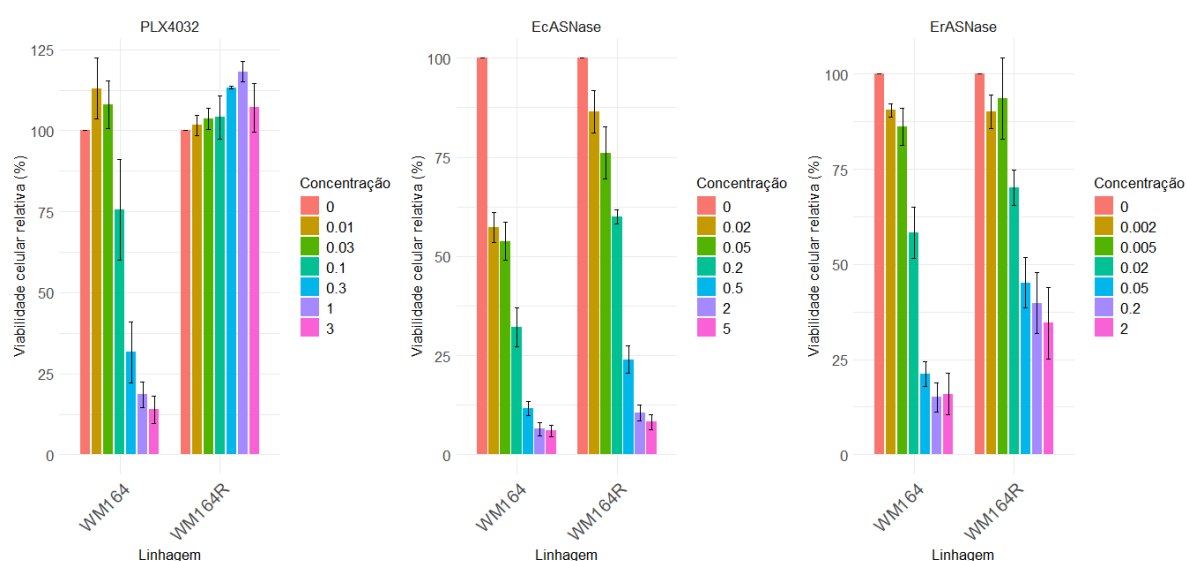


Figura B.8 Gráfico das médias e barras de desvio padrão da Viabilidade celular relativa (%) nas linhagens celulares WM164 e WM164R, nas diferentes concentrações das drogas PLX4032, EcASNase e ErASNase.

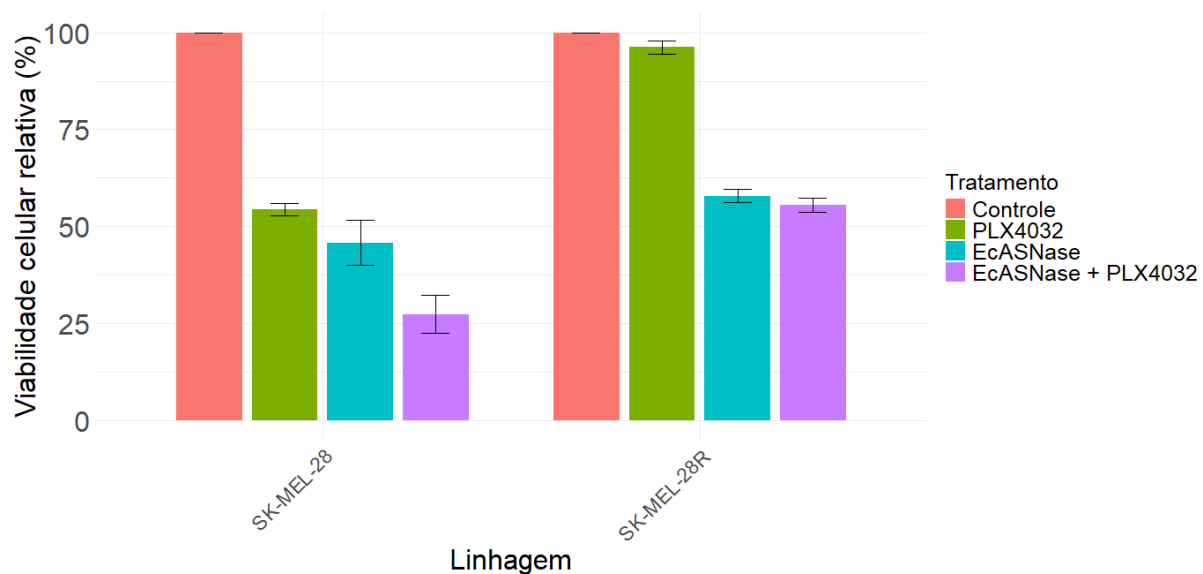


Figura B.9 Gráfico das médias e barras de desvio padrão da Viabilidade celular relativa (%) nas linhagens celulares SK-MEL-28 e SK-MEL-28R, nos diferentes tratamentos no ensaio comparativo de viabilidade por MTT

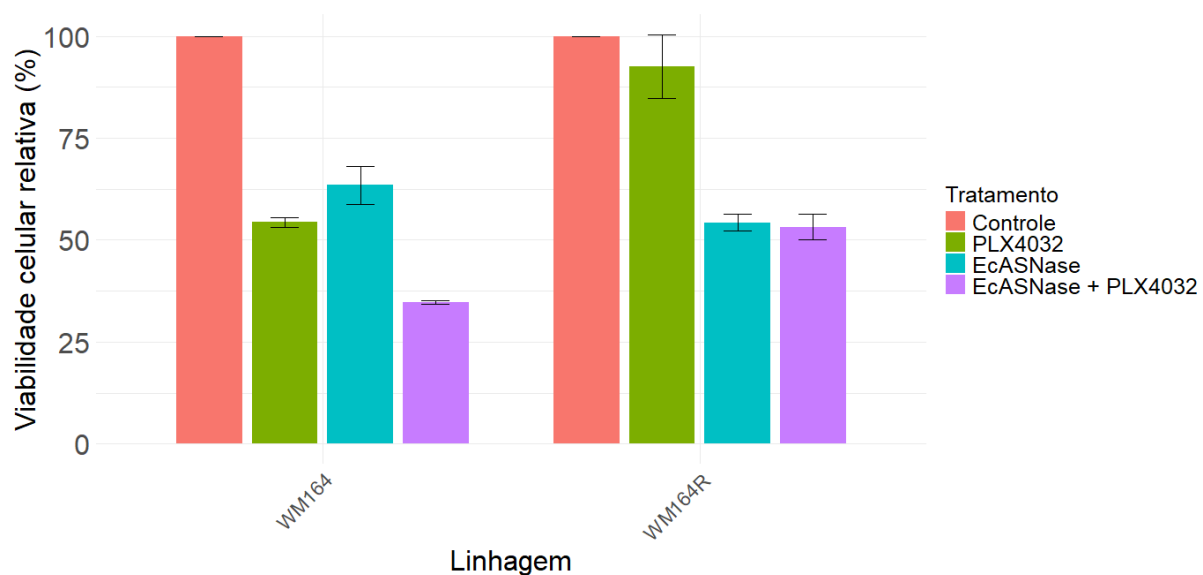


Figura B.10 Gráfico das médias e barras de desvio padrão da Viabilidade celular relativa (%) nas linhagens celulares WM164 e WM164R, nos diferentes tratamentos no ensaio comparativo de viabilidade por MTT

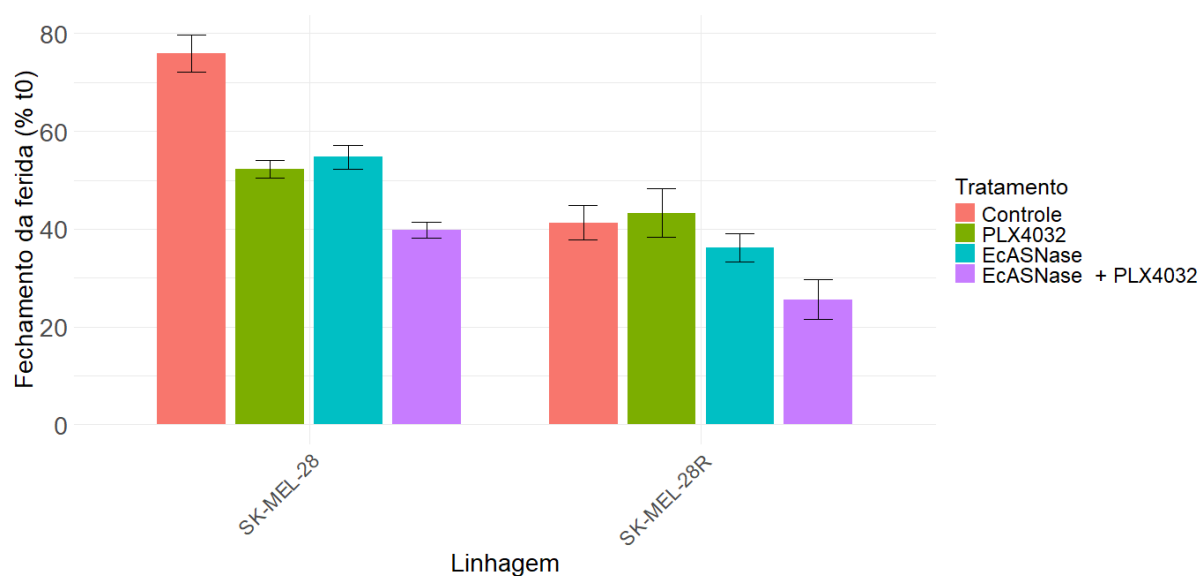


Figura B.11 Gráfico das médias e barras de desvio padrão do Fechamento da ferida (%) nas linhagens celulares SK-MEL-28 e SK-MEL-28R, nos diferentes tratamentos

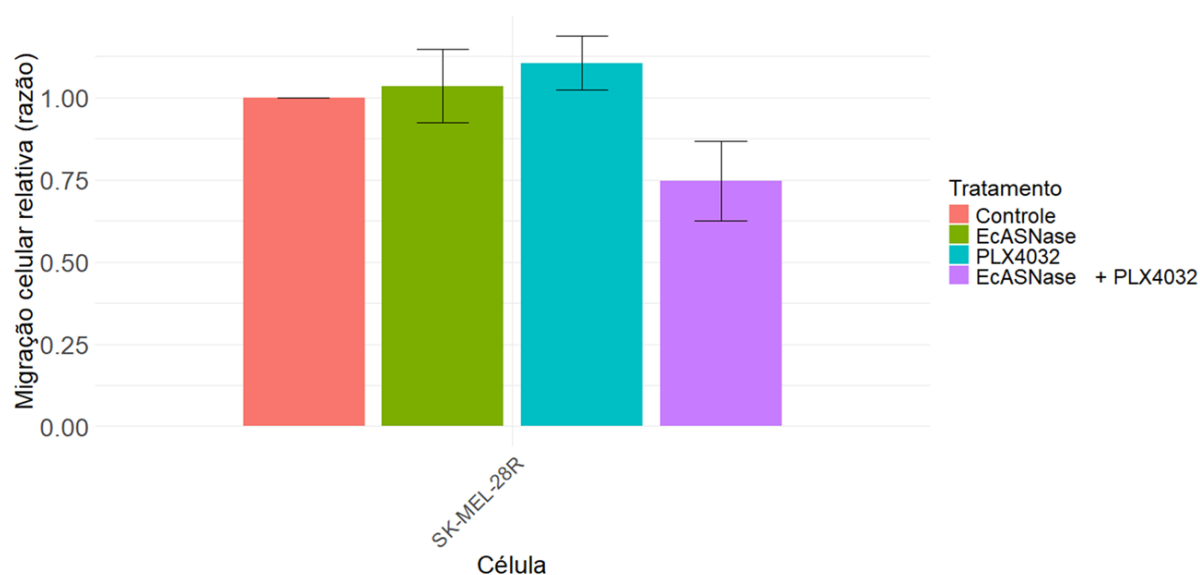


Figura B.12 Gráfico das médias e barras de desvio padrão da Migração celular relativa (razão) na linhagem celular SK-MEL-28R, nos diferentes tratamentos no ensaio de migração transwell.

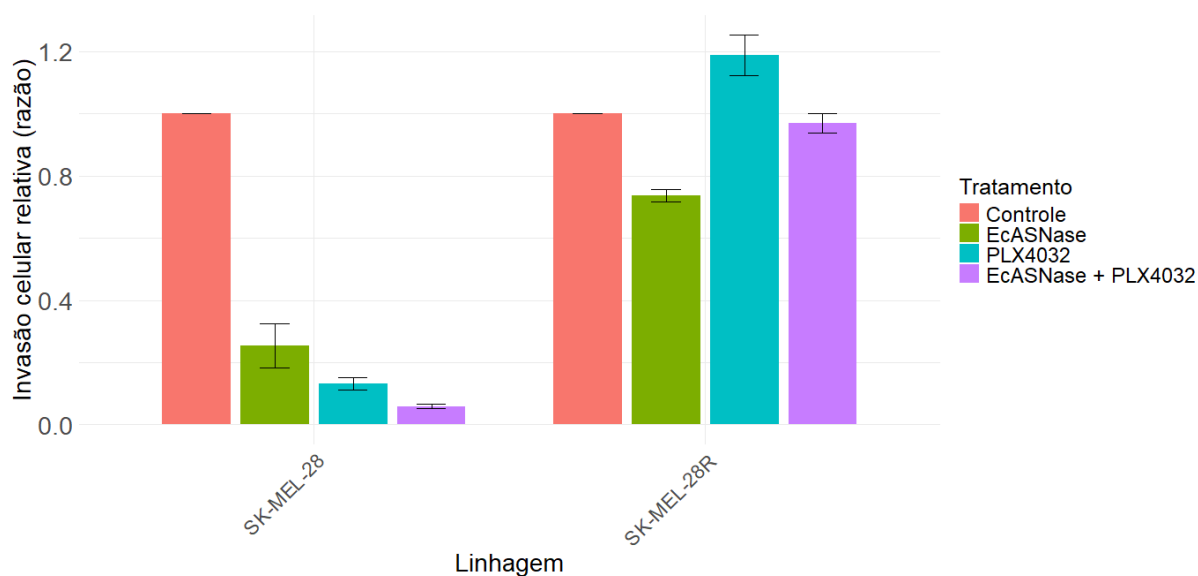


Figura B.13 Gráfico das médias e barras de desvio padrão do Invasão celular relativa (razão) nas linhagens celulares SK-MEL-28 e SK-MEL-28R, nos diferentes tratamentos no ensaio de invasão transwell com matrigel.

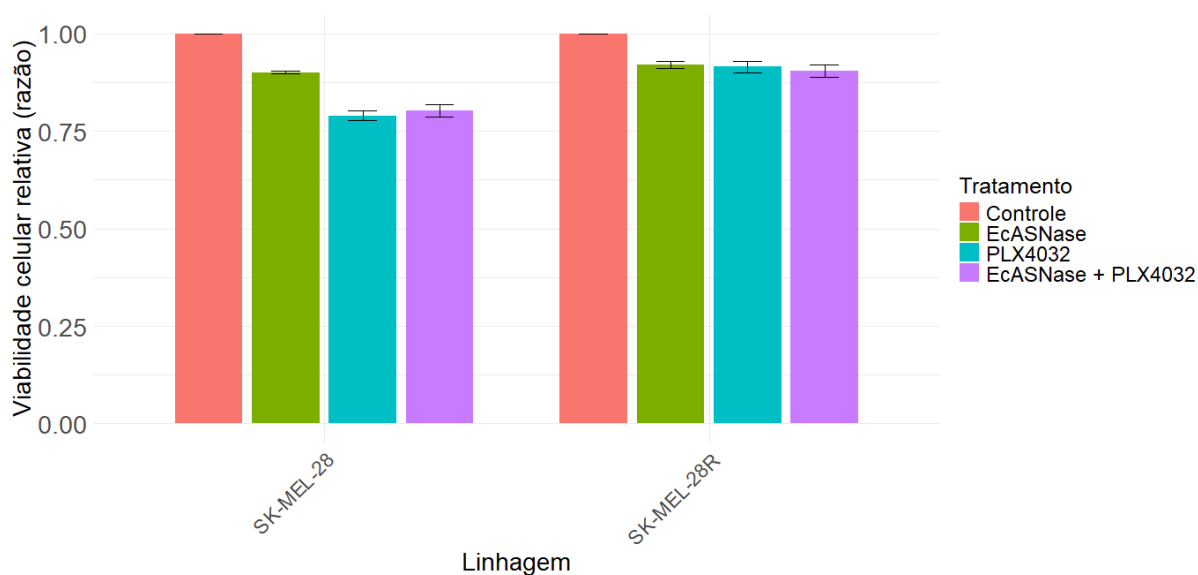


Figura B.14 Gráfico das médias e barras de desvio padrão da Viabilidade celular relativa (razão) nas linhagens celulares SK-MEL-28 e SK-MEL-28R, nos diferentes tratamentos no ensaio de invasão: Viabilidade cristal de violeta.

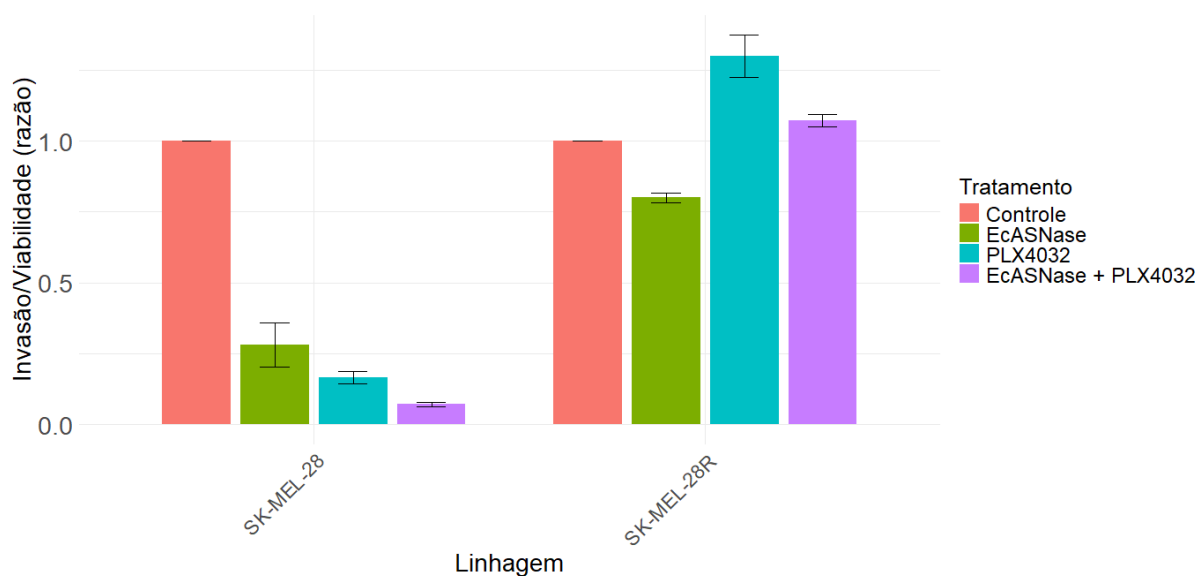


Figura B.15 Gráfico das médias e barras de desvio padrão da Invasão/Viabilidade (razão) nas linhagens celulares SK-MEL-28 e SK-MEL-28R, nos diferentes tratamentos no ensaio de invasão: Invasão/Viabilidade.

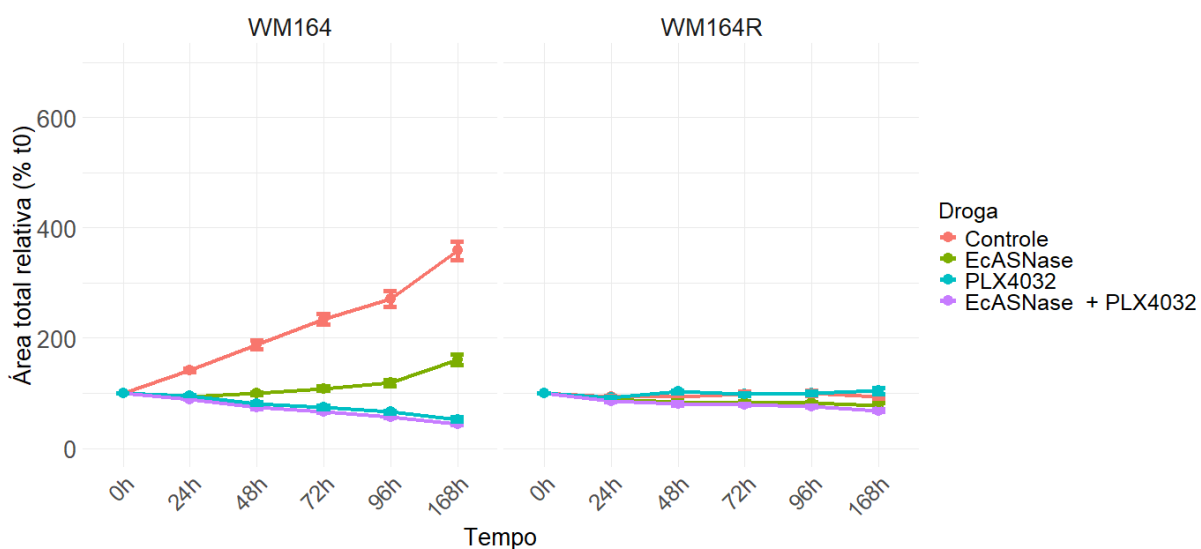


Figura B.16 Gráficos de linha das médias e barras de desvio padrão da Área total relativa (%), nas linhagens WM164 e WM164R, em cada tratamento, ao longo do tempo, em horas, no ensaio de esferoide sem matrigel.

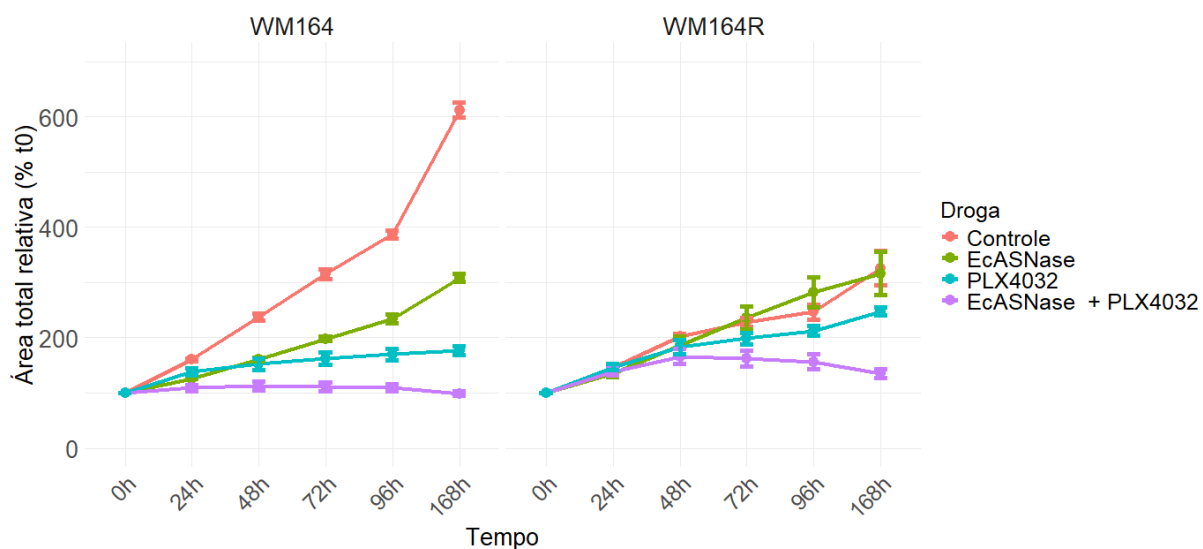


Figura B.17 Gráficos de linha das médias e barras de desvio padrão da Área total relativa (%), nas linhagens WM164 e WM164R, em cada tratamento, ao longo do tempo, em horas, no ensaio de esferóide com matrigel.

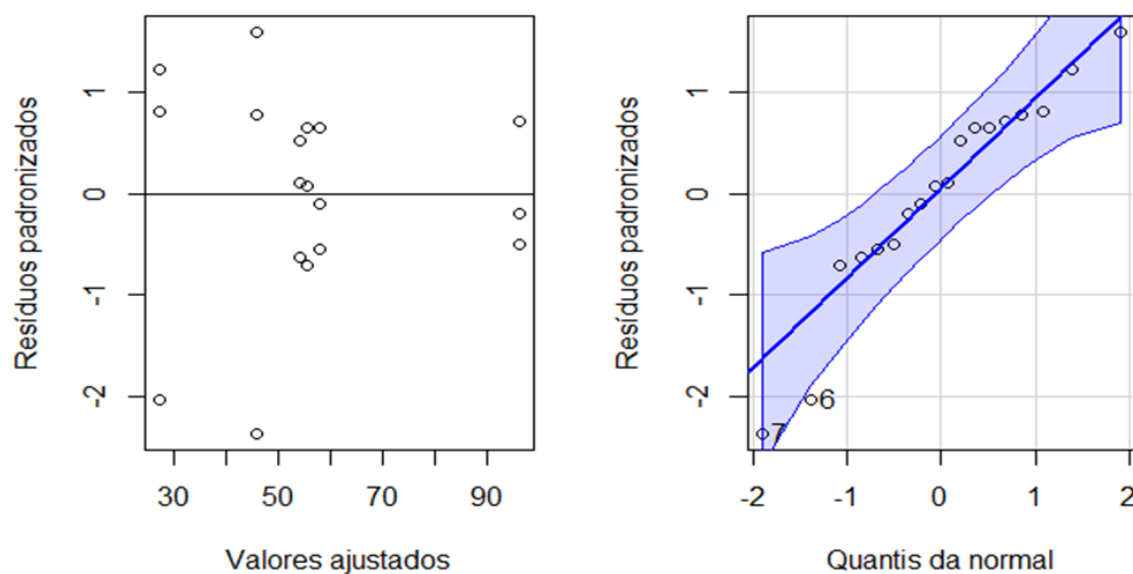


Figura B.18 Gráficos de resíduos padronizados pelos valores ajustados e gráfico dos resíduos padronizados pelos quantis teóricos de uma normal padrão, com um envelope de confiança global de 95%, para o modelo ANOVA com dois fatores no ensaio de viabilidade por MTT nas linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R.

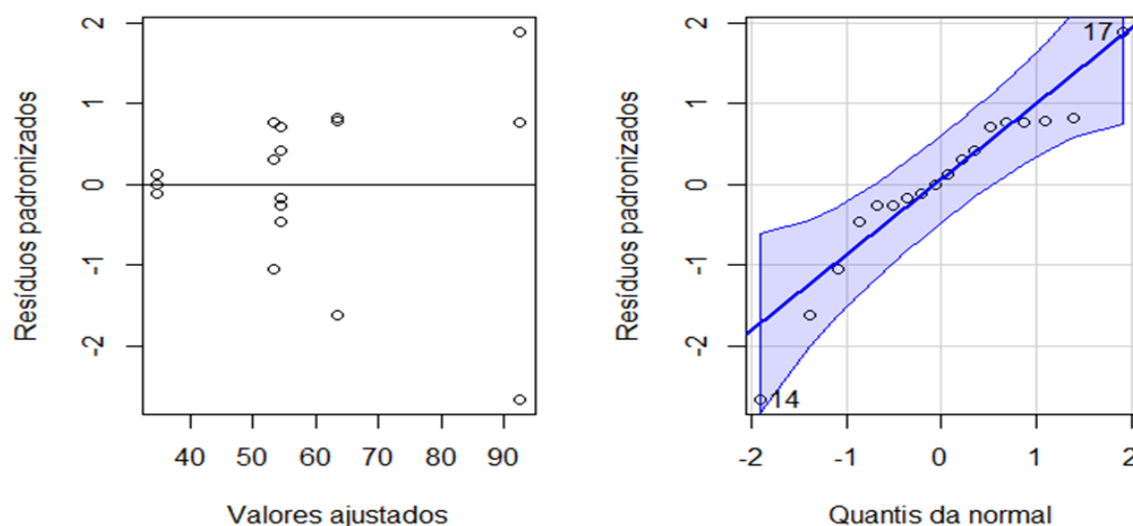


Figura B.19 Gráficos de resíduos padronizados por valor ajustado e gráfico *qqplot* dos resíduos padronizados pelos quantis teóricos de uma normal padrão, junto com um envelope de confiança global de 95%, para o modelo Anova com dois fatores no ensaio de viabilidade por MTT nas linhagens WM164 e WM164R.

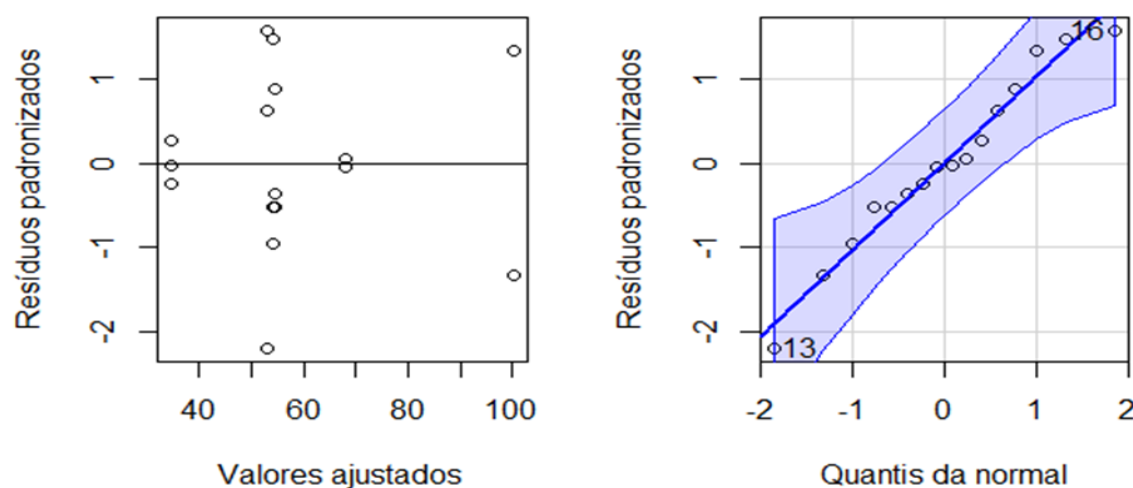


Figura B.20 Gráficos de resíduos padronizados por valor ajustado e gráfico *qqplot* dos resíduos padronizados pelos quantis teóricos de uma normal padrão, junto com um envelope de confiança global de 95%, para o modelo Anova com dois fatores no ensaio de viabilidade por MTT nas linhagens WM164 e WM164R, com as observações 4 e 14 removidas.

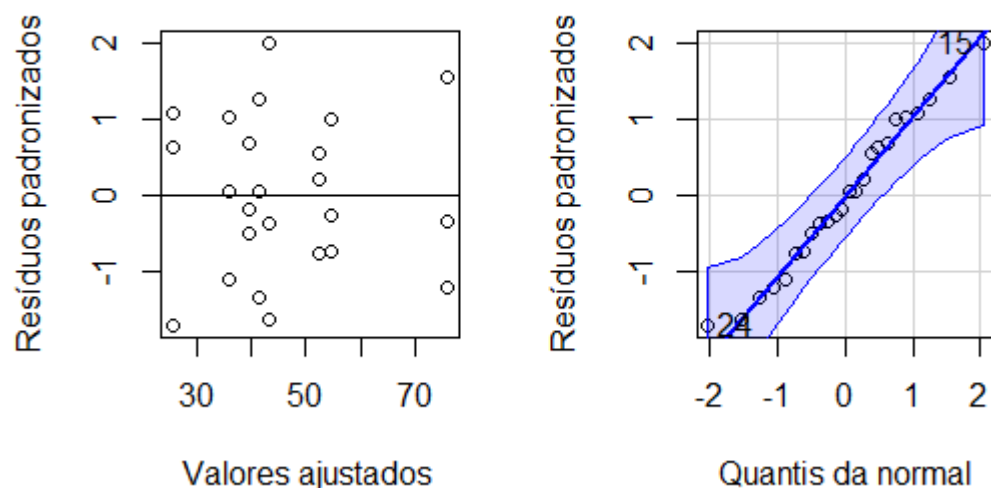


Figura B.21 Gráficos de resíduos padronizados por valor ajustado e gráfico *qqplot* dos resíduos padronizados pelos quantis teóricos de uma normal padrão, junto com um envelope de confiança global de 95%, para o modelo Anova com dois fatores na migração ensaio de ferida.

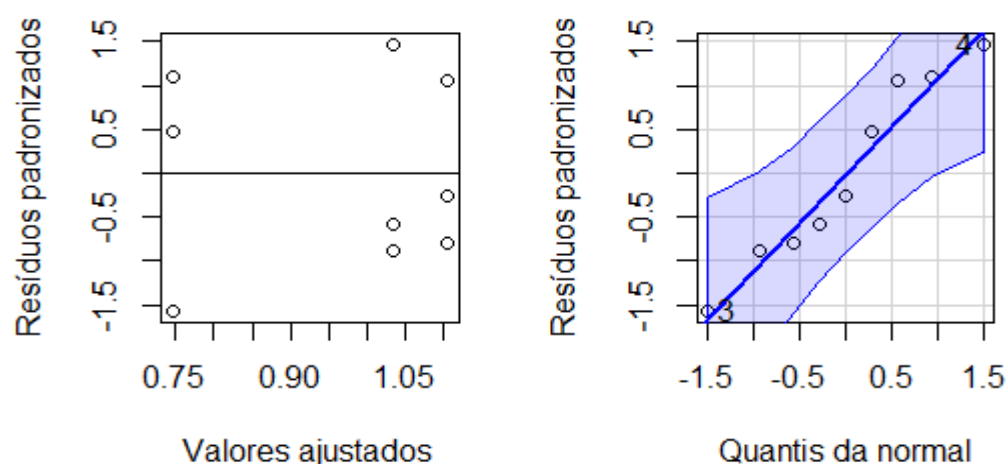


Figura B.22 Gráficos de resíduos padronizados por valor ajustado e gráfico *qqplot* dos resíduos padronizados pelos quantis teóricos de uma normal padrão, junto com um envelope de confiança global de 95%, para o modelo Anova com dois fatores no ensaio de migração TransWell.

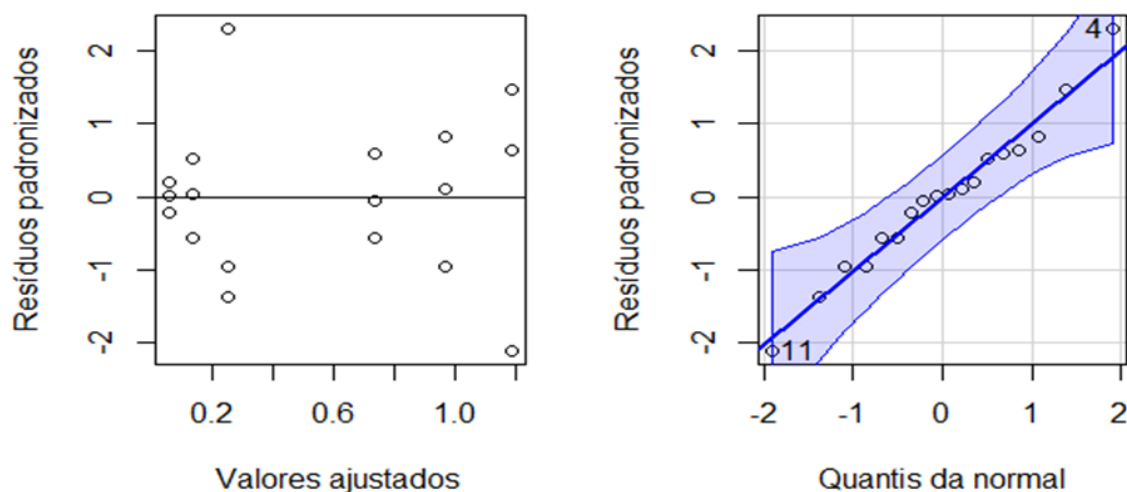


Figura B.23 Gráficos de resíduos padronizados pelos valores ajustados e o gráfico dos resíduos padronizados pelos quantis teóricos de uma normal padrão, com um envelope de confiança global de 95%, para o modelo Anova com dois fatores da Invasão celular relativa (razão) no ensaio de invasão com Inseto Transwell com Matrigel.

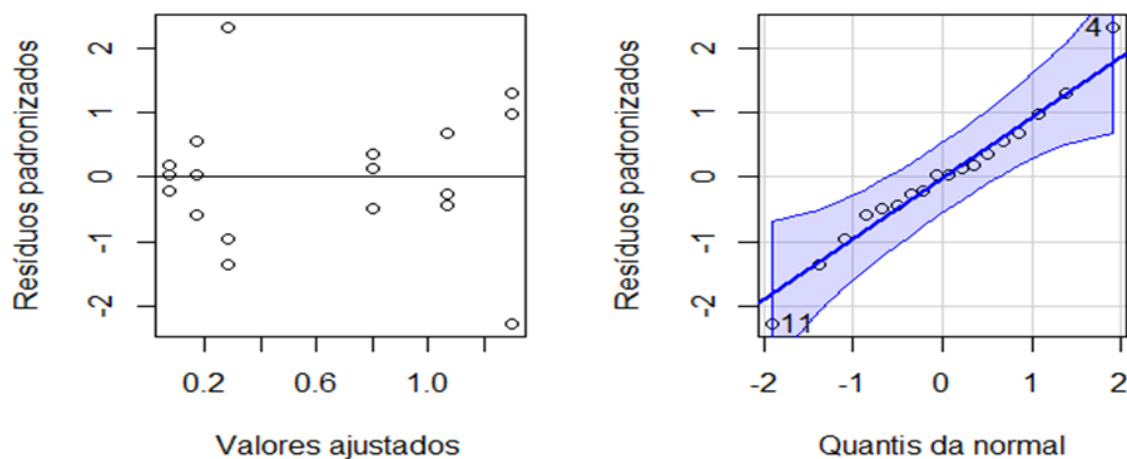


Figura B.24 Gráficos de resíduos padronizados por valor ajustado e o gráfico *qqplot* dos resíduos padronizados pelos quantis teóricos de uma normal padrão, com um envelope de confiança global de 95%, para o modelo Anova com dois fatores da Invasão/Viabilidade (razão) no ensaio de invasão com Inseto Transwell com Matrigel.

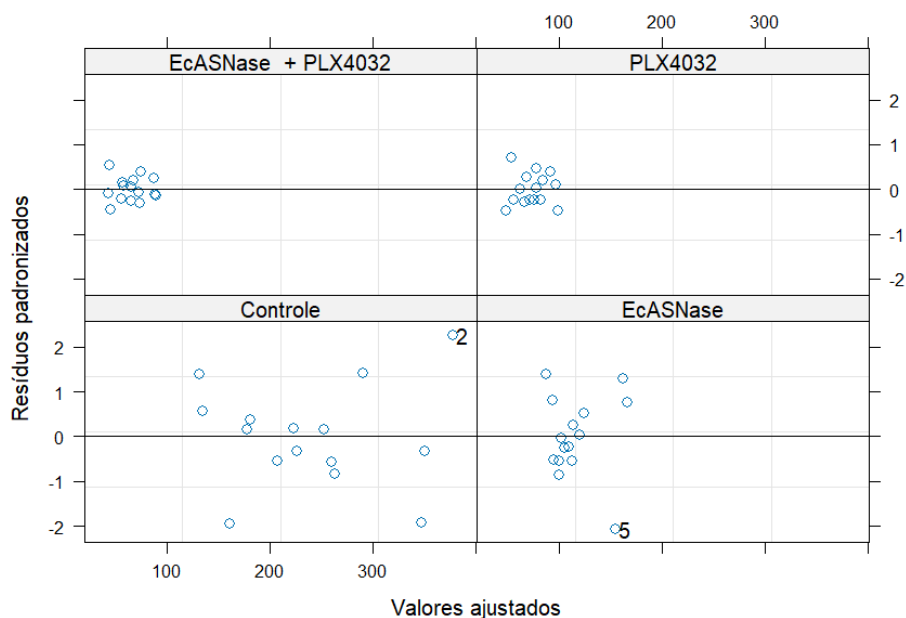


Figura B.25 Gráfico dos resíduos condicionais versus valores ajustados no modelo misto para os diferentes tratamentos no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

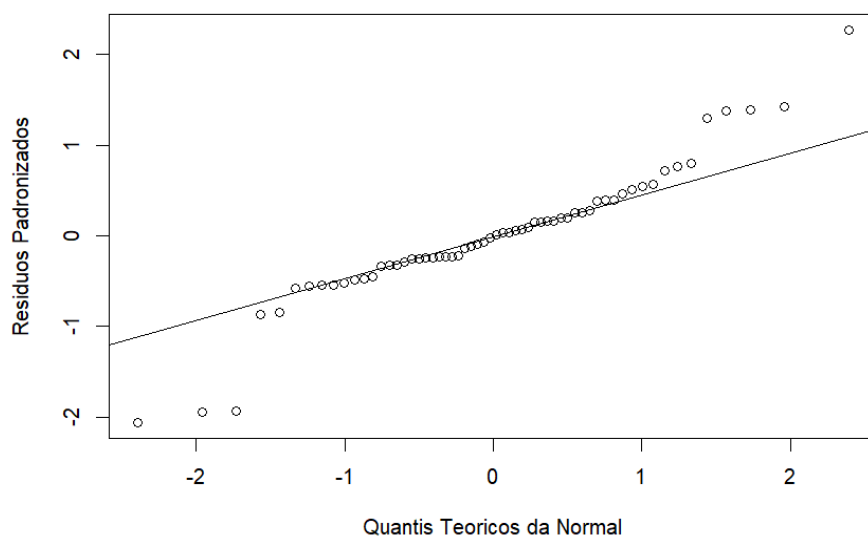


Figura B.26 Gráfico *qqplot* dos resíduos condicionais do modelo misto homocedástico no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

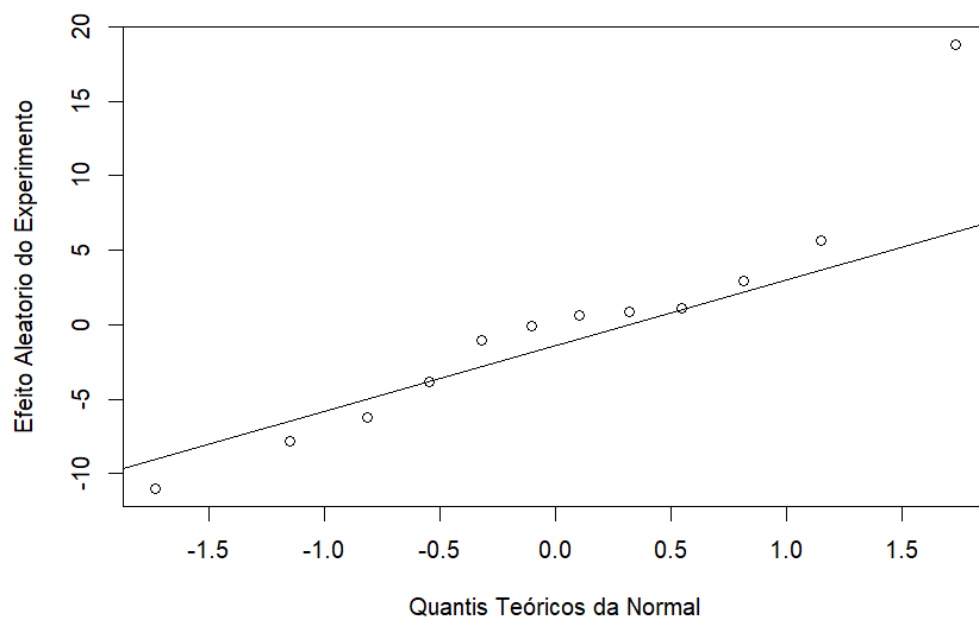


Figura B.27 Gráfico *qqplot* dos efeitos aleatórios do modelo misto homocedástico no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

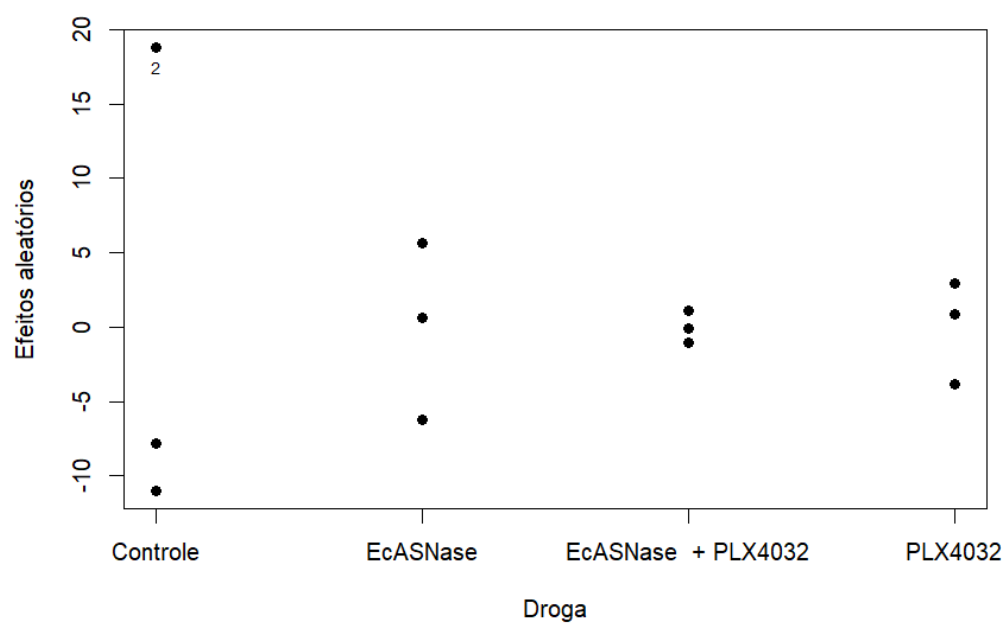


Figura B.28 Gráfico dos efeitos aleatórios do modelo misto homocedástico para cada tratamento no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

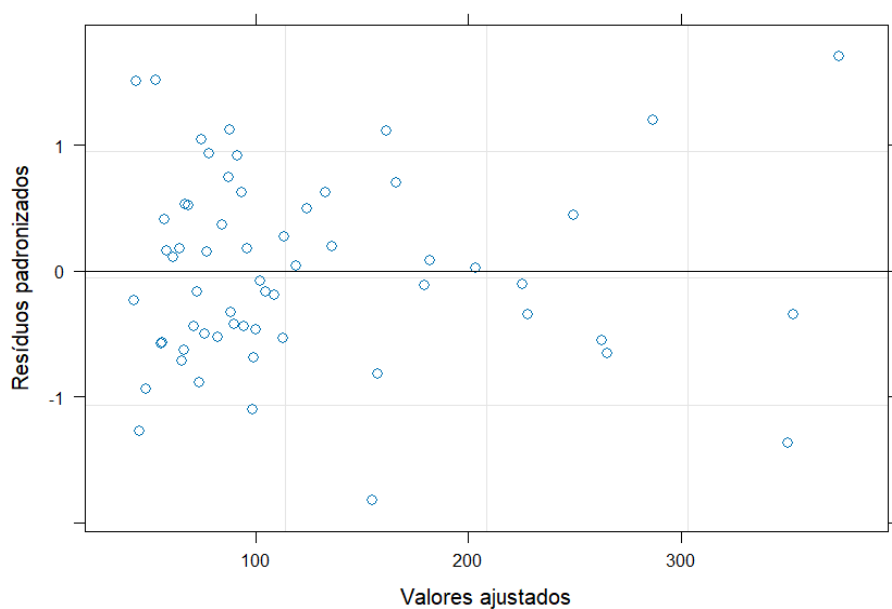


Figura B.29 Gráfico dos resíduos condicionais versus valores ajustados no modelo misto heterocedástico no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

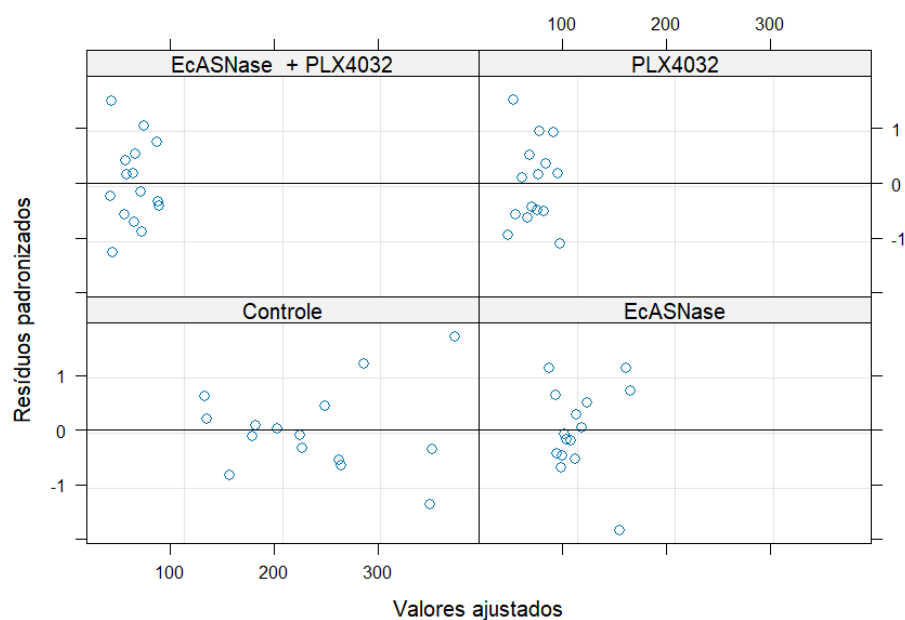


Figura B.30 Gráfico dos resíduos condicionais versus valores ajustados no modelo misto heterocedástico para os diferentes tratamentos no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

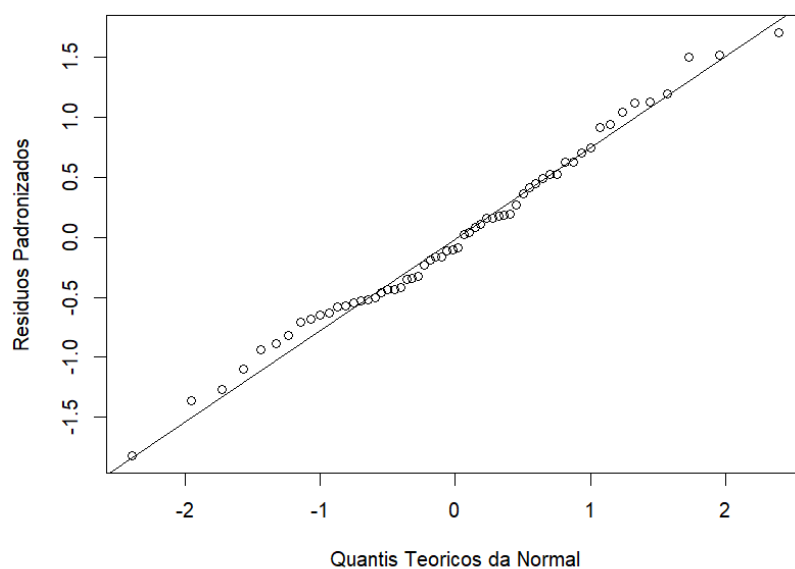


Figura B.31 Gráfico *qqplot* dos resíduos condicionais do modelo misto heterocedástico no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

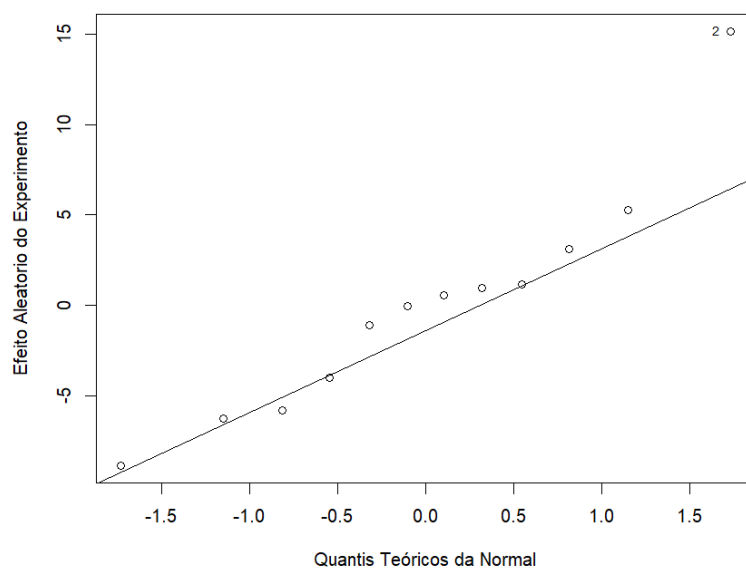


Figura B.32 Gráfico *qqplot* dos efeitos aleatórios do modelo misto heterocedástico no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

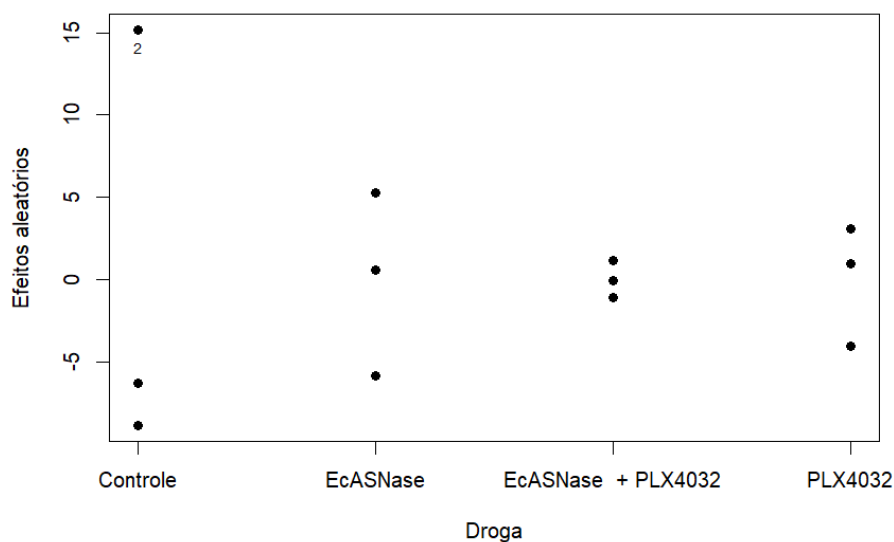


Figura B.33 Gráfico dos efeitos aleatórios do modelo misto heterocedástico para cada tratamento no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

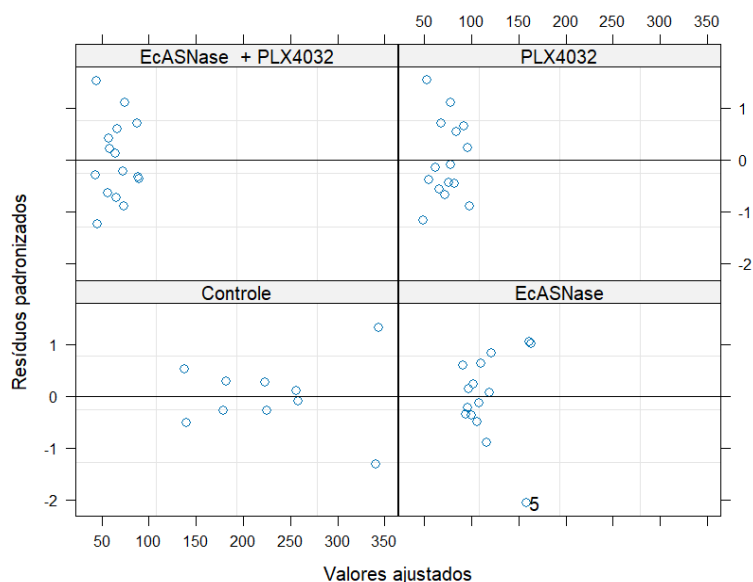


Figura B.34 Gráfico dos resíduos condicionais versus valores ajustados no modelo misto heterocedástico sem as observações do Experimento 2 do tratamento Controle para os diferentes tratamentos no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

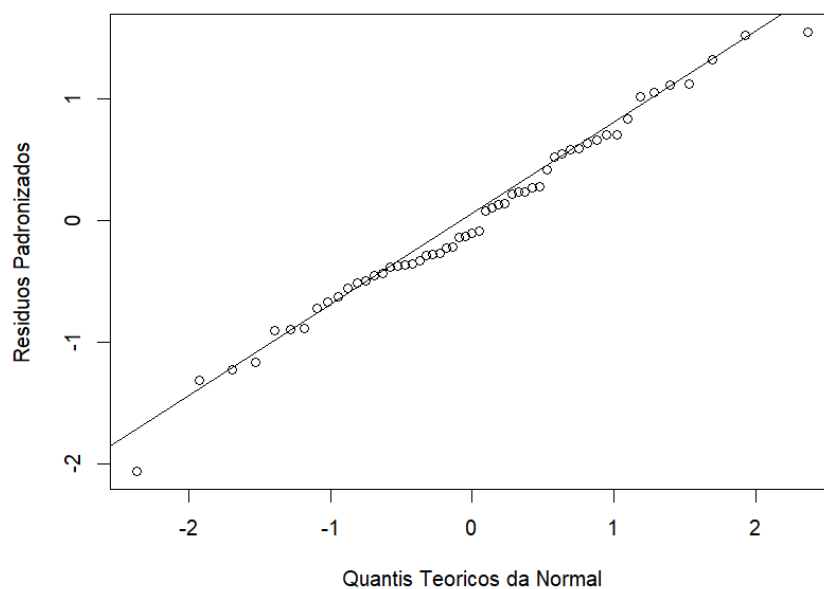


Figura B.35 Gráfico *qqplot* dos efeitos condicionais do modelo misto heterocedástico sem as observações do Experimento 2 do tratamento Controle no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

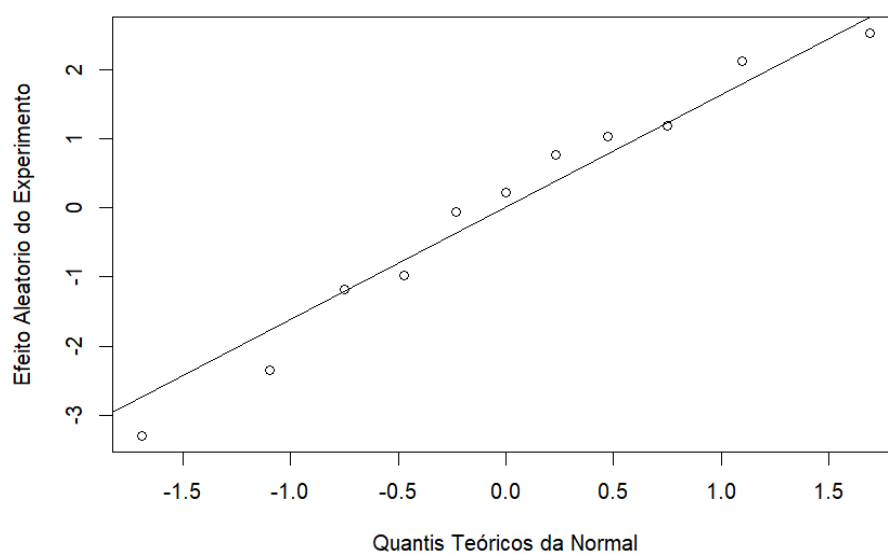


Figura B.36 Gráfico *qqplot* dos efeitos aleatórios do modelo misto heterocedástico sem as observações do Experimento 2 do tratamento Controle no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

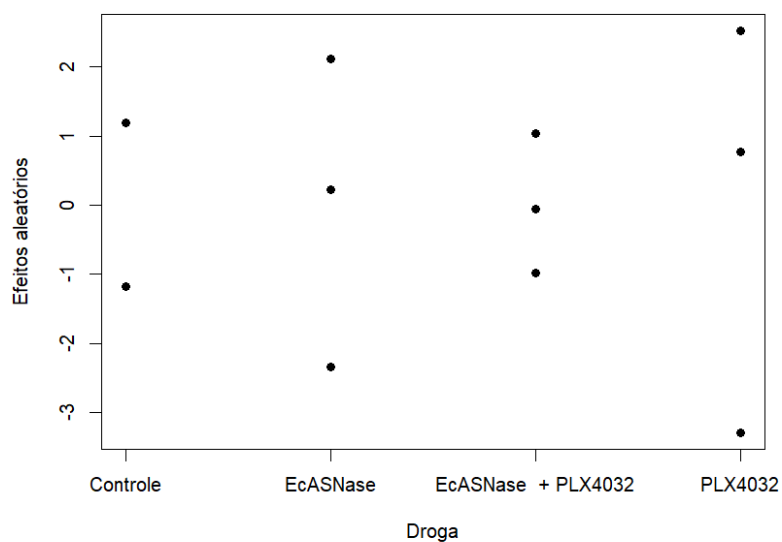


Figura B.37 Gráfico dos efeitos aleatórios do modelo misto heterocedástico sem as observações do Experimento 2 do tratamento Controle para cada tratamento no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164.

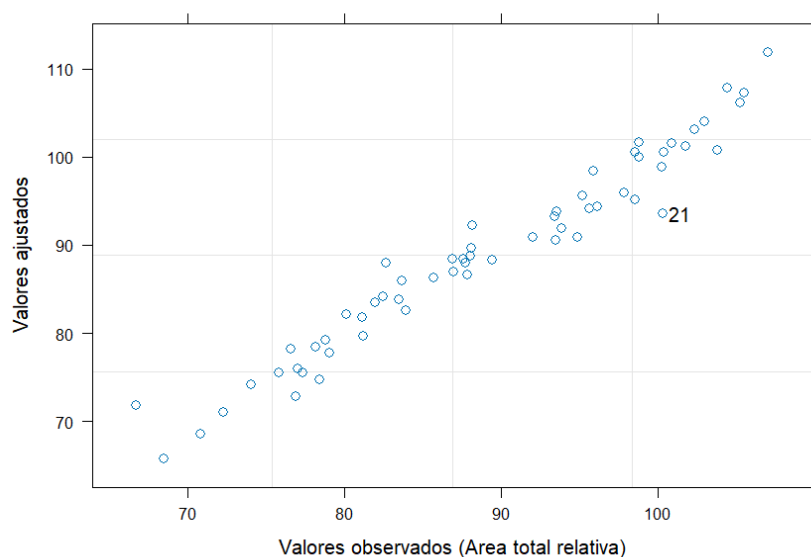


Figura B.38 Gráfico dos valores observados versus valores ajustados no modelo misto homocedástico ajustado para o ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164R.

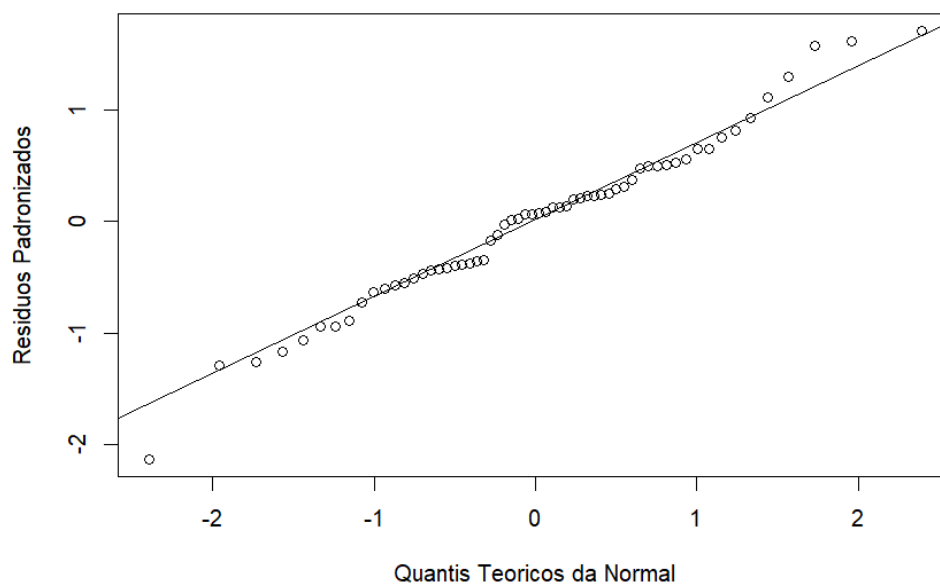


Figura B.39 Gráfico *qqplot* dos resíduos condicionais do modelo misto homocedástico ajustado para o ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164R.

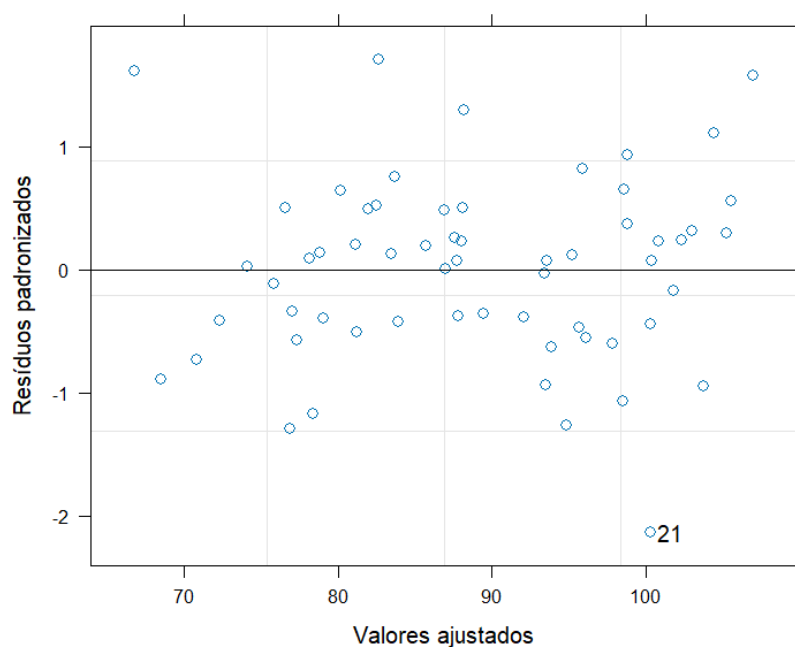


Figura B.40 Gráfico dos resíduos condicionais versus valores ajustados no modelo misto homocedástico no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164R.

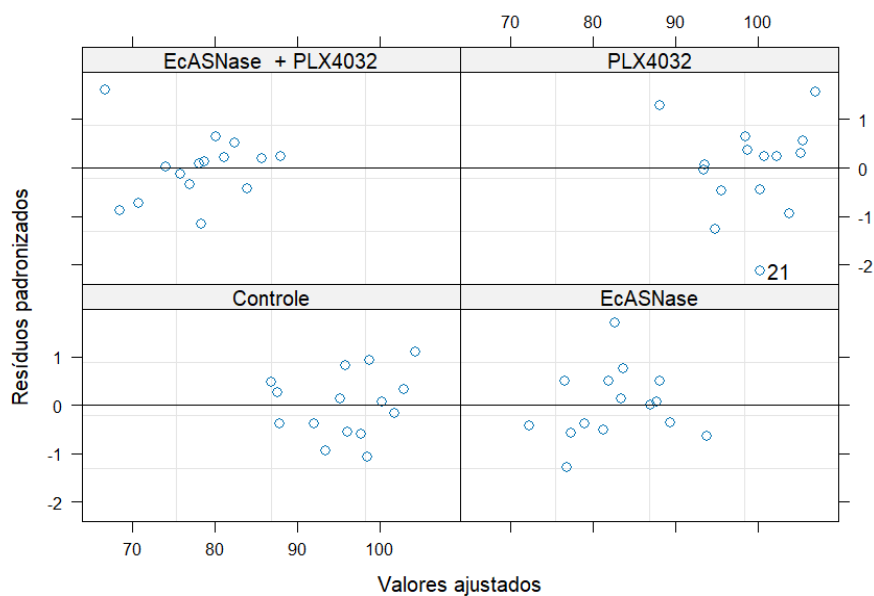


Figura B.41 Gráfico dos resíduos condicionais versus valores ajustados no modelo misto homocedástico para os diferentes tratamentos no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164R.

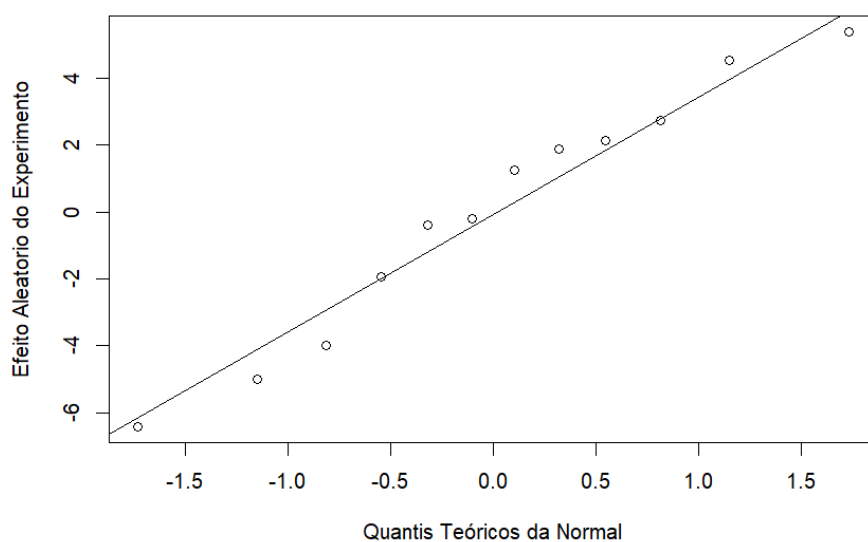


Figura B.42 Gráfico *qqplot* dos efeitos aleatórios do modelo misto homocedástico no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164R.

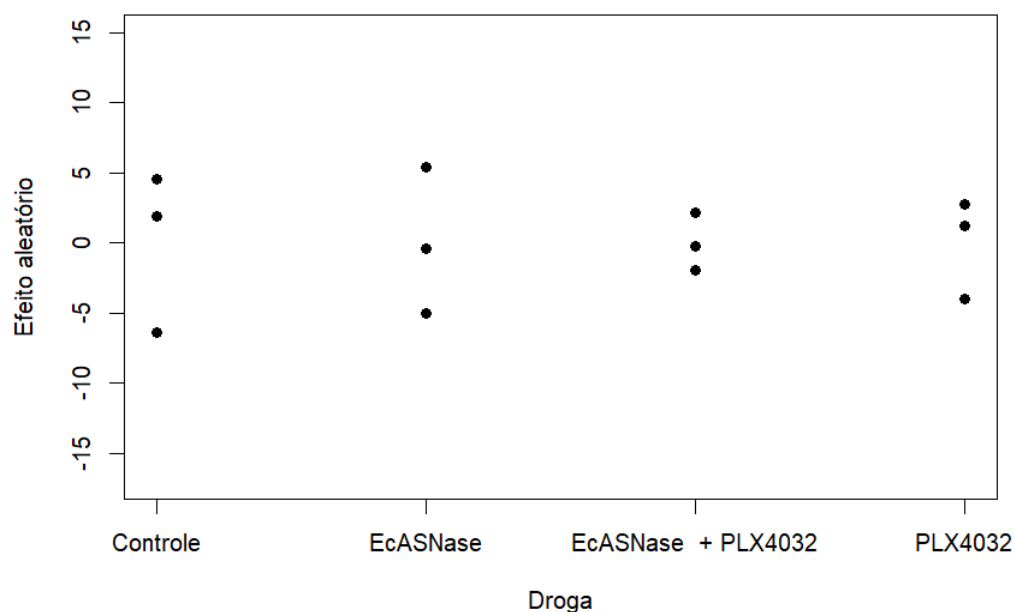


Figura B.43 Gráfico dos efeitos aleatórios do modelo misto homocedástico para cada tratamento no ensaio esferoide tumoral tridimensional sem Matrigel da linhagem WM164R.

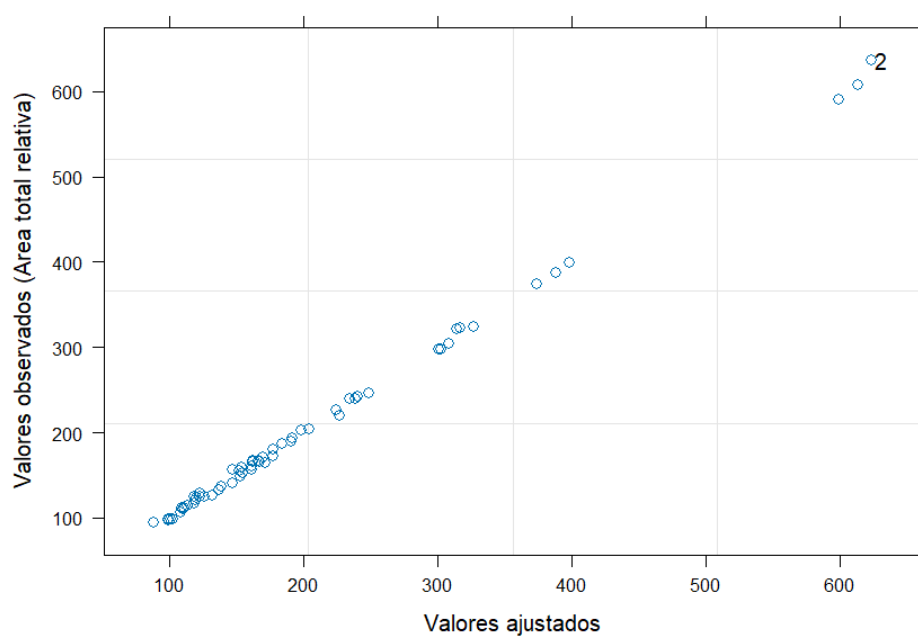


Figura B.44 Gráfico dos valores observados versus valores ajustados no modelo misto homocedástico ajustado para o ensaio esferoide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164.

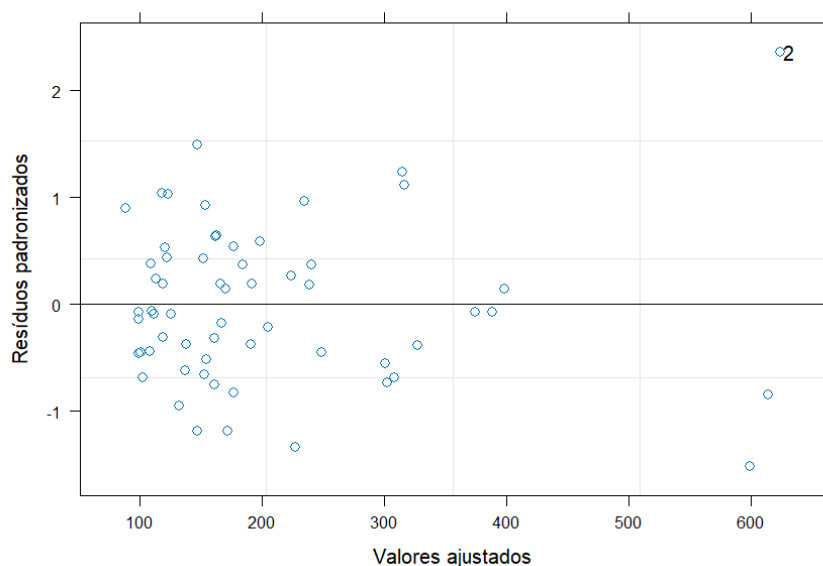


Figura B.45 Gráfico dos resíduos condicionais versus valores ajustados no modelo misto homocedástico no ensaio esferoide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164R.

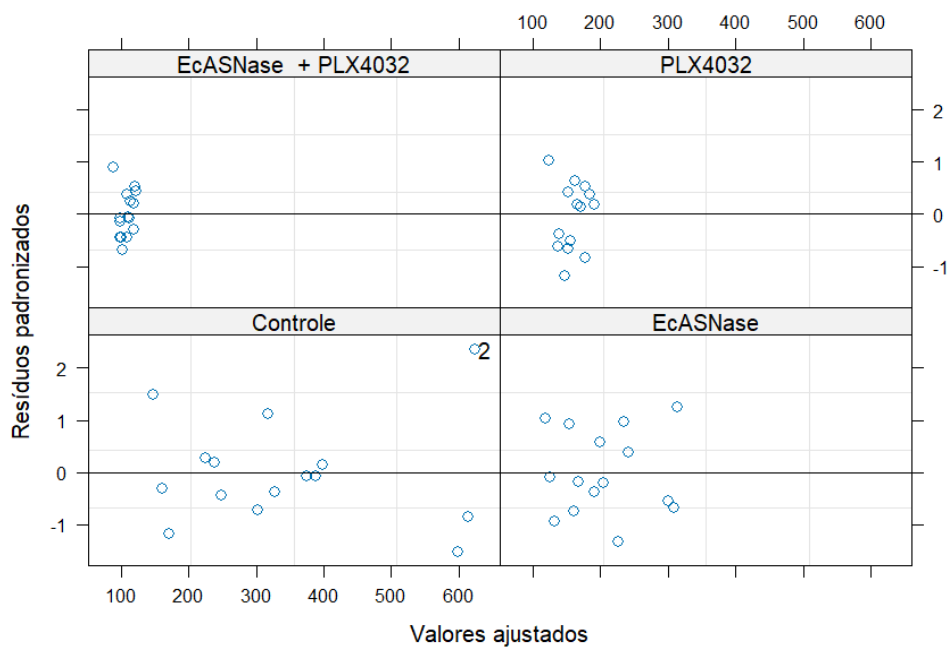


Figura B.46 Gráfico dos resíduos condicionais versus valores ajustados no modelo misto homocedástico para os diferentes tratamentos no ensaio esferoide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164.

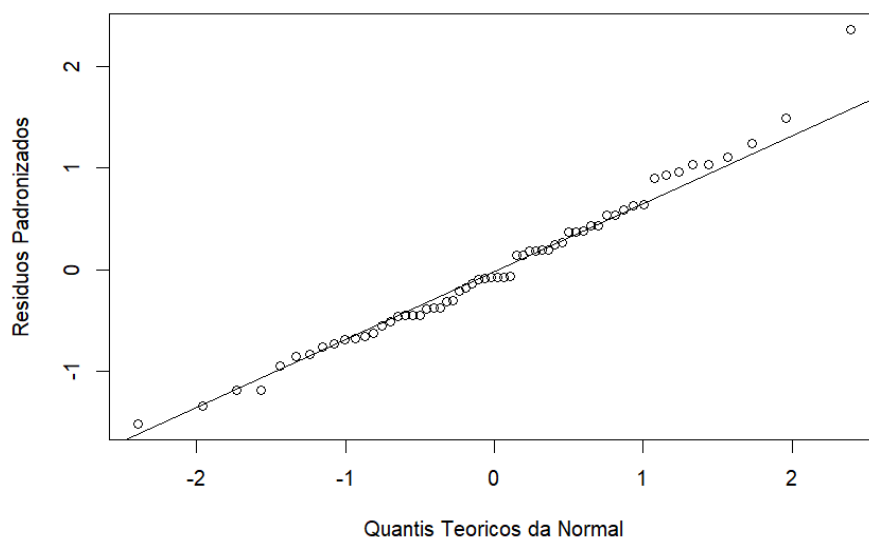


Figura B.47 Gráfico *qqplot* dos resíduos condicionais do modelo misto homocedástico ajustado para o ensaio esferoide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164.

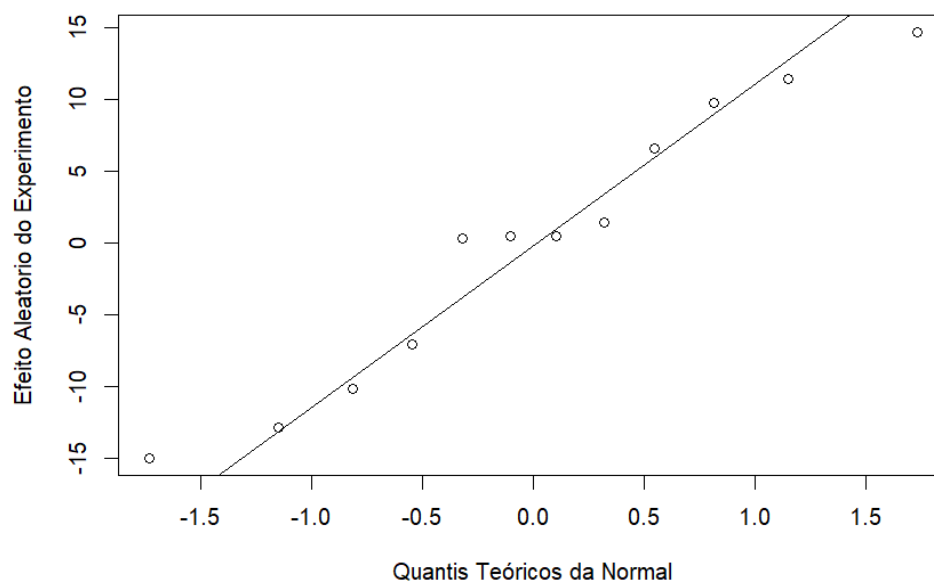


Figura B.48 Gráfico *qqplot* dos efeitos aleatórios do modelo misto homocedástico no ensaio esferoide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164.

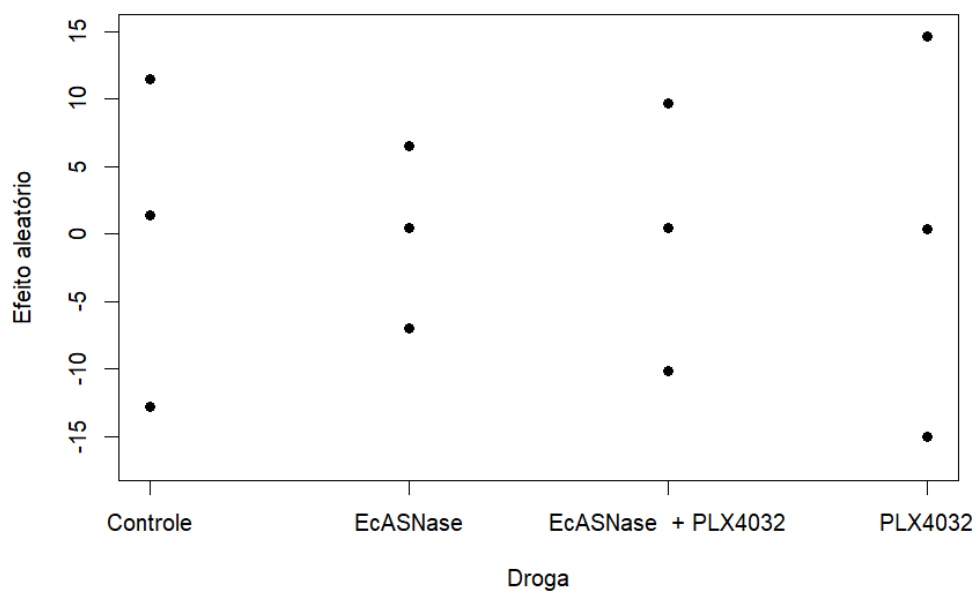


Figura B.49 Gráfico dos efeitos aleatórios do modelo misto homocedástico para cada tratamento no ensaio esferoide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164.

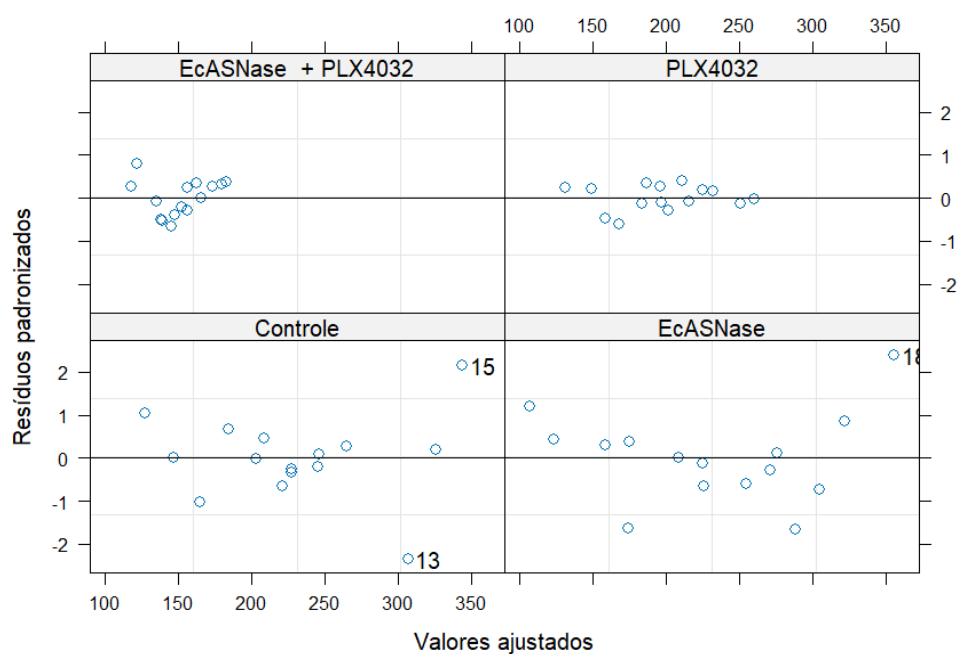


Figura B.50 Gráfico dos resíduos condicionais versus valores ajustados no modelo misto homocedástico para os diferentes tratamentos no ensaio esferoide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164R.

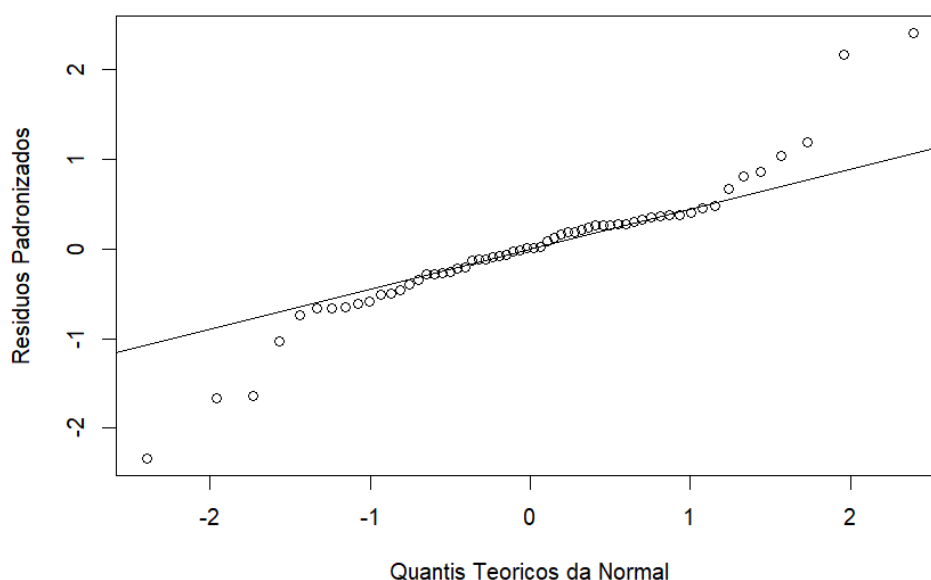


Figura B.51 Gráfico *qqplot* dos resíduos condicionais do modelo misto homocedástico ajustado para o ensaio esferoide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164R.

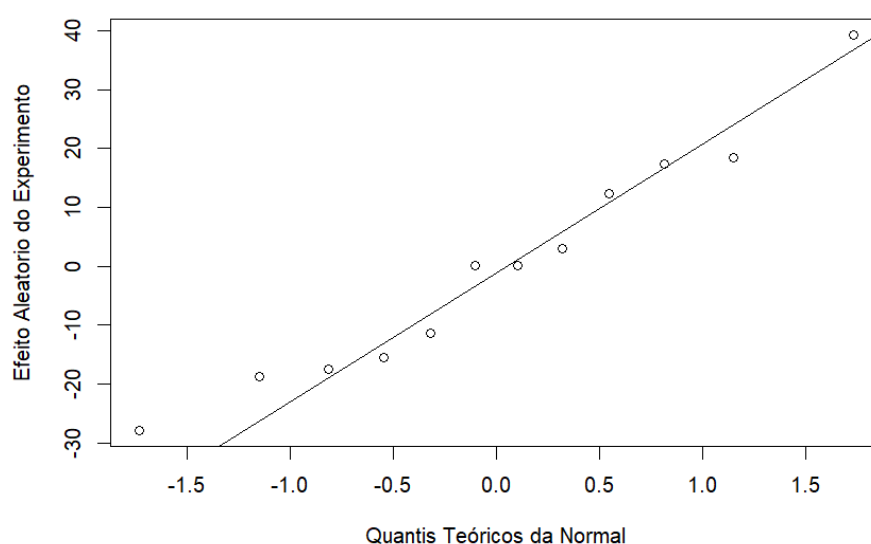


Figura B.52 Gráfico *qqplot* dos efeitos aleatórios do modelo misto homocedástico no ensaio esferoide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164R.

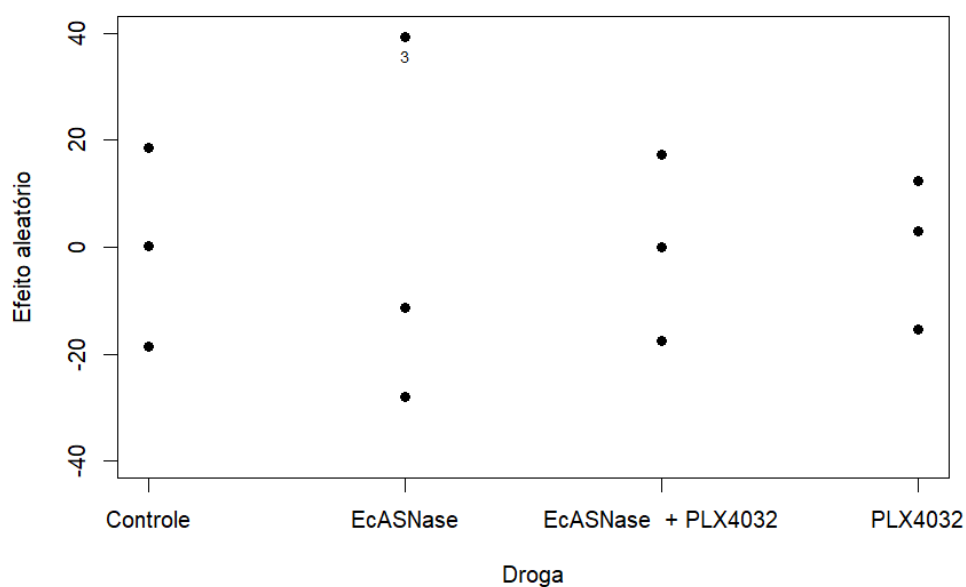


Figura B.53 Gráfico dos efeitos aleatórios do modelo misto homocedástico para cada tratamento no ensaio esferoide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164R.

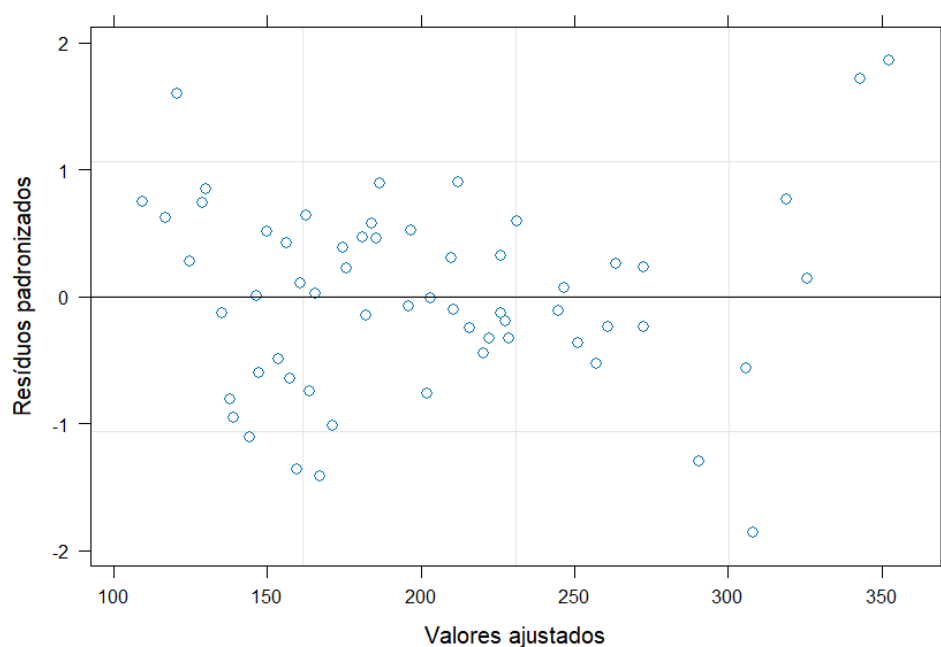


Figura B.54 Gráfico dos resíduos condicionais versus valores ajustados no modelo misto heterocedástico no ensaio esferoide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164R.

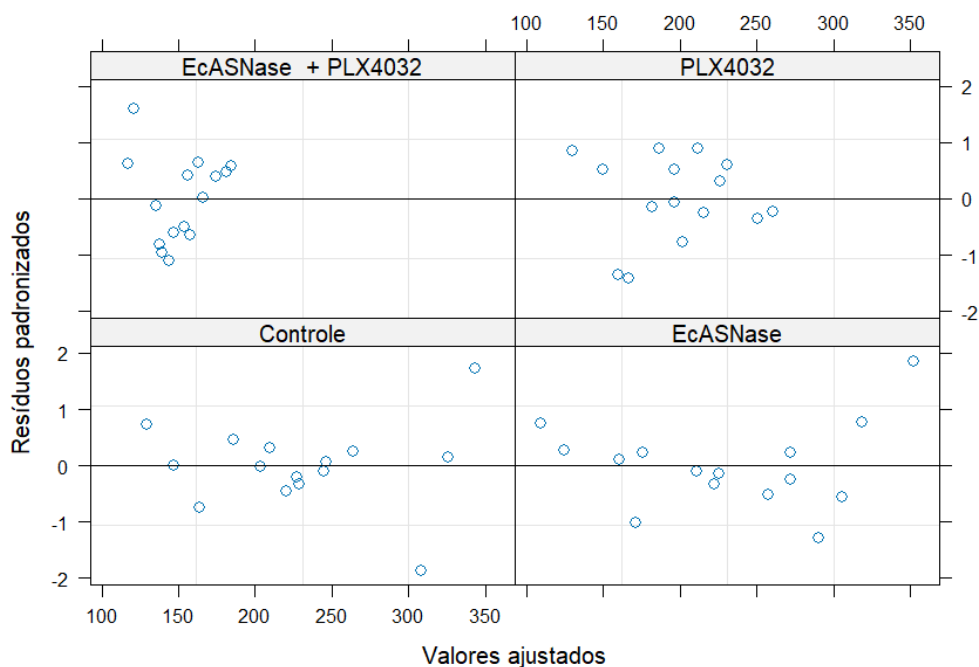


Figura B.55 Gráfico dos resíduos condicionais versus valores ajustados no modelo misto heterocedástico para os diferentes tratamentos no ensaio esferoide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164R.

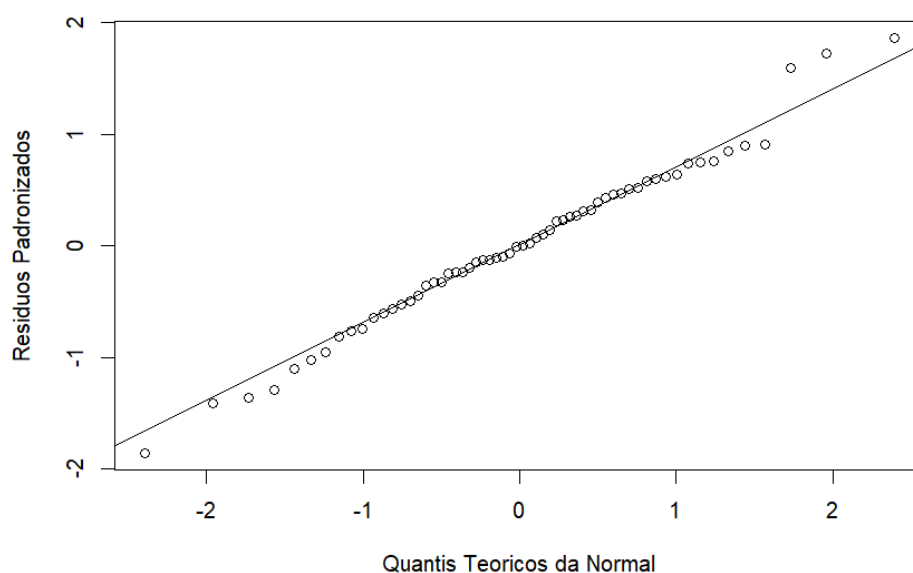


Figura B.56 Gráfico qqplot dos resíduos condicionais do modelo misto heterocedástico ajustado para o ensaio esferoide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164R.

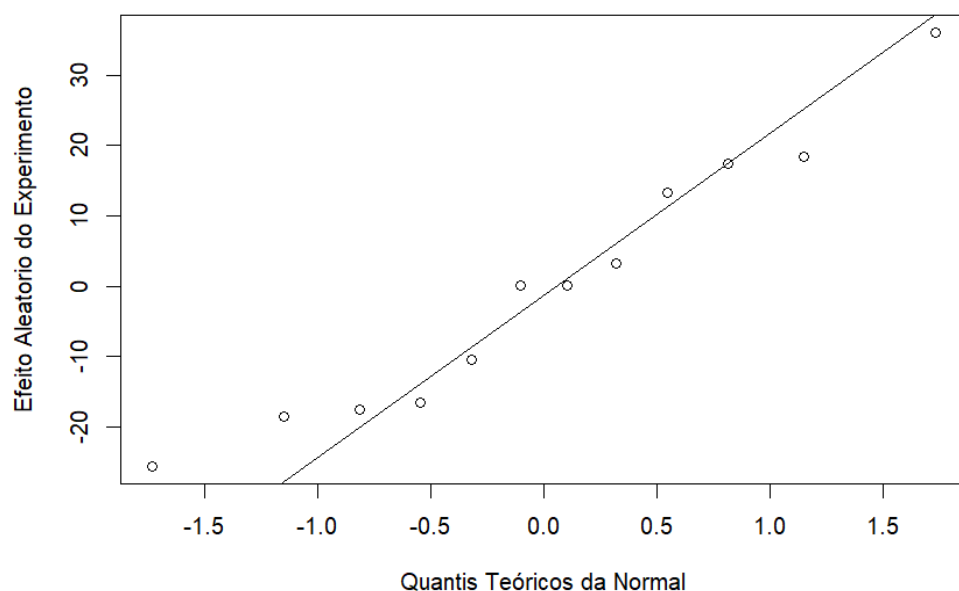


Figura B.57 Gráfico *qqplot* dos efeitos aleatórios do modelo misto heterocedástico no ensaio esferoide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164R.

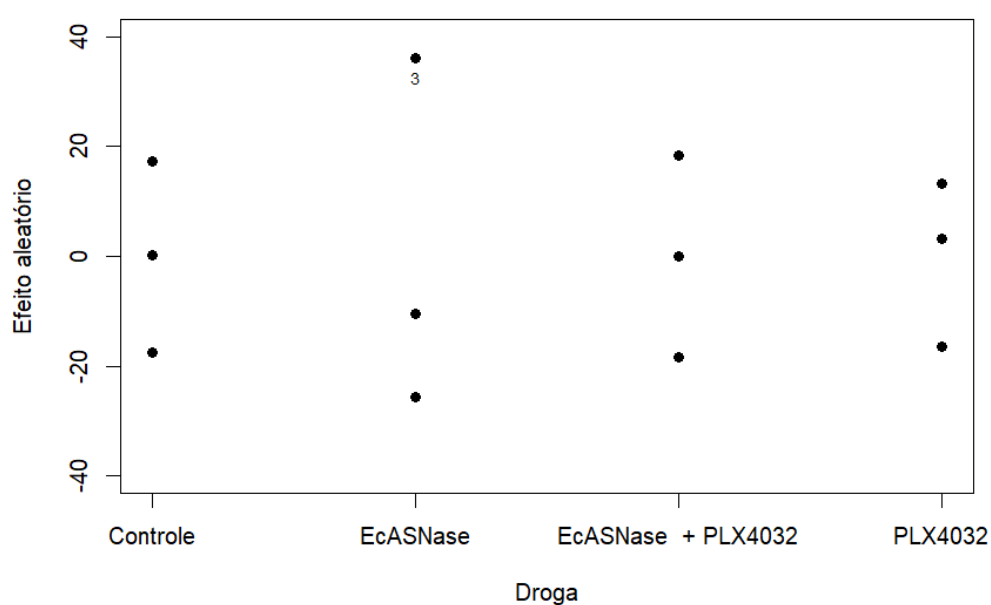


Figura B.58 Gráfico dos efeitos aleatórios do modelo misto heterocedástico para cada tratamento no ensaio esferoide tumoral tridimensional com Matrigel da linhagem WM164R.