

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA - CEA - USP
RELATÓRIO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA – CÓDIGO 02P22

TÍTULO: Relatório de análise estatística sobre o projeto: “Estudo dos mecanismos envolvidos na gênese da lesão dermonecrótica experimentalmente provocada pelo veneno da aranha marrom”

PESQUISADORA: Danielle Paixão Cavalcante

ORIENTADORA: Denise Vilarinho Tambourgi

INSTITUIÇÃO: Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo

FINALIDADE: Mestrado

RESPONSÁVEIS PELA ANÁLISE: Antonio Carlos Pedroso de Lima

Rinaldo Artes

Igor Luiz Quidim

Luís Gustavo do Amaral Vinha

REFERÊNCIA DESTE TRABALHO:

LIMA, A. C. P., ARTES, R., QUIDIM, I.L. e VINHA, L. G. A. **Relatório de análise estatística sobre o projeto: “Estudo dos mecanismos envolvidos na gênese da lesão dermonecrótica experimentalmente provocada pelo veneno da aranha marrom”** São Paulo, IME-USP, 2002. (CEA. Relatório de Análise Estatística, RAE – CEA – 02P22)

FICHA TÉCNICA

BIBLIOGRAFIA

BUSSAB, W. O. e MORETTIN, P.A. (2002). **Estatística Básica**. 5.ed. São Paulo: Saraiva. 540p.

BUSSAB, W. O. (1976). **Hierarchical Dichotomous Partitions in Cluster Analysis**. Londres. 236p. Tese (Doutorado). London School of Economics and Political Science - University of London.

NETER, J., KUTNER, M. H., NACHTSHEIM, C. J. and WASSERMAN, W. (1996). **Applied Linear Statistical Models**. 4.ed. Boston: Mc Graw Hill. 1408p.

PROGRAMAS COMPUTACIONAIS UTILIZADOS

- Microsoft Excel (versão 97)
- Microsoft Word (versão 97)
- Minitab 13 for Windows

TÉCNICAS ESTATÍSTICAS UTILIZADAS

[entre parênteses encontra-se a classificação ISI]

- Análise Descritiva Unidimensional (03:010)
- Análise de Variância com Efeitos Fixos (08:010)
- Comparações Múltiplas (08:090)
- Análise de Regressão Clássica (07:020)

ÁREA DE APLICAÇÃO

Bioestatística (14:030)

Índice

Resumo	5
1. Introdução.....	6
2. Descrição do Estudo.....	6
3. Descrição das Variáveis	10
4. Análise Descritiva	12
5. Análise Inferencial.....	17
Apêndice A	25
Apêndice B	33
Apêndice C	38
Apêndice D	45
Apêndice E	64

Resumo

Estudos relacionados ao veneno de aracnídeos e aos seus efeitos têm recebido atenção especial por parte de pesquisadores da área de saúde pública. Neste relatório serão analisados os efeitos do veneno da aranha marrom (*Loxosceles intermedia*) e de alguns reagentes em 4 tipos de células.

Foram utilizadas técnicas estatísticas para estudar os efeitos do veneno na viabilidade celular e na expressão de marcadores de superfície. No estudo de viabilidade celular foram detectadas diferenças significantes entre o Controle e o veneno, a toxina P2, Ceramida, TNF e Esfingomielinase na análise de células do tipo queratinócitos humanos; entre o Controle e o veneno, TNF, Esfingomielinase e toxinas P2 e P3 para os fibroblastos humanos; entre o Controle e veneno, TNF, PMA 10 nM e toxina P2 para os fibroblastos de coelho; e entre Controle e veneno para as células A431.

Para o estudo de expressão de marcadores de superfície foram encontradas diferenças significantes entre o Controle e o veneno para os marcadores: β 2M, DAF, MCP e MHC I para as células A431; CD59, MCP, MHC I, β 2M, EGRF e anexina para os queratinócitos humanos; e anexina para os fibroblastos de coelho.

1. Introdução

As aranhas do gênero *Loxosceles*, popularmente conhecidas como aranhas marrons, são consideradas das mais venenosas no Brasil. Essas aranhas são cosmopolitas e estão distribuídas nas regiões sul e sudeste do país. Os efeitos de seu veneno são observados de 2 a 8 horas após a picada, dificultando a reversão das reações que o indivíduo apresenta.

As pessoas picadas por esse aracnídeo podem apresentar reações locais e/ou sistêmicas. As reações locais podem variar de vermelhidão intensa no local da picada, nos casos menos graves, até a ocorrência de lesão dermonecrotica (pele preta e necrosada). As reações sistêmicas acometem principalmente idosos e crianças desnutridas. Nesses casos o veneno, ao entrar em contato com a corrente sanguínea, provoca o rompimento das hemácias podendo levar a um comprometimento renal, que é a principal causa de óbitos.

A resposta do organismo humano a esse veneno pode ser analisada através da viabilidade celular e da expressão de marcadores de superfície. A viabilidade celular é representada pela razão de células vivas após a aplicação de veneno, toxinas ou outro reagente, comparada a células livres da ação de reagentes (Controle). Os marcadores de superfície são moléculas aderidas à membrana das células e que podem ser reconhecidas por anticorpos; assim sendo, a expressão de marcadores de superfície representa o aumento ou redução dessas moléculas após o contato das células com os reagentes em estudo.

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do veneno da aranha marrom na viabilidade celular e na expressão de marcadores de superfície para alguns tipos de células presentes na pele humana. Em algumas etapas do estudo foram utilizadas células de coelho devido à similaridade com células humanas.

2. Descrição do Estudo

Foram utilizados 4 tipos de células: queratinócitos, fibroblastos humanos, células A431 (linhagem celular de carcinoma epidermóide humano) e fibroblastos de coelhos.

São apresentados a seguir os procedimentos de coleta dos dados para os estudos de viabilidade celular e expressão de marcadores, separadamente.

2.1. Viabilidade Celular

No estudo de viabilidade celular foram realizados 8 experimentos com diferentes tipos de células e diferentes reagentes. As células humanas foram obtidas junto a um banco de células da Faculdade de Medicina da Universidade de Cardiff (País de Gales) e as de coelho foram retiradas de um único animal diretamente pela pesquisadora.

Em cada experimento foram utilizadas células geneticamente idênticas, mantidas em placas de 24 poços com meio de cultura homogêneo. Após o fundo da placa ficar completamente preenchido com células, foram aplicados os reagentes. Foram utilizadas triplicatas ou quadruplicatas, ou seja, cada reagente foi aplicado em 3 ou 4 poços. Alguns poços foram mantidos sem a aplicação de reagentes (Controle).

Os dados foram coletados no 1º, 2º e 3º dia após a aplicação dos reagentes; entretanto, para alguns experimentos considerou-se apenas os dados do 1º e 3º dia e outros o 3º dia somente. Em cada dia de coleta foi analisada uma triplicata (ou quadruplicata) do Controle e de cada reagente.

Para a coleta dos dados, os meios de cultura foram substituídos por reagente colorímetro (corante) e as placas foram incubadas. Passado o período de incubação, foram coletados 100 µL de sobrenadante de cada poço e adicionados a 100 µL de água destilada em uma placa de fundo plano. A placa foi lida por um espectrofotômetro. De acordo com a refração do feixe de luz emitido, o aparelho identificava a cor presente, transformando-a em um valor numérico proporcional ao número de células vivas.

Os experimentos são detalhados na Tabela 2.1.1.

Tabela 2.1.1: Descrição dos experimentos – Viabilidade Celular.

Experimento	Tipo Celular	Reagente	Dose	Dias de Coleta
1	Queratinócitos humanos	P2	0,01 µg/mL	3º
		P2	0,30 µg/mL	
		P2	1,00 µg/mL	
		P2	3,00 µg/mL	
		P2	10,00 µg/mL	
		P2	20,00 µg/mL	
2	Queratinócitos humanos	Veneno	0,30 µg/mL	1º, 2º e 3º
		Veneno	1,00 µg/mL	
		Veneno	3,00 µg/mL	
		Ceramida	5 µM	
		TNF	10 ng/mL	
3	Queratinócitos humanos	Veneno	0,30 µg/mL	1º, 2º e 3º
		P2	1,00 µg/mL	
		P3	1,00 µg/mL	
		Esfingomielinase	100 µU/mL	
4	Fibroblastos humanos	Veneno	0,30 µg/mL	1º, 2º e 3º
		Veneno	1,00 µg/mL	
		Veneno	3,00 µg/mL	
		Ceramida	5 µM	
		TNF	10 ng/mL	
5	Fibroblastos humanos	Veneno	1,00 µg/mL	3º
		P2	1,00 µg/mL	
		P3	1,00 µg/mL	
		Esfingomielinase	100 µU/mL	
		Ceramida	5 µM	
6	Fibroblastos de coelho	P2	0,03 µg/mL	3º
		P2	0,10 µg/mL	
		P2	0,30 µg/mL	
		P2	1,00 µg/mL	
		P2	1,50 µg/mL	
		P2	3,00 µg/mL	
7	Fibroblastos de coelho	Veneno	3,00 µg/mL	1º e 3º
		Ceramida	5 µM	
		TNF	10 ng/mL	
		PMA	1 nM	
		PMA	10 nM	
8	A431	Veneno	3,00 µg/mL	3º
		Veneno+tetraciclina	3,00 µg/mL + 50 µM	
		Veneno+ tetraciclina	3,00 µg/mL + 150 µM	
		Veneno+ tetraciclina	3,00 µg/mL + 500 µM	
		Tetraciclina	50 µM	
		Tetraciclina	150 µM	
		Tetraciclina	500µM	

2.2. Expressão de Marcadores de Superfície

Para esse estudo as células foram cultivadas em garrafas de cultura. Após serem descoladas e lavadas para a retirada do meio, as células foram divididas em diferentes tubos onde foram aplicados os reagentes. Alguns tubos foram mantidos sem reagentes (Controle).

Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com os anticorpos específicos para os marcadores DAF, MCP, MHC I, β 2m, EGFR, CD29, CD58 e CD59. Em cada tubo foi adicionado apenas um anticorpo específico. As amostras foram lavadas novamente e então incubadas com anticorpos secundários. Finalmente, após a terceira lavagem, os dados foram coletados através de um citômetro de fluxo que gera um valor proporcional à quantidade de moléculas aderidas à superfície da célula.

Na Tabela 2.2.1 são apresentados os tipos celulares, as doses, os reagentes e os marcadores estudados em cada experimento.

Tabela 2.2.1: Descrição dos experimentos – Marcadores de Superfície.

Experimento	Tipo Celular	Reagente	Dose (μ g/mL)	Marcador
1	A431	Veneno	12,00	CD59, DAF, MCP, MHC I,
		Veneno	20,00	β 2M, EGFR, CD29, CD58
2	Queratinócitos humanos	Veneno	12,00	CD59, DAF, MCP, MHC I,
		Veneno	20,00	β 2M, EGFR, CD29
3	Fibroblastos humanos	Veneno	20,00	CD59, DAF, MCP, MHC I

Ainda no estudo de expressão de marcadores de superfície, foram realizados experimentos para verificar a presença da molécula de anexina nas células. Os procedimentos, nesse caso, são diferentes dos descritos anteriormente.

As células previamente tratadas, com veneno ou não, foram descoladas da garrafa de cultura, lavadas e recolocadas em suspensão na concentração de 1×10^6 células/mL e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as células foram recolocadas em suspensão em 100 μ L de tampão anexina V sendo incubadas em ambiente escuro. Após a incubação os dados foram imediatamente coletados através de um citômetro de fluxo.

Foram realizados 3 experimentos para verificar a presença da anexina, conforme apresentado na Tabela 2.2.2, em que são apresentados os tipos celulares, as doses e reagentes utilizados e os dias de coleta de cada experimento.

Tabela 2.2.2: Descrição dos experimentos – Marcadores de Superfície (Molécula anexina).

Experimento	Tipo Celular	Reagente	Dose (μ g/mL)	Dias de Coleta
4	Fibroblastos de coelho	Veneno	3,00	1º, 2º e 3º
5	Queratinócitos humanos	Veneno	1,00	1º, 2º e 3º
		Veneno	3,00	
6	Fibroblastos de coelho	Veneno	3,00	3º
		P2	20,00	

3. Descrição das Variáveis

A variável analisada no estudo de viabilidade celular é:

- **índice de viabilidade:** razão entre o valor correspondente à cor encontrada na amostra e o valor médio correspondente à cor encontrada no grupo Controle, corrigidos pelo valor da cor inicial do corante. Utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Valor obtido na amostra corrigido pelo valor do corante}}{\text{Média dos valores do Controle corrigida pelo valor do corante}} \times 100$$

As variáveis referentes ao estudo de expressão de marcadores de superfície são:

- **DAF:** mediana do número de moléculas DAF presentes na superfície das células de cada tubo;
- **MCP:** mediana do número de moléculas MCP presentes na superfície das células de cada tubo;
- **MHC I:** mediana do número de moléculas MHC I presentes na superfície das células de cada tubo;
- **$\beta 2m$:** mediana do número de moléculas $\beta 2m$ presentes na superfície das células de cada tubo;
- **EGRF:** mediana do número de moléculas EGRF presentes na superfície das células de cada tubo;
- **CD29:** mediana do número de moléculas CD29 presentes na superfície das células de cada tubo;
- **CD58:** mediana do número de moléculas CD58 presentes na superfície das células de cada tubo;
- **CD59:** mediana do número de moléculas CD59 presentes na superfície das células de cada tubo;
- **anexina:** mediana do número de moléculas anexina presentes na superfície das células de cada tubo;
- **presença de anexina (%):** porcentagem de células com a molécula anexina ligada à sua superfície.

Na preparação dos experimentos foram controlados os seguintes fatores:

- **Reagente:** substância aplicada nos meios de cultura das células podendo ser: veneno, toxina P2, toxina P3, ceramida, TNF, PMA, esfingomielinase e tetraciclina;
- **Dose:** dose do reagente aplicado no meio de cultura. Para os reagentes veneno, toxina P2 e toxina P3 a unidade de medida é $\mu g/mL$, para o reagente tetraciclina a unidade é μM e para o reagente PMA a unidade é nM;
- **Tempo decorrido (dias):** número de dias após o início do experimento.

4. Análise Descritiva

Nesta seção apresenta-se uma análise descritiva dos dados para o estudo de viabilidade celular e para a expressão de marcadores de superfície.

4.1. Viabilidade Celular

As tabelas de medidas-resumo (Bussab e Morettin, 2002) referentes ao estudo de Viabilidade Celular são apresentadas no Apêndice A.

No Apêndice B são apresentados gráficos com os resultados dos diferentes experimentos. Estes gráficos contêm as médias com os correspondentes erros padrão do índice de viabilidade para cada tratamento (combinação dos fatores controlados em cada experimento).

O Gráfico B.1 corresponde à análise dos queratinócitos humanos do Experimento 1. Pode-se observar que para as doses 0,01 e 0,03 $\mu\text{g/mL}$ da toxina P2 as médias do índice de viabilidade estão acima de 100% o que indica que essas células se multiplicaram com maior intensidade que as células do Controle. Para as doses 3,00, 10,00 e 20,00 $\mu\text{g/mL}$ as médias encontram-se em torno de 41%. O erro padrão diminui com o aumento da dose.

No Experimento 2, os dados foram coletados no 1º, 2º e 3º dia após a aplicação dos reagentes. Pelo Gráfico B.2, observa-se que, para todos os reagentes, a média do índice de viabilidade dos queratinócitos humanos diminui com o passar dos dias. O reagente TNF apresenta as maiores médias e o reagente Ceramida, as menores considerando-se os três dias.

Analisando o Gráfico B.3, referente ao Experimento 3, pode-se observar que a média do índice de viabilidade dos queratinócitos humanos tem comportamento diferente de acordo com o reagente aplicado. O índice de viabilidade médio diminui com o passar dos dias para as células tratadas com Veneno e toxina P2, enquanto que para a toxina P3 ocorre o contrário. Para o reagente Esfingomielinase o índice de viabilidade médio aumentou do 1º para o 2º dia e diminuiu do 2º para o 3º dia. Nota-se que para as células tratadas com veneno, o desvio padrão do dia 2 é maior que os demais.

No Experimento 4 foi analisado o índice de viabilidade dos fibroblastos humanos. Observa-se, no Gráfico B.4, uma redução na média dessa variável nas células tratadas com Veneno nas diferentes doses. As células em que foi aplicada a Ceramida apresentaram redução do índice de viabilidade médio do 1º para o 2º e aumento do 2º para o 3º dia. Para as células em que foram aplicados TNF observam-se as maiores médias e também um aumento do 1º para o 2º e redução do 2º para o 3º dia.

Os fibroblastos humanos também foram utilizados no Experimento 5 mas, nesse caso, os dados foram coletados somente após o 3º dia. Pelo Gráfico B.5, verifica-se que a média do índice de viabilidade é menor para as células onde foi aplicado o Veneno. As células tratadas com a toxina P2 possuem menores médias que as células tratadas com a toxina P3. Para os reagentes Esfingomielinase e Ceramida as médias do índice de viabilidade são $90,01 \pm 2,08^1$ e $95,94 \pm 2,40$, respectivamente.

No Gráfico B.6 são apresentados os resultados da análise descritiva do Experimento 6, onde foram utilizados os fibroblastos de coelho e a toxina P2 em diferentes doses. A média do índice de viabilidade das células em que foi aplicada a dose 0,03 µg/mL está acima de 100%, indicando que essas células se multiplicaram com maior intensidade que as do Controle. Observa-se também que há uma redução da média dessa variável com o aumento da dose aplicada.

No Experimento 7 também foram analisados os fibroblastos de coelhos, com dados coletados no 1º e 3º dia. Pelo Gráfico B.7, pode-se observar que as células onde foram aplicados PMA (nas doses 1,0 e 10,0 nM) e TNF apresentaram aumento da média do índice de viabilidade, sendo que esse aumento é mais acentuado para o reagente PMA na dose de 1nM. As células nas quais foram aplicados os reagentes Ceramida e Veneno apresentaram redução da média do índice de viabilidade, sendo que para o Veneno, essa redução é mais acentuada.

No Experimento 8 foram utilizados, além do Veneno, o inibidor tetraciclina em células A431. São apresentados, no Gráfico B.8, os perfis de médias com os respectivos erros padrão para o Controle e para células tratadas com 3,00 µg/mL do Veneno. Para esses dois grupos foram aplicadas diferentes doses do reagente

¹ Valor correspondente ao erro padrão

tetraciclina que age como inibidor. Para o Controle, observa-se uma tendência de redução da média do índice de viabilidade e para as células onde foi aplicado o Veneno, verifica-se o aumento dessa média entre as doses 0 e 150 μM e redução na dose 500 μM .

4.2. Expressão de Marcadores de Superfície

As tabelas com os dados referentes ao estudo de Expressão de Marcadores de Superfície são apresentadas no Apêndice C.

Na Seção 3, as variáveis desse estudo (exceto a variável presença de anexina) foram definidas como a mediana do número de moléculas aderidas à superfície das células de cada tubo, uma vez que ela é a medida usualmente utilizada na área e o tubo é a unidade experimental.

Tabela 4.2.1: Médias e respectivos erros padrão de cada variável do Experimento 1.

Variável	Controle		Veneno 12,00 $\mu\text{g/mL}$		Veneno 20,00 $\mu\text{g/mL}$	
	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão
CD59	-	-	37,2	0,7	38,6	0,7
DAF	10,8	0,4	8,5	0,2	9,7	0,0
MCP	10,6	0,6	5,1	0,1	2,7	0,2
MHC I	9,2	0,5	2,0	0,1	3,1	0,3
$\beta 2\text{M}$	34,6	0,6	-	-	5,0	0,1
EGRF	7,3	0,8	8,6	2,6	33,5	3,0
CD29	25,5	0,9	19,9	1,4	-	-
CD58	5,9	0,6	3,1	1,3	-	-

Pela Tabela 4.2.1, observa-se que para todas as variáveis as médias referentes às observações do grupo Controle são superiores às médias obtidas nos tratamentos com aplicação de veneno em diferentes doses, exceto para o marcador EGRF, para o qual observa-se que a média do Controle apresenta o menor valor.

Tabela 4.2.2: Médias e respectivos erros padrão de cada variável do Experimento 2.

Variável	Controle		Veneno 12,00 µg/mL		Veneno 20,00 µg/mL	
	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão
CD59	198,1	0,0	96,0	15,4	159,6	0,0
DAF	7,9	0,1	7,4	0,1	7,3	0,3
MCP	28,4	1,0	13,4	1,4	8,6	0,1
MHC I	22,1	0,8	5,7	0,6	3,2	0,1
β2M	117,6	2,1	40,7	0,0	13,8	2,2
EGRF	23,7	0,0	16,3	0,3	11,3	0,2
CD29	157,0	8,5	145,9	2,6	129,0	9,3

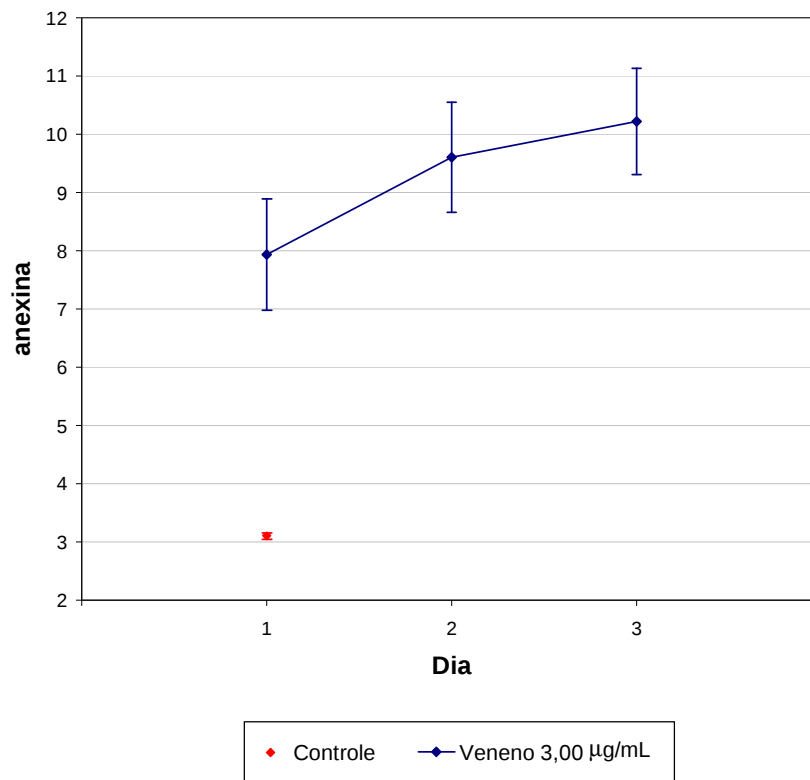
Tabela 4.2.3: Médias e respectivos erros padrão de cada variável do Experimento 3.

Variável	Controle		Veneno 20,00 µg/mL	
	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão
CD59	111,4	0,0	107,5	0,0
DAF	15,4	0,0	14,1	0,3
MCP	10,0	0,0	5,8	0,0
MHC I	13,9	4,6	9,9	0,8

Analisando as Tabelas 4.2.2 e 4.2.3, observa-se que para todas as variáveis as médias referentes ao grupo Controle são maiores do que as demais.

Nos Experimentos 4 e 5, diferentemente dos demais, os dados foram coletados no 1º, 2º e 3º dias após a aplicação do veneno. No Gráfico 4.2.1 são apresentados os perfis médios da variável anexina referente ao Experimento 4.

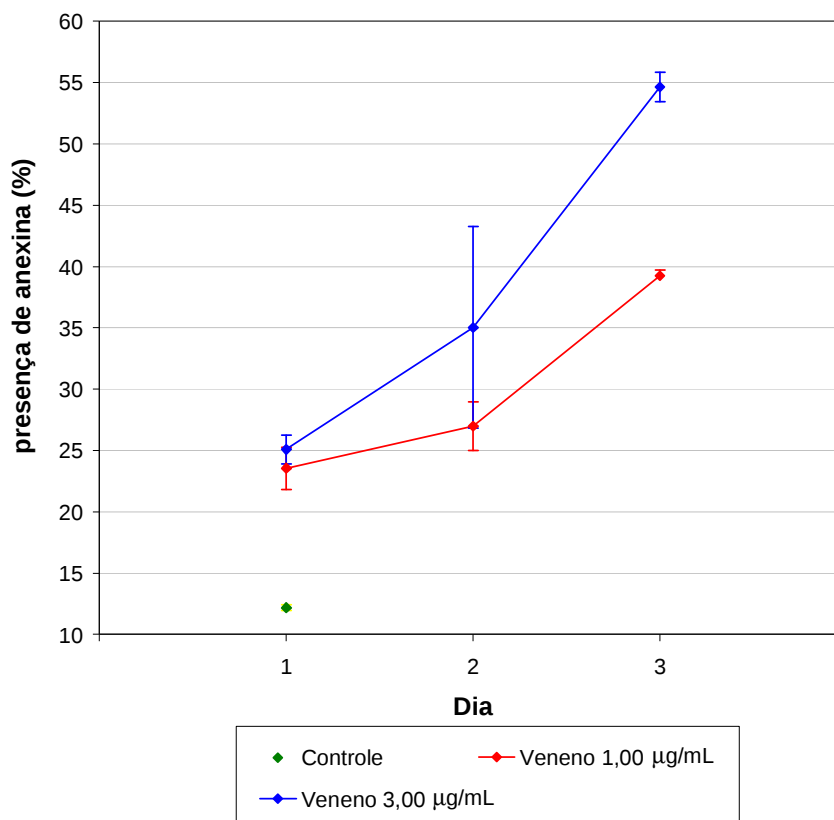
Gráfico 4.2.1: Perfis médios da variável anexina (com os correspondentes erros padrão) para o Experimento 4.



Pelo Gráfico 4.2.1, verifica-se que média da variável anexina do Controle é menor quando comparada com as médias dessa variável dos tubos onde foi aplicado veneno. Nota-se também que as médias da anexina, para o grupo Veneno crescem com o passar dos dias.

Nos Experimentos 5 e 6 foi analisada a variável presença de anexina. No Gráfico 4.2.2 são apresentados os perfis médios correspondentes ao Experimento 5.

Gráfico 4.2.2: Perfis médios da variável presença de anexina (com os correspondentes erros padrão) para o Experimento 5.



No Gráfico 4.2.2, observa-se que a média da variável presença de anexina do Controle é inferior à média dos tubos sob a aplicação de 1,00 e 3,00 µg/mL de veneno. Verifica-se também que essas doses, a média cresce com o passar dos dias.

No Experimento 6, observa-se que o Controle apresenta o menor valor para a variável presença de anexina (Tabela C.25).

5. Análise Inferencial

A Análise Inferencial, a exemplo da descritiva, é apresentada separadamente para os estudos de viabilidade celular e expressão de marcadores de superfície.

5.1 Viabilidade Celular

Para todos os experimentos desse estudo a técnica estatística utilizada foi a Análise de Variância (ANOVA). O principal objetivo é comparar as médias do índice de

viabilidade para os diferentes tratamentos (Neter et al., 1996). Os fatores controlados em cada experimento são apresentados na Tabela 2.1.1.

O Apêndice D contém os resultados destas análises. São apresentados, para cada experimento, os intervalos de confiança para o índice médio de viabilidade dos diferentes tratamentos e as comparações pertinentes. Para os Experimentos 2, 3, 4, 7 e 8 são apresentados também os quadros da ANOVA. A seguir são destacados alguns resultados importantes.

Considerando os Experimentos 1 e 6, foram detectadas diferenças significantes entre as médias do índice de viabilidade para as diferentes doses de P2 ($p < 0,001$), e para o Experimento 5, entre as médias dos diferentes reagentes ($p < 0,001$).

Nos Experimentos 2, 3 e 4 foram controlados Reagente e Tempo decorrido (dias), e foi detectado efeito de interação entre esses fatores ($p < 0,001$), ou seja, o comportamento das médias do índice de viabilidade das células submetidas aos diferentes reagentes varia diferentemente conforme o dia.

Na análise do Experimento 7 também foram controlados os fatores Reagente e Tempo decorrido, mas nesse caso não foi detectada interação ($p = 0,450$). Foram detectadas diferenças significantes das médias do índice de viabilidade somente entre os diferentes reagentes.

Para comparar os tratamentos com o grupo Controle nos experimentos 1 a 7, foram construídos intervalos de confiança (95%) e verificado se continham o valor 100, situação em que não haveria diferença entre um dado tratamento e o grupo Controle. Os tratamentos que não se apresentavam nessas condições estão listados na Tabela 5.1.1.

Tabela 5.1.1: Tratamentos em que foram detectadas diferenças significantes com o Grupo Controle (Experimentos 1 a 7).

Experimento	Tratamento	Dia
1	dose 1,00 de P2	-
	dose 3,00 de P2	-
	dose 10,00 de P2	-
	dose 20,00 de P2	-
2	Ceramida	1º, 2º e 3º
	Veneno 0,30	2º e 3º
	Veneno 1,00	2º e 3º
	Veneno 3,00	2º e 3º
	TNF	3º
3	Veneno	1º, 2º e 3º
	P2	1º **, 2º e 3º
	P3	1º
	Esfingomielinase	1º, 2º e 3º
4	Veneno 0,30	3º
	Veneno 1,00	3º
	Veneno 3,00	3º
	TNF	2º ** e 3º **
5	Esfingomielinase	-
	P2	-
	P3	-
	Veneno	-
6	Dose 1,00 de P2	-
	Dose 1,50 de P2	-
	Dose 3,00 de P2	-
7*	PMA 10 nM	-
	TNF	-
	Veneno	-

* Neste experimento não foi detectada diferença significativa entre os dias, logo foi construído apenas um intervalo.

** O limite inferior do intervalo de confiança nesse caso está acima do valor 100.

A Tabela 5.1.2 apresenta as comparações em que foram detectadas diferenças significantes entre as médias do índice de viabilidade dos tratamentos para cada experimento (nível de significância de 5%). Na Tabela 5.1.3 são apresentadas as comparações entre os dias para cada reagente (somente para os Experimentos 2 a 4).

Tabela 5.1.2: Comparações entre as médias do índice de viabilidade dos tratamentos cujas diferenças são significantes (Experimentos 1 a 7).

Experimento	Comparação	Dia
1	dose 1,00 – dose 0,01	-
	dose 3,00 – dose 0,01	-
	dose 10,00 – dose 0,01	-
	dose 20,00 – dose 0,01	-
	dose 1,00 – dose 0,30	-
	dose 3,00 – dose 0,30	-
	dose 10,00 – dose 0,30	-
	dose 20,00 – dose 0,30	-
	dose 3,00 – dose 1,00	-
	dose 10,00 – dose 1,00	-
	dose 20,00 – dose 1,00	-
2	TNF – Ceramida	2º e 3º
	Veneno 0,30 – Ceramida	2º e 3º
	Veneno 1,00 – Ceramida	2º e 3º
	Veneno 3,00 - Ceramida	2º e 3º
	Veneno 0,30 – TNF	2º
3	P2 – Esfingomielinase	1º
	Veneno – P3	3º
4	Veneno 0,30 – TNF	2º e 3º
	Veneno 1,00 – TNF	2º e 3º
	Veneno 3,00 – TNF	2º e 3º
	Ceramida – TNF	2º e 3º
	Veneno 0,30 - Ceramida	3º
	Veneno 1,00 - Ceramida	3º
5	P2 - Ceramida	-
	Veneno – Ceramida	-
	Veneno – Esfingomielinase	-
6	dose 1,50 – dose 0,03	-
	dose 3,00 – dose 0,03	-
7*	PMA 1nM – Ceramida	-
	Veneno – Ceramida	-
	PMA 10 nM – PMA 1 nM	-
	TNF – PMA 1 nM	-
	Veneno – PMA 1 nM	-
	Veneno – PMA 10 nM	-

* Neste experimento não foi detectada diferença significativa entre os dias, logo as comparações foram feitas considerando os dados do 1º e 3º dia.

Tabela 5.1.3: Comparações entre as médias do índice de viabilidade observadas nos diferentes dias para cada reagente cujas diferenças são significantes (Experimentos 2,3 e 4).

Experimento	Comparação	Reagente
2	Dia 2 – Dia 1	Todos
	Dia 3 – Dia 1	Todos
3	Dia 3 – Dia 1	Veneno
	Dia 3 – Dia 2	Veneno
	Dia 2 – Dia 1	P2
	Dia 3 – Dia 1	P2
4	Dia 2 – Dia 1	TNF
	Dia 3 – Dia 1	Veneno 0,30

Para os Experimentos 5 e 6 foi utilizado o método de agrupamento de médias propostos por Bussab (1976). Este método têm como objetivo a formação de grupos homogêneos de médias. Os grupos são construídos de modo que as médias relativas aos tratamentos que foram alocados em grupos diferentes sejam significativamente diferentes e as de tratamentos alocados no mesmo grupo não sejam. Adotando o nível de significância de 5%, obteve-se para o Experimento 5 que as médias dos reagentes foram agrupados da seguinte forma (grupos entre colchetes): [Veneno]; [P2 e P3]; [Esfingomielinase e Ceramida]. No Experimento 6, os grupos formados foram: [dose 0,03]; [doses 0,10, 0,30 e 1,00]; [doses 1,50 e 3,00].

No Experimento 8, diferentemente dos demais, foram analisados os fatores Reagente e Tetraciclina. Na Tabela D.45 são apresentados os níveis descritivos da ANOVA, podendo-se verificar que há evidências de efeito de interação entre os fatores ($p=0,002$), ou seja, as diferenças entre as médias do índice de viabilidade das células do grupo Controle e Veneno não são as mesmas para as diferentes doses de tetraciclina.

Foram realizadas comparações múltiplas utilizando o método de Tukey (Neter et al., 1996) das médias dessa variável entre as doses de tetraciclina (Tabela D.46 a D.47). Para o grupo Controle foi detectada diferença significativa apenas entre as doses 0 e 500 ($p=0,028$), enquanto que para o Veneno foram encontradas as diferenças significantes entre as doses 0 e 150 ($p<0,001$), 0 e 500 ($p=0,005$) e entre 50 e 150 ($p=0,001$).

Na Tabela D.48 são apresentadas as comparações múltiplas entre as médias do índice de viabilidade do grupo Controle e Veneno, para as diferentes doses de tetraciclina. Pode-se detectar diferença significativa para as doses 0 ($p < 0,001$) e 50 ($p = 0,033$).

5.2 Expressão de Marcadores de Superfície

Para as variáveis $\beta 2M$, CD29, CD58 e CD59 do Experimento 1 e MHC I do Experimento 3, a técnica estatística utilizada foi o teste t de Student para duas amostras (Bussab e Morettin, 2002) para comparar as médias correspondentes aos grupos Controle e Veneno. Verifica-se que existem diferenças significantes apenas entre as médias da variável $\beta 2M$ do Experimento 1 para as doses 0,00 e 20,00 ($p < 0,001$), sendo que a estimativa dessa diferença é 29,60 com o intervalo com 95% de confiança dado por [26,98; 32,22]. Para as demais variáveis foram detectadas diferenças estatisticamente significantes, considerando um nível de significância igual a 5%.

Na análise das demais variáveis foi utilizada um modelo de análise de variância com um fator fixo, sendo controlada a dose de veneno. Não foi detectada diferença significativa entre as médias das variáveis DAF e CD29 (Experimento 2) para as diferentes doses de veneno, com $p = 0,199$ e $0,157$, respectivamente.

Para a variável DAF do Experimento 1 foi encontrado um nível descritivo (p-valor) igual a 0,013, evidenciando a diferença entre as médias das diferentes doses. Na Tabela E.1 são apresentadas as comparações entre as médias; observa-se que somente entre as doses 0,00 e 12,00 a diferença encontrada é significativa ($p = 0,012$).

Considerando as variáveis EGRF do Experimento 1 e $\beta 2M$ do Experimento 2 foram detectadas diferenças significantes entre as médias para as diferentes doses ($p = 0,007$ e $p < 0,001$, respectivamente). Não foram detectadas diferenças significantes entre as médias da variável EGRF entre as doses 0,00 e 12,00 e para a variável $\beta 2M$ entre as doses 0,00 e 20,00.

Na análise das variáveis MHC I dos Experimentos 1 e 2 e MCP do Experimento 1, foram detectadas diferenças significantes entre as suas médias para as diferentes

doses ($p=0,001$; $p<0,001$ e $p=0,002$, respectivamente). Pelas Tabelas E.3, E.6 e E.7 verifica-se que somente entre as doses 12,00 e 20,00 não foram detectadas diferenças significantes.

Para as variáveis MCP do Experimento 1, $\beta 2M$ e EGRF do Experimento 2, também foram detectadas diferenças significantes entre as suas médias para as diferentes doses ($p=0,001$; $p<0,001$ e $p<0,001$, respectivamente). Mas nesse caso foram detectadas diferenças significantes para todas as comparações (Tabelas E.2, E.8 e E.9).

Para a análise dos dados dos Experimentos 4 e 5 utilizou-se o modelo de regressão múltipla (Bussab e Morettin, 2002), com o intuito de verificar a influência do Reagente e do Tempo decorrido nas variáveis em questão.

No Experimento 4 foi considerada a variável anexina como resposta e como variáveis independentes o Reagente (Veneno ou Controle) e Tempo decorrido (variável contínua). Na Tabela E.10, são apresentados as estimativas dos coeficientes do modelo e seus respectivos p-valores referentes ao teste de significância. Adotando um nível de significância de 5%, verifica-se que o coeficiente Veneno é significativo e portanto existe diferença entre as médias de anexina dos grupos Veneno e Controle ($p=0,004$) e essa diferença é estimada em 3,11. Observa-se também que não há variação significativa da média da variável anexina com a passagem dos dias para o grupo Veneno ($p=0,084$).

Para o Experimento 5, a variável resposta é a presença de anexina. Pela Tabela E.11, pode-se verificar que existe uma variação de 10,59% na média da presença de anexina devido à aplicação do Veneno (para as duas doses controladas). Observa-se também que existe variação na média dessa variável com a passagem dos dias, para o grupo sob a aplicação do Veneno 1,00 a média da presença de anexina aumenta em 7,44% por dia decorrido e para o grupo Veneno 3,00 este aumento é de 15,20%.

6. Conclusão

No estudo de viabilidade celular, considerando a variável índice de viabilidade, foram encontradas diferenças significantes das médias entre o grupo Controle e os seguintes reagentes:

- No Experimento 1: doses 1,00, 3,00, 10,00 e 20,00 de P2;
- No Experimento 2: Ceramida no 1º dia, Ceramida, Veneno 0,03, Veneno 1,00, Veneno 3,00 no 2º dia e Ceramida, Veneno 0,03, Veneno 1,00, Veneno 3,00 e TNF no 3º dia ;
- No Experimento 3: Veneno, P2 , P3 e Esfingomielinase no 1º dia e Veneno, P2 e Esfingomielinase no 2º e 3º dias;
- No Experimento 4: TNF no 2º dia e Veneno 0,03, Veneno 1,00, Veneno 3,00 e TNF no 3º dia ;
- No Experimento 5: Esfingomielinase, P2, P3 e Veneno;
- No Experimento 6: doses 1,00, 1,50 e 3,00 de P2;
- No Experimento 7: PMA 10 nM, TNF e Veneno;
- No Experimento 8: Veneno, para as células sob a ação de 0 e 50 µM de tetraciclina.

Para o estudo de expressão de marcadores de superfície, de acordo com os experimentos considerados foram encontradas diferenças significantes entre o grupo Controle e as doses de veneno para as seguintes variáveis:

- Experimento 1: β 2M, DAF, MCP e MHC I;
- Experimento 2: CD59, MCP, MHC I, β 2M e EGRF;
- Experimento 4: anexina;
- Experimento 5: presença de anexina.

Apêndice A

Tabela A.1: Medidas-resumo do índice de viabilidade para o Experimento 1.

Dose de P2 (µg/mL)	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
0,00 (Controle)	100,00	14,53	84,86	113,84
0,01	106,01	18,22	89,56	125,59
0,30	116,45	13,44	102,09	128,72
1,00	77,02	10,36	69,19	88,77
3,00	40,99	4,36	36,29	44,91
10,00	47,26	2,07	45,69	49,61
20,00	39,69	1,20	38,64	40,99

n = 3

Tabela A.2: Medidas-resumo do índice de viabilidade para o Experimento 2.

Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Tempo decorrido (dias)											
		1				2				3			
		Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Controle	-	100,00	6,44	95,42	109,50	100,00	11,73	86,56	114,21	100,00	5,53	95,09	107,59
Veneno	0,30	90,85	4,06	86,98	95,42	66,01	14,73	51,98	83,48	63,82	4,14	59,95	69,48
Veneno	1,00	97,42	3,76	92,61	101,06	72,54	8,99	66,58	85,79	67,54	5,78	62,93	75,43
Veneno	3,00	100,12	1,48	98,71	101,99	66,77	3,16	62,74	70,42	63,67	4,62	58,16	69,48
Ceramida	-	84,87	2,25	82,75	87,45	27,78	8,66	18,95	39,69	19,90	4,19	15,29	25,41
TNF	-	99,65	8,78	87,92	109,03	93,47	24,16	70,42	127,27	79,60	8,79	69,48	90,32
n = 4													

Tabela A.3: Medidas-resumo do índice de viabilidade para o Experimento 3.

Reagente	Tempo decorrido (dias)											
	1				2				3			
	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Controle	100,00	4,02	95,08	104,92	100,00	9,15	87,77	109,43	100,00	6,24	91,85	104,89
Veneno	95,55	3,18	92,27	99,30	89,45	12,08	79,93	106,44	74,63	6,82	67,65	83,48
P2	105,74	3,51	101,17	109,13	89,26	2,74	87,77	93,37	86,97	4,71	81,61	90,92
P3	94,73	3,51	91,33	99,30	97,95	3,64	94,12	102,33	99,77	6,69	90,92	105,82
Esfingomielinase	90,98	4,32	86,65	96,96	96,55	5,73	91,13	102,71	89,06	7,13	79,75	94,65

n = 4

Tabela A.4: Medidas-resumo do índice de viabilidade para o Experimento 4.

		Tempo decorrido (dias)											
		1				2				3			
Reagente	Dose (µg/mL)	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Controle	-	100,00	5,48	94,23	107,35	100,00	3,21	96,03	103,65	100,00	5,26	92,81	104,61
Veneno	0,30	100,34	2,62	96,95	102,83	93,02	6,05	85,88	99,21	79,90	5,47	75,11	87,65
Veneno	1,00	93,22	6,72	83,38	98,30	91,59	6,66	83,34	97,30	80,55	12,39	64,04	90,96
Veneno	3,00	99,21	5,65	93,33	105,99	98,57	5,46	92,23	104,28	83,87	5,57	76,95	88,38
Ceramida	-	103,05	0,58	102,37	103,73	95,08	8,31	84,61	102,38	99,08	4,30	95,39	103,50
TNF	-	106,67	5,43	98,76	110,97	124,75	7,80	116,98	133,47	109,13	15,54	87,65	123,79
n = 4													

Tabela A.5: Medidas-resumo do índice de viabilidade para o Experimento 5.

Reagente	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Controle	100,00	3,80	96,41	103,28
Veneno	76,73	6,05	71,42	83,91
P2	82,82	5,29	78,29	89,54
P3	86,00	2,52	83,91	89,54
Esingomielinase	90,01	4,16	83,91	93,28
Ceramida	95,94	4,79	88,91	99,53

n = 4

Tabela A.6: Medidas-resumo do índice de viabilidade para o Experimento 6.

Dose de P2 (µg/mL)	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
0,00 (Controle)	100,00	4,58	96,41	105,16
0,03	105,16	9,49	96,41	115,25
0,10	83,86	10,94	74,22	95,74
0,30	83,41	12,50	74,89	97,76
1,00	79,37	8,57	69,51	84,98
1,50	65,70	7,26	57,40	70,85
3,00	63,23	7,85	54,71	70,18

n = 3

Tabela A.7: Medidas-resumo do índice de viabilidade para o Experimento 7.

Reagente	Dose (nM)	Tempo decorrido (dias)							
		1				3			
		Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Controle	-	100,00	7,88	91,06	105,96	100,00	2,28	98,68	102,64
Veneno	-	65,89	8,68	56,29	73,18	57,44	7,06	51,79	65,35
Ceramida	-	87,75	12,93	75,17	100,99	86,25	7,91	78,34	94,16
TNF	-	71,85	8,09	66,23	81,13	78,34	0,56	77,78	78,91
PMA	1	102,65	13,12	91,06	116,89	107,53	6,90	101,51	115,07
PMA	10	74,83	19,42	56,29	95,03	87,76	4,39	82,86	91,34

n = 3

Tabela A.8: Medidas-resumo do índice de viabilidade para o Experimento 8.

Reagente	Dose de Tetraciclina (μ M)	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Controle	-	100,00	5,97	93,33	104,84
Tetraciclina	50	91,16	5,76	85,57	97,08
Tetraciclina	150	82,32	4,03	78,07	86,07
Tetraciclina	500	63,97	2,65	61,55	66,81
Veneno	-	93,24	5,49	87,07	97,58
Veneno+Tetraciclina	50	75,98	6,61	68,81	81,82
Veneno+Tetraciclina	150	101,92	7,64	94,08	109,34
Veneno+Tetraciclina	500	85,82	6,23	79,07	91,33

n = 3

Apêndice B

Gráfico B.1. Perfis médios do índice de viabilidade (com os correspondentes erros padrão) para o Experimento 1.

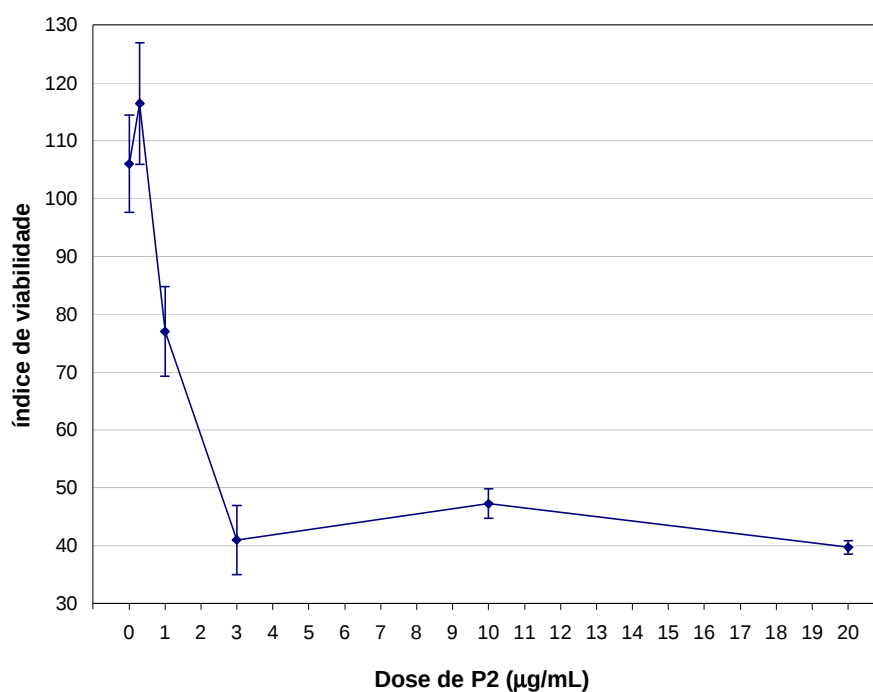


Gráfico B.2. Perfis médios do índice de viabilidade (com os correspondentes erros padrão) para o Experimento 2.

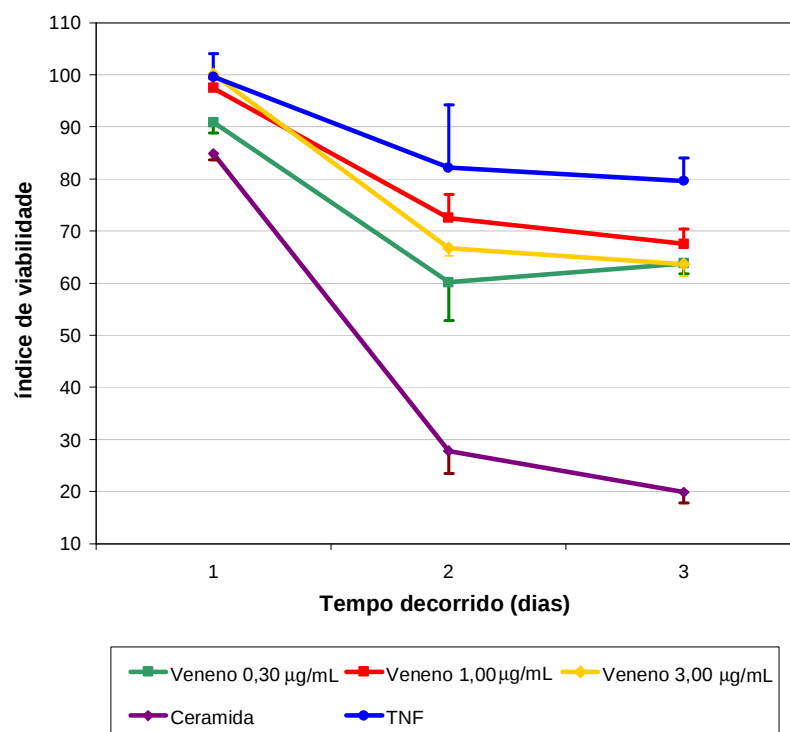


Gráfico B.3. Perfis médios do índice de viabilidade (com os correspondentes erros padrão) para o Experimento 3.

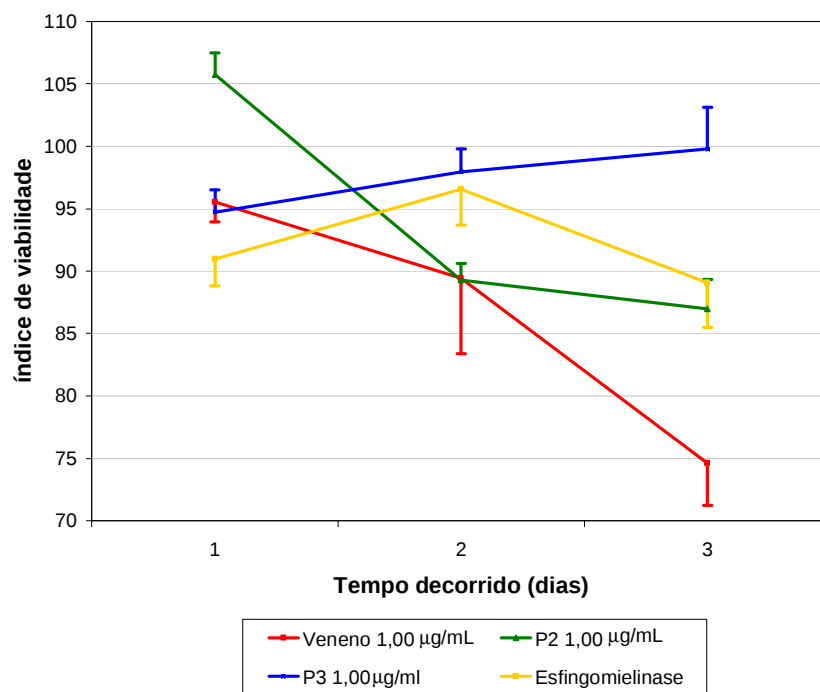


Gráfico B.4. Perfis médios do índice de viabilidade (com os correspondentes erros padrão) para o Experimento 4.

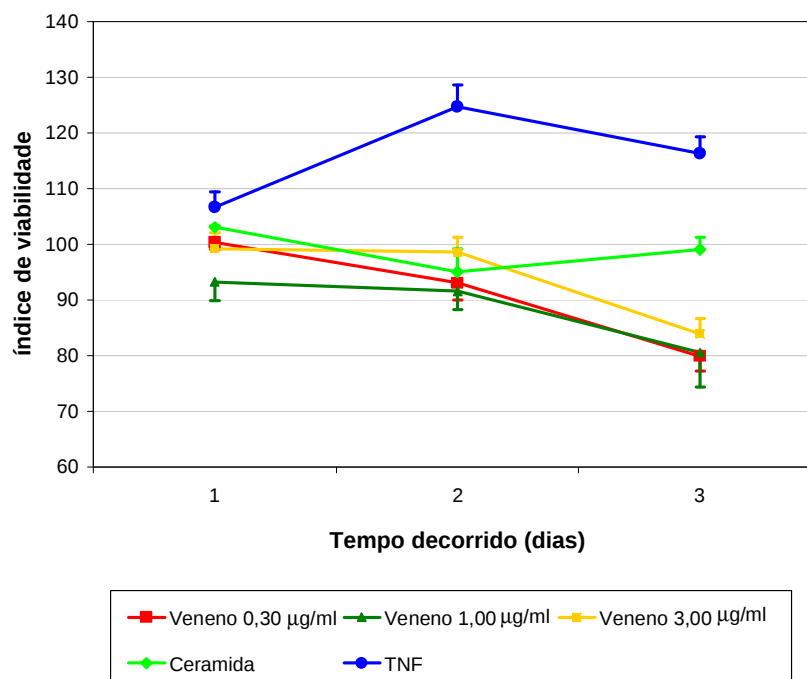


Gráfico B.5. Perfis médios do índice de viabilidade (com os correspondentes erros padrão) para o Experimento 5.

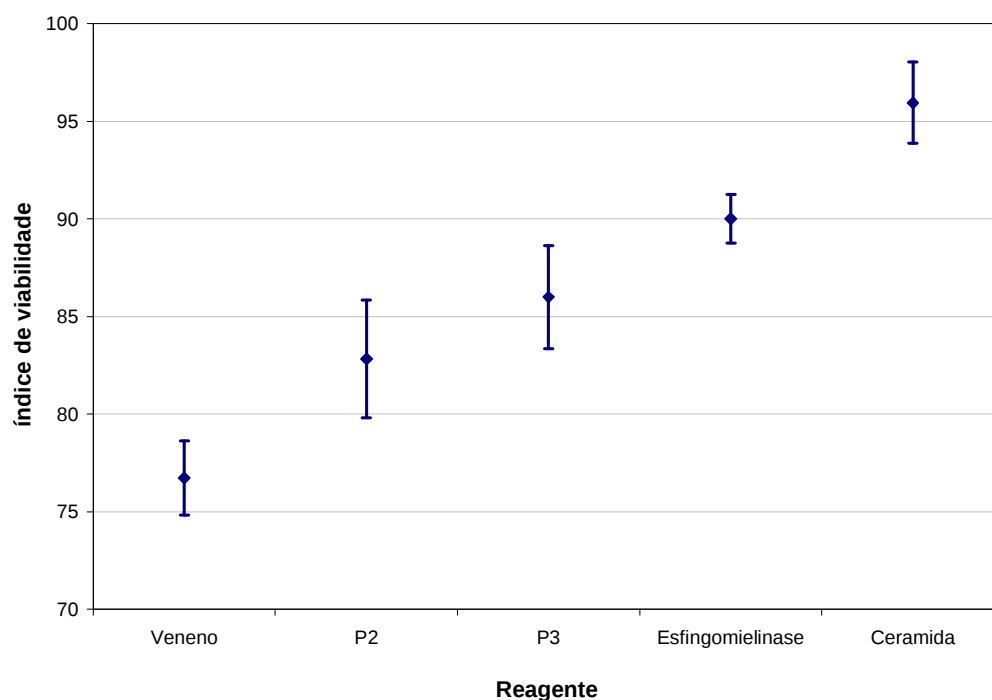


Gráfico B.6. Perfis médios do índice de viabilidade (com os correspondentes erros padrão) para o Experimento 6.

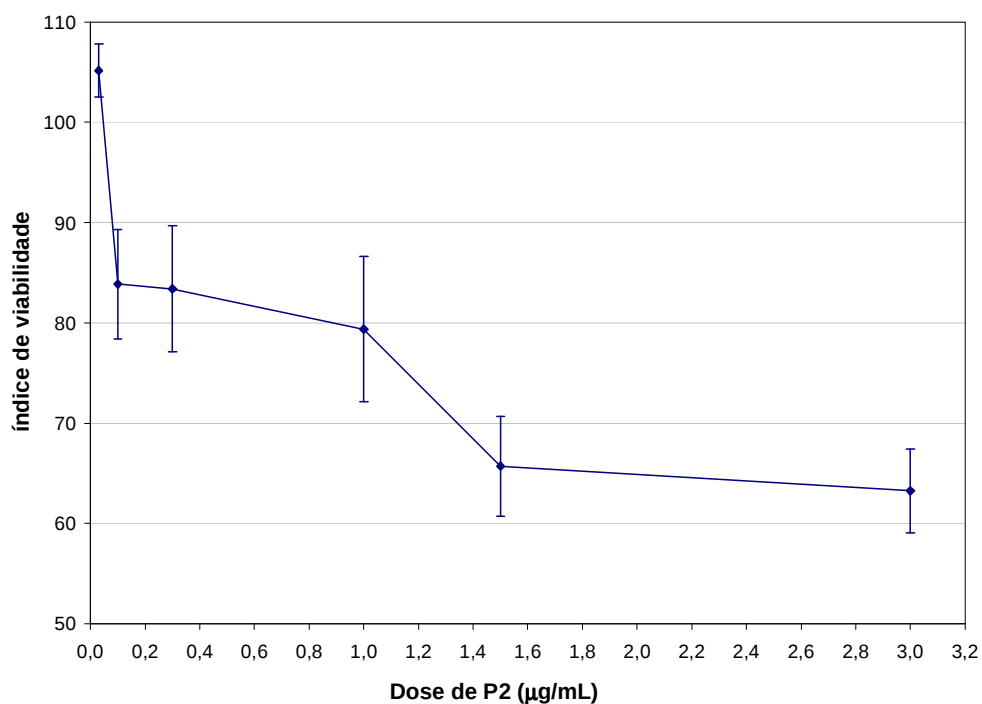


Gráfico B.7. Perfis médios do índice de viabilidade (com os correspondentes erros padrão) para o Experimento 7.

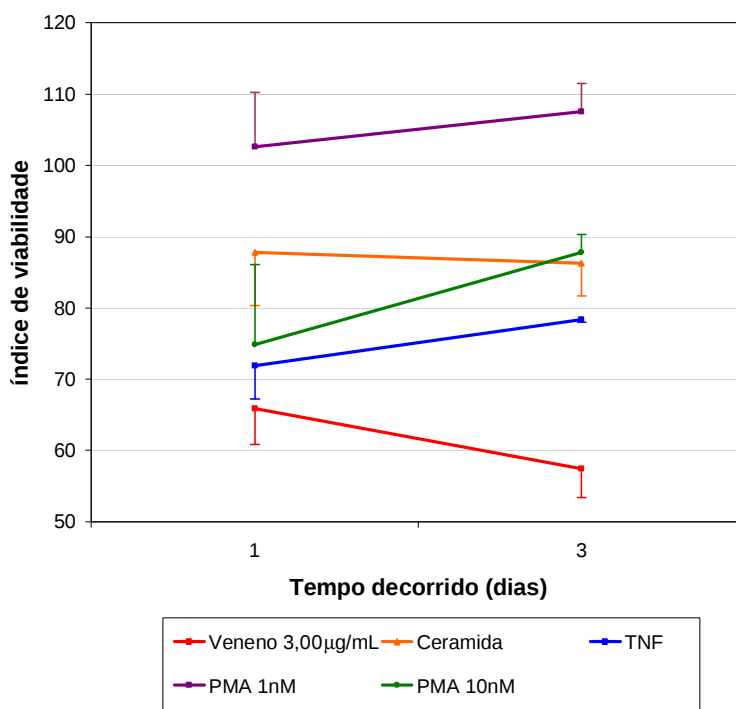
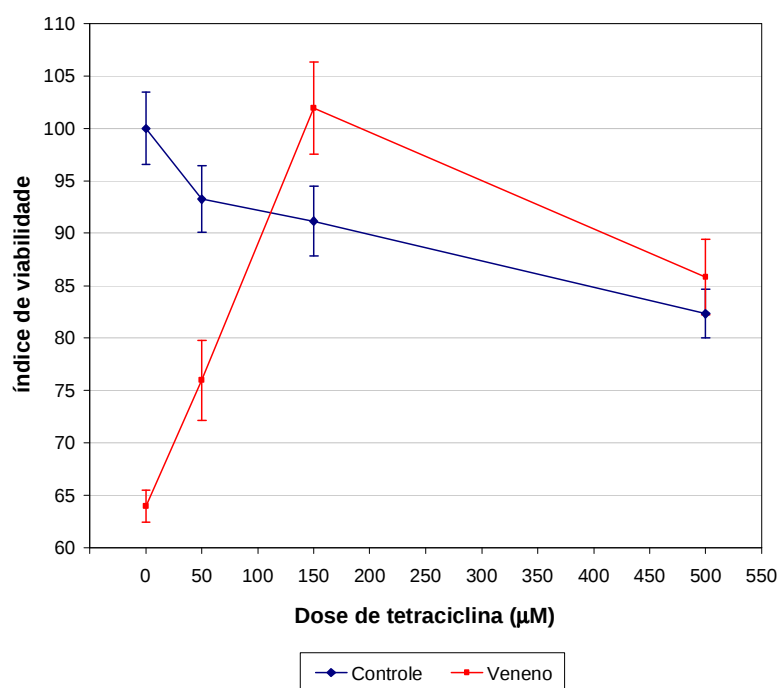


Gráfico B.8. Perfis médios do índice de viabilidade (com os correspondentes erros padrão) para o Experimento 8.



Apêndice C

Tabela C.1: Dados referentes ao marcador CD59 do Experimento 1.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	39,3	31,6	78,5	4498
1	Veneno	12,00	41,5	36,5	70,3	4582
2	Veneno	12,00	43,9	37,9	67,3	4604
1	Veneno	20,00	46,4	39,2	66,8	4580
2	Veneno	20,00	43,8	37,9	65,3	4553

Tabela C.2: Dados referentes ao marcador DAF do Experimento 1.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	13,9	11,1	205,4	4826
2	Controle	0,00	12,0	10,4	145,4	4835
1	Veneno	12,00	9,8	8,4	182,5	4832
2	Veneno	12,00	11,2	8,7	683,8	4858
1	Veneno	20,00	11,6	9,7	208,5	4872
2	Veneno	20,00	12,2	9,7	469,5	4818

Tabela C.3: Dados referentes ao marcador MCP do Experimento 1.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	50,9	11,1	398,3	4693
2	Controle	0,00	54,0	10,0	407,8	4720
1	Veneno	12,00	28,8	5,1	579,5	4797
2	Veneno	12,00	27,1	5,2	616,7	4808
1	Veneno	20,00	15,7	2,5	1249,6	4815
2	Veneno	20,00	43,9	2,9	766,6	4869

Tabela C.4: Dados referentes ao marcador MHC I do Experimento 1.

Tubo	Reagente	Dose (mg/mL)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	13,3	8,7	257,6	4775
2	Controle	0,00	15,0	9,7	425,4	4765
1	Veneno	12,00	3,8	2,1	706,0	4871
2	Veneno	12,00	3,7	1,9	768,1	4865
1	Veneno	20,00	6,2	2,8	1294,2	4867
2	Veneno	20,00	5,0	3,4	143,8	4876

Tabela C.5: Dados referentes ao marcador $\beta 2M$ do Experimento 1.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	43,8	34,0	85,4	4597
2	Controle	0,00	45,3	35,2	85,4	4615
1	Veneno	12,00	11,0	5,8	1033,1	4862
1	Veneno	20,00	6,1	4,9	369,4	4872
2	Veneno	20,00	5,6	5,1	119,6	4870

Tabela C.6: Dados referentes ao marcador EGRF do Experimento 1.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	11,0	6,5	964,3	4870
2	Controle	0,00	9,1	8,1	120,3	4848
1	Veneno	12,00	8,7	6,0	342,8	4840
2	Veneno	12,00	17,2	11,1	240,4	4720
1	Veneno	20,00	44,1	36,5	140,0	4753
2	Veneno	20,00	36,9	30,5	92,5	4697

Tabela C.7: Dados referentes ao marcador CD29 do Experimento 1.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	33,0	26,4	109,4	4523
2	Controle	0,00	32,8	24,6	181,9	4630
1	Veneno	12,00	25,3	18,4	88,2	4565
2	Veneno	12,00	27,5	21,3	91,0	4597

Tabela C.8: Dados referentes ao marcador CD58 do Experimento 1.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	19,7	6,5	781,1	4834
2	Controle	0,00	15,0	5,2	837,9	4846
1	Veneno	12,00	2,5	1,8	1528,9	4876
2	Veneno	12,00	8,1	4,4	954,1	4887

Tabela C.9: Dados referentes ao marcador CD59 do Experimento 2.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	255,9	198,1	147,1	4033
2	Controle	0,00	277,2	198,1	170,5	3917
1	Veneno	12,00	161,5	111,4	131,7	4040
2	Veneno	12,00	131,0	80,6	156,7	4109
1	Veneno	20,00	204,4	159,6	122,6	4223
2	Veneno	20,00	215,4	159,6	156,9	4112

Tabela C.10: Dados referentes ao marcador DAF do Experimento 2.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	16,5	7,8	1558,8	4342
2	Controle	0,00	21,2	8,1	1484,1	4269
1	Veneno	12,00	20,5	7,5	1567,6	4036
2	Veneno	12,00	19,6	7,2	1651,0	4069
1	Veneno	20,00	22,6	7,0	1483,2	4115
2	Veneno	20,00	15,3	7,6	1430,4	4248

Tabela C.11: Dados referentes ao marcador MCP do Experimento 2.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	64,8	27,4	672,5	4166
2	Controle	0,00	77,0	29,4	566,1	4299
1	Veneno	12,00	48,0	14,9	878,7	4344
2	Veneno	12,00	47,6	12,0	932,2	4313
1	Veneno	20,00	41,7	8,7	1173,1	4099
2	Veneno	20,00	43,7	8,5	1082,5	4014

Tabela C.12: Dados referentes ao marcador MHC I do Experimento 2.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	51,8	21,3	701,7	4438
2	Controle	0,00	50,6	22,9	551,9	4341
1	Veneno	12,00	28,1	6,3	1090,2	4364
2	Veneno	12,00	26,6	5,1	1386,3	4395
1	Veneno	20,00	10,9	3,3	1953,3	4319
2	Veneno	20,00	13,3	3,2	1913,0	4540

Tabela C.13: Dados referentes ao marcador $\beta 2\text{M}$ do Experimento 2.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	168,6	115,5	239,9	4316
2	Controle	0,00	186,3	119,7	286,9	4019
1	Veneno	12,00	89,0	40,7	582,1	4283
2	Veneno	12,00	62,9	40,7	426,6	4052
1	Veneno	20,00	93,7	11,6	794,0	4019
2	Veneno	20,00	65,2	16,0	746,1	3945

Tabela C.14: Dados referentes ao marcador EGRF do Experimento 2.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	68,9	23,7	693,6	4284
2	Controle	0,00	46,3	23,7	632,9	4185
1	Veneno	12,00	39,4	16,6	769,0	4223
2	Veneno	12,00	31,0	16,0	902,4	4469
1	Veneno	20,00	25,0	11,1	1087,4	4335
2	Veneno	20,00	33,0	11,6	1028,2	4147

Tabela C.15: Dados referentes ao marcador CD29 do Experimento 2.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	201,3	148,6	206,2	4324
2	Controle	0,00	217,2	165,5	195,1	4162
1	Veneno	12,00	205,0	148,6	234,4	3908
2	Veneno	12,00	194,4	143,3	238,2	3858
1	Veneno	20,00	163,8	119,7	252,0	3941
2	Veneno	20,00	203,4	138,2	194,9	3839

Tabela C.16: Dados referentes ao marcador CD59 do Experimento 3.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	117,3	111,4	49,7	4255
2	Controle	0,00	123,1	111,4	77,0	4269
1	Veneno	20,00	114,1	107,5	50,4	4377
2	Veneno	20,00	116,3	107,5	50,1	4145

Tabela C.17: Dados referentes ao marcador DAF do Experimento 3.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	20,1	15,4	216,7	4244
2	Controle	0,00	17,1	15,4	83,6	4225
1	Veneno	20,00	17,8	13,8	151,6	4164
2	Veneno	20,00	16,2	14,3	83,2	4283

Tabela C.18: Dados referentes ao marcador MCP do Experimento 3.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	62,7	10,0	499,9	4205
2	Controle	0,00	61,2	10,0	581,5	4137
1	Veneno	20,00	40,0	5,8	1017,1	4241
2	Veneno	20,00	45,7	5,8	1074,4	4168

Tabela C.19: Dados referentes ao marcador MHC I do Experimento 3.

Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	CV	Número de células
1	Controle	0,00	22,3	18,4	114,4	4173
2	Controle	0,00	11,7	9,3	173,7	3972
1	Veneno	20,00	15,3	10,8	312,0	4268
2	Veneno	20,00	11,7	9,1	173,7	3972

Tabela C.20: Dados referentes ao marcador anexina do Experimento 4.

Dia	Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mediana	Número de Células
1	1	Controle	0,00	4,2	3,1	3755
1	2	Controle	0,00	4,4	3,2	3949
1	1	Veneno	3,00	7,6	7,0	1794
1	2	Veneno	3,00	9,7	8,9	3580
2	1	Veneno	3,00	9,2	8,7	3365
2	2	Veneno	3,00	10,8	10,6	1532
3	1	Veneno	3,00	9,8	9,3	2654
3	2	Veneno	3,00	11,1	11,1	1931

Tabela C.21: Dados referentes ao marcador anexina do Experimento 5.

Dia	Tubo	Reagente	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Presença de anexina (%)	Número de Células
1	1	Controle	0,00	12,4	5220
1	2	Controle	0,00	12,0	5000
1	1	Veneno	1,00	21,8	5000
1	2	Veneno	1,00	25,3	5000
1	1	Veneno	3,00	26,3	5000
1	2	Veneno	3,00	23,9	5000
2	1	Veneno	1,00	25,0	5000
2	2	Veneno	1,00	29,0	5000
2	1	Veneno	3,00	26,8	5000
2	2	Veneno	3,00	43,2	5000
3	1	Veneno	1,00	39,7	5000
3	2	Veneno	1,00	38,8	5000
3	1	Veneno	3,00	53,5	5000
3	2	Veneno	3,00	55,8	5000

Tabela C.22: Dados referentes ao marcador anexina do Experimento 6.

Reagente	Presença de anexina (%)	Número de Células
Controle	27,3	2100
Veneno 3,00 $\mu\text{g/mL}$	45,1	3660
P2 20,00 $\mu\text{g/mL}$	48,1	5000

Apêndice D

Tabela D.1: Intervalos de Confiança das médias do índice de viabilidade para o Experimento 1.

Dose de P2 (µg/mL)	Intervalo de Confiança
0,01	[85,73; 128,56]
0,30	[94,66; 141,96]
1,00	[62,53; 93,78]
3,00	[33,35; 50,01]
10,00	[38,57; 57,84]
20,00	[32,40; 48,59]

Tabela D.2: Comparações entre as médias do índice de viabilidade para o Experimento 1.

Comparação entre as doses (µg/mL)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
0,30 – 0,01	11,04	[-19,73; 52,83]	0,876
1,00 – 0,01	-28,68	[-49,04; -1,08]	0,041
3,00 – 0,01	-64,77	[-75,63; -50,05]	< 0,001
10,00 – 0,01	-58,32	[-70,86; -41,29]	< 0,001
20,00 – 0,01	-65,94	[-76,47; -51,64]	< 0,001
1,00 – 0,30	-39,55	[-59,77; -12,06]	0,007
3,00 – 0,30	-75,41	[-86,23; -60,78]	< 0,001
10,00 – 0,30	-69,01	[-81,48; -52,07]	< 0,001
20,00 – 0,30	-76,59	[-87,09; -62,36]	< 0,001
3,00 – 1,00	-35,95	[-46,76; -21,28]	< 0,001
10,00 – 1,00	-29,52	[-42,02; -12,56]	0,002
20,00 – 1,00	-37,12	[-47,62; -22,87]	< 0,001
10,00 – 3,00	6,42	[-6,05; 23,35]	0,613
20,00 – 3,00	-1,16	[-11,64; 13,06]	0,999
20,00 – 10,00	-7,56	[-18,00; 6,61]	0,437

Tabela D.3: Quadro da ANOVA para o Experimento 2.

Fator	p-valor
Reagente	< 0,001
Dia	< 0,001
Reagente * Dia	< 0,001

Tabela D.4: Intervalos de Confiança das médias do índice de viabilidade no 1º dia – Experimento 2.

Reagente	Intervalo de Confiança
Ceramida	[75,43; 94,30]
Veneno 0,30 µg/mL	[81,42; 100,28]
Veneno 1,00 µg/mL	[87,99; 106,85]
Veneno 3,00 µg/mL	[90,69; 109,55]
TNF	[90,22; 109,08]

Tabela D.5: Intervalos de Confiança das médias do índice de viabilidade no 2º dia – Experimento 2.

Reagente	Intervalo de Confiança
Ceramida	[18,35; 37,22]
Veneno 0,30 µg/mL	[50,75; 69,61]
Veneno 1,00 µg/mL	[63,10; 81,97]
Veneno 3,00 µg/mL	[57,34; 76,20]
TNF	[90,22; 109,08]

Tabela D.6: Intervalos de Confiança das médias do índice de viabilidade no 3º dia – Experimento 2.

Reagente	Intervalo de Confiança
Ceramida	[10,47; 29,33]
Veneno 0,30 µg/mL	[54,39; 73,25]
Veneno 1,00 µg/mL	[58,11; 76,97]
Veneno 3,00 µg/mL	[54,24; 73,10]
TNF	[70,17; 89,03]

Tabela D.7: Comparações entre as médias do índice de viabilidade dos reagentes no 1º dia – Experimento 2.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
TNF – Ceramida	14,78	[-1,31; 30,87]	0,102
Veneno 0,30 µg/mL - Ceramida	5,98	[-10,11; 22,08]	0,989
Veneno 1,00 µg/mL - Ceramida	12,56	[-3,54; 28,65]	0,285
Veneno 3,00 µg/mL - Ceramida	15,25	[-0,84; 31,34]	0,080
Veneno 0,30 µg/mL - TNF	-8,80	[-24,89; 7,29]	0,810
Veneno 1,00 µg/mL - TNF	-2,23	[-18,32; 13,86]	1,000
Veneno 3,00 µg/mL - TNF	0,47	[-15,62; 16,56]	1,000
Veneno 1,00 µg/mL - Veneno 0,30 µg/mL	6,57	[-9,52; 22,66]	0,975
Veneno 3,00 µg/mL - Veneno 0,30 µg/mL	9,27	[-6,82; 25,36]	0,750
Veneno 3,00 µg/mL - Veneno 1,00 µg/mL	2,70	[-13,39; 18,79]	1,000

Tabela D.8: Comparações entre as médias do índice de viabilidade dos reagentes no 2º dia – Experimento 2.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
TNF – Ceramida	54,42	[38,33; 70,51]	< 0,001
Veneno 0,30 µg/mL - Ceramida	32,40	[16,31; 48,49]	< 0,001
Veneno 1,00 µg/mL - Ceramida	44,75	[28,66; 60,84]	< 0,001
Veneno 3,00 µg/mL - Ceramida	38,99	[22,90; 55,08]	< 0,001
Veneno 0,30 µg/mL - TNF	-22,02	[-38,11; -5,93]	0,001
Veneno 1,00 µg/mL - TNF	-9,67	[-25,76; 6,42]	0,694
Veneno 3,00 µg/mL - TNF	-15,43	[-31,52; 0,66]	0,072
Veneno 1,00 µg/mL - Veneno 0,30 µg/mL	12,36	[-3,74; 28,45]	0,308
Veneno 3,00 µg/mL - Veneno 0,30 µg/mL	6,59	[-9,50; 22,68]	0,975
Veneno 3,00 µg/mL - Veneno 1,00 µg/mL	-5,76	[-21,85; 10,33]	0,992

Tabela D.9: Comparações entre as médias do índice de viabilidade dos reagentes no 3º dia – Experimento 2.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
TNF – Ceramida	59,70	[43,61; 75,79]	< 0,001
Veneno 0,30 µg/mL – Ceramida	43,92	[27,83; 60,01]	< 0,001
Veneno 1,00 µg/mL – Ceramida	47,64	[31,55; 63,73]	< 0,001
Veneno 3,00 µg/mL – Ceramida	43,77	[27,68; 59,86]	< 0,001
Veneno 0,30 µg/mL - TNF	-15,78	[-31,87; 0,31]	0,060
Veneno 1,00 µg/mL – TNF	-12,06	[-28,15; 4,03]	0,345
Veneno 3,00 µg/mL – TNF	-15,94	[-32,03; 0,16]	0,055
Veneno 1,00 µg/mL – Veneno 0,30 µg/mL	3,72	[-12,37; 19,81]	1,000
Veneno 3,00 µg/mL – Veneno 0,30 µg/mL	-0,15	[-16,24; 15,94]	1,000
Veneno 3,00 µg/mL – Veneno 1,00 µg/mL	-3,87	[-19,96; 12,22]	1,000

Tabela D.10: Comparações entre as médias do índice de viabilidade para o reagente Ceramida nos diferentes dias – Experimento 2.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
Dia 2 – Dia 1	-57,08	[-73,17; -40,99]	< 0,001
Dia 3 – Dia 1	-64,96	[-81,05; -48,87]	< 0,001
Dia 3 – Dia 2	-7,88	[-23,97; 8,21]	0,903

Tabela D.11: Comparações entre as médias do índice de viabilidade para o reagente TNF nos diferentes dias – Experimento 2.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
Dia 2 – Dia 1	-17,44	[-33,54; -1,35]	0,023
Dia 3 – Dia 1	-20,04	[-36,13; -3,95]	< 0,001
Dia 3 – Dia 2	-2,60	[-18,69; 13,49]	1,000

Tabela D.12: Comparações entre as médias do índice de viabilidade para o reagente Veneno 0,30 µg/mL nos diferentes dias – Experimento 2.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
Dia 2 – Dia 1	-30,67	[-46,76; -14,58]	< 0,001
Dia 3 – Dia 1	-27,03	[-43,12; -10,94]	< 0,001
Dia 3 – Dia 2	3,64	[-12,45; 19,73]	1,000

Tabela D.13: Comparações entre as médias do índice de viabilidade para o reagente Veneno 1,00 µg/mL nos diferentes dias – Experimento 2.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
Dia 2 – Dia 1	-24,88	[-40,98; -8,79]	< 0,001
Dia 3 – Dia 1	-29,88	[-45,97; -13,79]	< 0,001
Dia 3 – Dia 2	-4,99	[-21,08; 11,10]	0,998

Tabela D.14: Comparações entre as médias do índice de viabilidade para o reagente Veneno 3,00 µg/mL nos diferentes dias – Experimento 2.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
Dia 2 – Dia 1	-33,34	[-49,44; -17,25]	< 0,001
Dia 3 – Dia 1	-36,45	[-52,44; -20,36]	< 0,001
Dia 3 – Dia 2	-3,10	[-19,19; 12,99]	1,000

Tabela D.15: Quadro da ANOVA para o Experimento 3.

Efeito	p-valor
Reagente	0,001
Dia	< 0,001
Reagente * Dia	< 0,001

Tabela D.16: Intervalos de Confiança das médias do índice de viabilidade no 1º dia – Experimento 3.

Reagente	Intervalo de Confiança
Veneno	[92,56; 98,54]
P2	[102,75; 108,73]
P3	[91,74; 97,72]
Esfingomielinase	[87,99; 93,97]

Tabela D.17: Intervalos de Confiança das médias do índice de viabilidade no 2º dia – Experimento 3.

Reagente	Intervalo de Confiança
Veneno	[86,46; 92,44]
P2	[86,27; 92,25]
P3	[94,96; 100,94]
Esfingomielinase	[93,56; 99,54]

Tabela D.18: Intervalos de Confiança das médias do índice de viabilidade no 3º dia – Experimento 3.

Reagente	Intervalo de Confiança
Veneno	[71,64; 77,62]
P2	[83,98; 89,96]
P3	[96,78; 102,76]
Esfingomielinase	[86,07; 92,05]

Tabela D.19: Comparações entre as médias do índice de viabilidade dos reagentes no 1º dia – Experimento 3.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
P2 – Esfingomielinase	14,75	[0,19; 29,32]	0,045
P3 – Esfingomielinase	3,75	[-10,82; 18,31]	1,000
Veneno – Esfingomielinase	4,57	[-10,00; 19,13]	0,993
P3 – P2	-11,01	[-25,57; 3,56]	0,296
Veneno – P2	-10,19	[-24,75; 4,38]	0,405
Veneno – P3	0,82	[-13,75; 15,39]	1,000

Tabela D.20: Comparações entre as médias do índice de viabilidade dos reagentes no 2º dia – Experimento 3.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
P2 – Esfingomielinase	-7,28	[-21,85;7,28]	0,835
P3 – Esfingomielinase	1,40	[-13,17;15,97]	1,000
Veneno – Esfingomielinase	-7,10	[-21,66;7,47]	0,856
P3 – P2	8,68	[-5,88;23,25]	0,637
Veneno – P2	0,19	[-14,38;14,75]	1,000
Veneno – P3	-8,50	[-23,06; 6,07]	0,666

Tabela D.21: Comparações entre as médias do índice de viabilidade dos reagentes no 3º dia – Experimento 3.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
P2 – Esfingomielinase	-2,09	[-16,66; 12,47]	1,000
P3 – Esfingomielinase	10,71	[-3,86; 25,27]	0,334
Veneno – Esfingomielinase	-14,43	[-29,00; 0,14]	0,054
P3 – P2	12,80	[-1,77; 27,37]	0,130
Veneno – P2	-12,34	[-26,90; 2,23]	0,164
Veneno – P3	-25,14	[-39,70; -10,57]	< 0,001

Tabela D.22: Comparações entre as médias do índice de viabilidade para o reagente Veneno nos diferentes dias – Experimento 3.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
Dia 2 – Dia 1	-6,10	[-20,67; 8,47]	0,941
Dia 3 – Dia 1	-20,92	[-35,48; -6,35]	< 0,001
Dia 3 – Dia 2	-14,82	[-29,38; -0,25]	0,043

Tabela D.23: Comparações entre as médias do índice de viabilidade para o reagente P2 nos diferentes dias – Experimento 3.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
Dia 2 – Dia 1	-16,48	[-31,04; -1,91]	0,016
Dia 3 – Dia 1	-18,77	[-33,34; -4,21]	0,003
Dia 3 – Dia 2	-2,30	[-16,86; 12,27]	1,000

Tabela D.24: Comparações entre as médias do índice de viabilidade para o reagente P3 nos diferentes dias – Experimento 3.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
Dia 2 – Dia 1	3,22	[-11,35; 17,78]	1,000
Dia 3 – Dia 1	5,04	[-9,53; 19,60]	0,985
Dia 3 – Dia 2	1,82	[-12,74; 16,39]	1,000

Tabela D.25: Comparações entre as médias do índice de viabilidade para o reagente Esfingomielinase nos diferentes dias – Experimento 3.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
Dia 2 – Dia 1	5,56	[-9,00; 20,18]	0,969
Dia 3 – Dia 1	-1,92	[-16,49; 12,64]	1,000
Dia 3 – Dia 2	-7,48	[-22,05; 7,08]	0,810

Tabela D.26: Quadro da ANOVA para o Experimento 4.

Efeito	p-valor
Reagente	< 0,001
Dia	< 0,001
Reagente * Dia	< 0,001

Tabela D.27: Intervalos de Confiança das médias do índice de viabilidade no 1º dia – Experimento 4.

Reagente	Intervalo de Confiança
Ceramida	[92,67; 113,44]
Veneno 0,30 µg/mL	[89,95; 110,72]
Veneno 1,00 µg/mL	[82,83; 103,60]
Veneno 3,00 µg/mL	[88,82; 109,59]
TNF	[96,29; 117,06]

Tabela D.28: Intervalos de Confiança das médias do índice de viabilidade no 2º dia – Experimento 4.

Reagente	Intervalo de Confiança
Ceramida	[84,70; 105,47]
Veneno 0,30 µg/mL	[82,63; 103,41]
Veneno 1,00 µg/mL	[81,21; 101,98]
Veneno 3,00 µg/mL	[88,19; 108,96]
TNF	[114,36; 135,13]

Tabela D.29: Intervalos de Confiança das médias do índice de viabilidade no 3º dia – Experimento 4.

Reagente	Intervalo de Confiança
Ceramida	[88,69; 109,46]
Veneno 0,30 µg/mL	[69,52; 90,29]
Veneno 1,00 µg/mL	[70,16; 90,93]
Veneno 3,00 µg/mL	[73,48; 94,25]
TNF	[105,90; 126,67]

Tabela D.30: Comparações entre as médias do índice de viabilidade dos reagentes no 1º dia – Experimento 4.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
TNF – Ceramida	3,62	[-12,73; 19,67]	1,000
Veneno 0,30 µg/mL - Ceramida	-2,71	[-19,06; 13,63]	1,000
Veneno 1,00 µg/mL - Ceramida	-9,84	[-26,18; 6,51]	0,691
Veneno 3,00 µg/mL - Ceramida	-3,85	[-20,19; 12,50]	1,000
Veneno 0,30 µg/mL - TNF	-6,33	[-22,68; 10,01]	0,195
Veneno 1,00 µg/mL - TNF	-13,46	[-29,80; 2,89]	0,213
Veneno 3,00 µg/mL - TNF	-7,47	[-23,81; 8,88]	0,941
Veneno 1,00 µg/mL - Veneno 0,30 µg/mL	-7,13	[-23,47; 9,22]	0,958
Veneno 3,00 µg/mL - Veneno 0,30 µg/mL	-1,13	[-17,48; 15,21]	1,000
Veneno 3,00 µg/mL - Veneno 1,00 µg/mL	5,99	[-10,35; 22,34]	0,990

Tabela D.31: Comparações entre as médias do índice de viabilidade dos reagentes no 2º dia – Experimento 4.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
TNF - Ceramida	29,67	[13,32; 46,01]	< 0,001
Veneno 0,30 µg/mL - Ceramida	-2,06	[-18,41; 14,28]	1,000
Veneno 1,00 µg/mL - Ceramida	-3,49	[-19,84; 12,85]	1,000
Veneno 3,00 µg/mL - Ceramida	3,49	[-12,86; 19,84]	1,000
Veneno 0,30 µg/mL - TNF	-31,73	[-48,07; -15,38]	< 0,001
Veneno 1,00 µg/mL - TNF	-33,16	[-49,50; -16,81]	< 0,001
Veneno 3,00 µg/mL - TNF	-26,18	[-42,52; -9,83]	< 0,001
Veneno 1,00 µg/mL - Veneno 0,30 µg/mL	-1,43	[-17,78; 14,92]	1,000
Veneno 3,00 µg/mL - Veneno 0,30 µg/mL	5,55	[-10,79; 21,90]	0,995
Veneno 3,00 µg/mL - Veneno 1,00 µg/mL	6,98	[-9,36; 23,33]	0,964

Tabela D.32: Comparações entre as médias do índice de viabilidade dos reagentes no 3º dia – Experimento 4.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
TNF - Ceramida	17,21	[0,87; 33,56]	0,031
Veneno 0,30 µg/mL - Ceramida	-19,18	[-35,52; -2,83]	0,009
Veneno 1,00 µg/mL - Ceramida	-18,53	[-34,88; -2,19]	0,014
Veneno 3,00 µg/mL - Ceramida	-15,21	[-31,56; 1,13]	0,092
Veneno 0,30 µg/mL - TNF	-36,39	[-52,73; -20,04]	< 0,001
Veneno 1,00 µg/mL - TNF	-35,74	[-52,09; -19,40]	< 0,001
Veneno 3,00 µg/mL – TNF	-32,42	[-48,77; -16,08]	< 0,001
Veneno 1,00 µg/mL – Veneno 0,30 µg/mL	0,64	[-15,70; 16,99]	1,000
Veneno 3,00 µg/mL – Veneno 0,30 µg/mL	3,96	[-12,38; 20,31]	1,000
Veneno 3,00 µg/mL – Veneno 1,00 µg/mL	3,32	[-13,03; 19,67]	1,000

Tabela D.33: Comparações entre as médias do índice de viabilidade para o reagente Ceramida nos diferentes dias – Experimento 4.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
Dia 2 – Dia 1	-7,97	[-24,32; 8,38]	0,906
Dia 3 – Dia 1	-3,97	[-20,32; 12,37]	1,000
Dia 3 – Dia 2	4,00	[-12,35; 20,34]	1,000

Tabela D.34: Comparações entre as médias do índice de viabilidade para o reagente TNF nos diferentes dias – Experimento 4.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
Dia 2 – Dia 1	18,07	[1,73; 34,42]	0,018
Dia 3 – Dia 1	9,62	[-6,73; 25,96]	0,722
Dia 3 – Dia 2	-8,46	[-24,80; 7,89]	0,862

Tabela D.35: Comparações entre as médias do índice de viabilidade para o reagente Veneno 0,30 µg/mL nos diferentes dias – Experimento 4.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
Dia 2 – Dia 1	-7,32	[-23,67; 9,03]	0,949
Dia 3 – Dia 1	-20,44	[-36,78; 4,09]	0,004
Dia 3 – Dia 2	-13,12	[-29,46; 3,23]	0,246

Tabela D.36: Comparações entre as médias do índice de viabilidade para o reagente Veneno 1,00 µg/mL nos diferentes dias – Experimento 4.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
Dia 2 – Dia 1	-1,62	[-17,97; 17,72]	1,000
Dia 3 – Dia 1	-12,67	[-10,35; 22,34]	0,294
Dia 3 – Dia 2	-11,04	[-27,39; 5,30]	0,512

Tabela D.37: Comparações entre as médias do índice de viabilidade para o reagente Veneno 3,00 µg/mL nos diferentes dias – Experimento 4.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
Dia 2 – Dia 1	-0,64	[-16,98; 15,71]	1,000
Dia 3 – Dia 1	-15,34	[-31,69; 1,00]	0,086
Dia 3 – Dia 2	-14,71	[-31,05; 1,64]	0,119

Tabela D.38: Intervalos de Confiança para as médias do índice de viabilidade – Experimento 5.

Reagente	Intervalo de Confiança
Esfingomielinase	[83,87; 96,14]
Ceramida	[89,81; 102,07]
P2	[76,69; 88,95]
P3	[79,87; 92,13]
Veneno	[70,60; 82,86]

Tabela D.39: Comparações entre as médias do índice de viabilidade dos reagentes – Experimento 5.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
Esfingomielinase – Ceramida	5,93	[-4,36; 16,23]	0,419
P2 – Ceramida	13,12	[2,82; 23,42]	0,010
P3 – Ceramida	9,94	[-0,36; 20,24]	0,061
Veneno – Ceramida	19,21	[8,91; 29,51]	<0,001
P2 – Esfingomielinase	7,19	[-3,12; 17,48]	0,248
P3 – Esfingomielinase	4,01	[-6,29; 14,31]	0,750
Veneno – Esfingomielinase	13,28	[2,98; 23,57]	0,009
P3 – P2	-3,18	[-13,47; 7,12]	0,872
Veneno – P2	6,09	[-4,21; 16,39]	0,395
Veneno – P3	9,27	[-1,03; 19,56]	0,088

Tabela D.40: Intervalos de Confiança para a média do índice de viabilidade para o – Experimento 6.

Dose de P2 ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo de Confiança
0,03	[87,67; 122,64]
0,10	[66,37; 101,34]
0,30	[65,92; 100,89]
1,00	[61,89; 96,86]
1,50	[48,21; 83,18]
3,00	[45,74; 80,71]

Tabela D.41: Comparações entre as médias do índice de viabilidade – Experimento 6.

Comparação entre doses ($\mu\text{g/mL}$)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
0,10 – 0,03	-21,30	[-47,64; 5,04]	0,143
0,30 – 0,03	-21,75	[-48,09; 4,60]	0,130
1,00 – 0,03	-25,78	[-52,13; 0,56]	0,056
1,50 – 0,03	-39,46	[-65,81; -13,12]	0,003
3,00 – 0,03	-41,93	[-68,27; -15,58]	0,002
0,30 – 0,10	-0,45	[-26,79; 25,90]	1,000
1,00 – 0,10	-4,48	[-30,83; 21,86]	0,991
1,50 – 0,10	-18,16	[-44,51; 8,18]	0,259
3,00 – 0,10	-20,63	[-46,97; 5,72]	0,163
1,00 – 0,30	-4,04	[-30,38; 22,31]	0,995
1,50 – 0,30	-17,72	[-44,06; 8,63]	0,281
3,00 – 0,30	-20,18	[-46,52; 6,16]	0,178
1,50 – 1,00	-13,68	[-40,02; 12,66]	0,531
3,00 – 1,00	-16,14	[-42,49; 10,20]	0,368
3,00 – 1,50	-2,46	[-28,81; 23,88]	0,999

Tabela D.42: Quadro da ANOVA para o Experimento 7.

Efeito	p-valor
Reagente	< 0,001
Dia	0,449
Reagente * Dia	0,450

Tabela D.43: Intervalos de Confiança para as médias do índice de viabilidade – Experimento 7.

Reagente	Intervalo de Confiança
Ceramida	[73,89; 100,11]
PMA 1 nM	[91,98; 118,20]
PMA 10 nM	[68,19; 94,40]
TNF	[61,99; 88,21]
Veneno	[48,56; 74,77]

Tabela D.44: Comparações entre as médias do índice de viabilidade dos reagentes – Experimento 7.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
PMA 1 nM – Ceramida	18,09	[0,51; 35,68]	0,042
PMA 10 nM – Ceramida	-5,70	[-23,29; 11,88]	0,865
TNF – Ceramida	-11,90	[-29,48; 5,68]	0,291
Veneno – Ceramida	-25,33	[-42,92; -7,75]	0,003
PMA 10 nM – PMA 1 nM	-23,80	[-41,38; -6,21]	0,005
TNF – PMA 1 nM	-29,99	[-47,58; -12,41]	<0,001
Veneno – PMA 1 nM	-43,43	[-61,01; -25,84]	<0,001
TNF – PMA 10 nM	-6,20	[-23,78; 11,39]	0,827
Veneno – PMA 10 nM	-19,63	[-37,21; -2,05]	0,024
Veneno – TNF	-13,43	[-31,02; 4,15]	0,191

Tabela D.45: Quadro da ANOVA para o Experimento 8.

Efeito	p-valor
Reagente	0,002
Tetraciclina	0,001
Reagente * Tetraciclina	<0,001

Tabela D.46: Comparações entre as médias do índice de viabilidade das doses de tetraciclina para o Controle – Experimento 8.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
50 – 0	-6,76	[-22,98; 9,47]	0,825
150 – 0	-8,84	[-25,06; 7,38]	0,576
500 – 0	-17,68	[-33,90; -1,46]	0,028
150 – 50	-2,09	[-18,31; 14,14]	0,999
500 – 50	-10,93	[-27,15; 5,30]	0,334
500 – 150	-8,84	[-25,06; 7,38]	0,576

Tabela D.47: Comparações entre as médias do índice de viabilidade das doses de tetraciclina para o Veneno – Experimento 8.

Comparação	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
50 – 0	12,01	[-4,21; 28,23]	0,237
150 – 0	37,95	[21,73; 54,17]	<0,001
500 – 0	21,85	[5,63; 38,07]	0,005
150 – 50	25,94	[9,72; 42,16]	0,001
500 – 50	9,84	[-6,38; 26,06]	0,453
500 - 150	-8,84	[-25,06; 7,38]	0,052

Tabela D.48: Comparações entre as médias do índice de viabilidade do Veneno e Controle nas diferentes doses de tetraciclina – Experimento 8.

Comparação entre Controle e Veneno na dose (nM)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
0	-36,03	[-52,25; -19,81]	<0,001
50	-17,26	[-33,49; -1,04]	0,033
150	10,76	[-5,46; 26,98]	0,351
500	3,50	[-12,72; 19,72]	0,994

Apêndice E

Tabela E.1: Comparações entre as médias da variável DAF - Experimento 1.

Comparação entre as doses ($\mu\text{g/mL}$)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
12,00 – 0,00	-2,20	[-3,50; -0,90]	0,012
20,00 – 0,00	-1,05	[-2,35; 0,25]	0,085
20,00 – 12,00	1,15	[-0,15; 2,45]	0,068

Tabela E.2: Comparações entre as médias da variável MCP - Experimento 1.

Comparação entre as doses ($\mu\text{g/mL}$)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
12,00 – 0,00	-5,40	[-7,40; -3,40]	0,003
20,00 – 0,00	-7,85	[-9,85; -5,85]	0,001
20,00 – 12,00	-2,45	[-4,45; -0,446]	0,029

Tabela E.3: Comparações entre as médias da variável MHC I - Experimento 1.

Comparação entre as doses ($\mu\text{g/mL}$)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
12,00 – 0,00	-7,20	[-9,22; -5,18]	0,001
20,00 – 0,00	-6,10	[-8,12; -4,08]	0,002
20,00 – 12,00	1,10	[-0,92; 3,12]	0,203

Tabela E.4: Comparações entre as médias da variável EGRF - Experimento 1.

Comparação entre as doses ($\mu\text{g/mL}$)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
12,00 – 0,00	1,25	[-12,46; 14,96]	0,925
20,00 – 0,00	26,20	[12,49; 39,91]	0,008
20,00 – 12,00	24,95	[11,24; 38,66]	0,010

Tabela E.5: Comparações entre as médias da variável CD59 - Experimento 2.

Comparação entre as doses ($\mu\text{g/mL}$)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
12,00 – 0,00	-102,10	[-154,60; -49,55]	0,008
20,00 – 0,00	-38,50	[-91,00; 14,05]	0,108
20,00 – 12,00	63,60	[11,05; 116,10]	0,030

Tabela E.6: Comparações entre as médias da variável MCP - Experimento 2.

Comparação entre as doses ($\mu\text{g/mL}$)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
12,00 – 0,00	-14,95	[-20,97; -8,93]	0,004
20,00 – 0,00	-19,80	[-25,82; -13,78]	0,002
20,00 – 12,00	-4,850	[-10,87; 1,170]	0,086

Tabela E.7: Comparações entre as médias da variável MHC I - Experimento 2.

Comparação entre as doses ($\mu\text{g/mL}$)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
12,00 – 0,00	-16,40	[-19,82; -12,98]	0,001
20,00 – 0,00	-18,85	[-22,27; -15,43]	<0,001
20,00 – 12,00	-2,450	[-5,87; 0,97]	0,113

Tabela E.8: Comparações entre as médias da variável $\beta 2\text{M}$ - Experimento 2.

Comparação entre as doses ($\mu\text{g/mL}$)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
12,00 – 0,00	-76,90	[-87,30; -66,52]	<0,001
20,00 – 0,00	-103,80	[-114,20; -93,42]	<0,001
20,00 – 12,00	-26,90	[-37,28; -16,52]	0,004

Tabela E.9: Comparações entre as médias da variável EGRF - Experimento 2.

Comparação entre as doses ($\mu\text{g/mL}$)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença	p-valor
12,00 – 0,00	-7,40	[-8,73; -6,07]	<0,001
20,00 – 0,00	-12,35	[-13,68; -11,02]	<0,001
20,00 – 12,00	-4,950	[-6,28; -3,62]	0,001

Tabela E.10: Coeficientes e respectivos p-valores do modelo ajustado para a variável anexina - Experimento 4.

Coeficiente	Estimativa	p-valor
Controle	3,11	0,009
Veneno	5,01	0,004
Tempo decorrido	1,14	0,084

Tabela E.11: Coeficientes e respectivos p-valores do modelo ajustado para a variável presença de anexina - Experimento 5.

Coeficiente	Estimativa	p-valor
Controle	12,19	0,004
Veneno	10,59	0,022
Veneno 1,00*Tempo decorrido	7,44	0,003
Veneno 3,00*Tempo decorrido	15,20	< 0,001