

RAE – CEA – 08P12

**RELATÓRIO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA SOBRE O
PROJETO: “ORGANIZAÇÃO DO FUSO MITÓTICO
EM CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS:
ASSOCIAÇÃO ENTRE A AÇÃO DE DROGAS QUE
ATUAM SOBRE OS MICROTÚBULOS E A
AGRESSIVIDADE TUMORAL”.**

**Júlia Maria Pavan Soler
Bruno Ramos dos Santos
William Custódio**

São Paulo, julho de 2008

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA
RELATÓRIO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA SOBRE O PROJETO:

TÍTULO: “Organização do fuso mitótico em células normais e tumorais: associação entre a ação de drogas que atuam sobre os microtúbulos e a agressividade tumoral.”

PESQUISADORA: Beatriz Brandão Vaz de Lima

ORIENTADORA: Gláucia Maria Machado Santelli

INSTITUIÇÃO: Instituto de Ciências Biomédicas – USP

FINALIDADE: Mestrado

RESPONSÁVEIS PELA ANÁLISE: William Custódio
Bruno Ramos dos Santos
Júlia Maria Pavan Soler

REFERÊNCIA DESTE TRABALHO:

CUSTÓDIO, W.; SANTOS, B.R.; SOLER, J.M.P. **Relatório de análise estatística sobre o projeto: “Organização do fuso mitótico em células normais e tumorais: associação entre a ação de drogas que atuam sobre os microtúbulos e a agressividade tumoral”**. São Paulo, IME-USP, 2008. (RAE – CEA 08P12).

FICHA TÉCNICA

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

CHEN, J.G; HORWITZ, S.B. (2002). Differential mitotic responses to microtubule-stabilizing and destabilizing drugs. **Câncer Research**, v. 62, p. 1935-1938.

LENGAUER, C.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, v. 396, p. 643-649,

PAULINO, C.D.; SINGER, J.M. (2006). **Análise de Dados Categorizados**. 1.ed. Edgard Blucher. 648p.

RAJAGOPALAN, H. LENGAUER, C. (2004). Aneuploidy and cancer. **Nature**, v. 432, p. 338-341.

PROGRAMAS COMPUTACIONAIS UTILIZADOS

Microsoft Office (versão 2003)

Software MINITAB (versão 14)

Software R (versão 2.5.1)

TÉCNICAS ESTATÍSTICAS UTILIZADAS

Análise Descritiva Unidimensional (03:010)

Análise de Dados Categorizados (06:030)

ÁREA DE APLICAÇÃO

Bioestatística (14:030)

ÍNDICE

Resumo	5
1. Introdução.....	6
2. Objetivos	7
3. O ciclo celular	7
4. Descrição do estudo	7
4.1. Amostra.....	7
4.2. Delineamento experimental	8
4.3. Execução do experimento.....	8
4.4. Descrição das variáveis.....	9
5. Análise descritiva	9
5.1. Análise descritiva da ploidia como variável quantitativa independente de tratamento	10
5.2. Análise descritiva da ploidia com variável quantitativa para cada linhagem independente de tempo e droga.....	10
5.3. Análise descritiva da ploidia como variável quantitativa para cada tratamento	10
5.4. Análise descritiva da ploidia categorizada para cada tratamento	12
6. Análise inferencial da variável ploidia	13
6.1. Modelo funcional linear para linhagem Normal	14
6.2. Modelo funcional linear para linhagem Moderada.....	15
6.3. Modelo funcional linear para linhagem Agressiva.....	15
6.4. Modelo log-linear para linhagem Normal	16
6.5. Modelo log-linear para linhagem Moderada	17
6.6. Modelo log-linear para linhagem Agressiva	18
7. Conclusões.....	19
Apêndice A – Tabelas.....	21
Apêndice B – Gráficos	29
Apêndice C – Modelos	46

Resumo

Este estudo tem como finalidade averiguar os possíveis efeitos de três fatores, linhagem (Normal, tumoral Moderada, tumoral Agressiva), tempo (24h e 48h) e droga (Controle, Taxol, Vincristina), assim como suas interações, sobre a quantidade de material genético (DNA) de células da mama humana.

Para isto analisamos dados de um experimento onde células de cada uma das três linhagens foram expostas à ação das drogas nos dois tempos de interesse. A variável resposta de interesse é a ploidia (u.a.)¹, que mede a quantidade de DNA presente no núcleo das células. Um total de 250 células de cada condição experimental foi avaliado segundo a ploidia.

Na análise inferencial do problema foram ajustados modelos estatísticos, log-lineares e funcionais lineares, para cada uma das três linhagens, os quais consideram os efeitos dos fatores na variável ploidia categorizada.

A droga Vincristina apresentou efeito nas três linhagens, com interação com o tempo para ambos os modelos nas linhagens Moderada e Agressiva, indicando, em geral, maior quantidade de material genético no tempo de 24 h. A droga Taxol somente apresentou efeito na linhagem Moderada, também com interação com o tempo, porém na direção contrária.

¹ Unidade arbitrária.

1. Introdução

Alterações genéticas podem produzir transformação maligna da célula normal em célula tumoral. Essa transformação pode ocorrer pela perda da fidelidade no processo de replicação, reparo e segregação do genoma. Os mecanismos moleculares envolvidos nestes processos, embora amplamente estudados, não estão completamente elucidados.

Várias hipóteses foram formuladas com o intuito de explicar como uma célula normal dá origem a uma célula tumoral. Dentre os processos de transformação maligna da célula encontramos as alterações de ploidia, mais especificamente a aneuploidia, que é uma característica comum encontrada em tumores e se caracteriza por anormalidades numéricas ou estruturais (tais como deleções), que resultam em desvio do número normal de cromossomos ou da quantidade de material genético (DNA) presente nas células (Rajagopalan e Lengauer, 2004). Sugere-se que a aneuploidia possa ser a causa de tumorigênese, ou pode ser consequência do crescimento desregulado da célula tumoral, atuando como produto de outros processos essenciais na transformação maligna (Lengauer *et al*, 1998).

Conhecidas drogas inibidoras do fuso mitótico, como as utilizadas neste estudo, podem ser aneugênicas dependendo da dose administrada, podendo levar a alterações estruturais cromossômicas, poliploidia e aneuploidia. Drogas que estabilizam os fusos mitóticos, como o Taxol (TX), e drogas que o desestabilizam, tais como Vincristina (VCR), são utilizadas no tratamento de diversos cânceres humanos, mas cujo mecanismo de ação não é bem entendido.

O Taxol e a Vincristina são drogas utilizadas no tratamento de câncer de mama, e dependendo da dose administrada podem levar à formação de populações celulares aneuplóides (Chen e Horwitz, 2002). Dessa maneira, há vários estudos que tentam elucidar os efeitos dessas drogas sobre as células e sobre o ciclo celular.

2. Objetivos

O objetivo do estudo é verificar como as drogas Taxol e Vincristina aplicadas em células de mama humana de três linhagens diferentes (Normal, tumoral Moderada, tumoral Agressiva), em dois tempos (24 horas e 48 horas) influenciam na quantidade de DNA. Em particular, existe interesse em conhecer de que forma essas drogas estão relacionadas com o fenômeno da aneuploidia.

3. O ciclo celular

No seu processo de divisão (ciclo celular), uma célula humana normal possui valores de ploidia que variam entre 2,0 a 4,0 u.a. dependendo da fase do ciclo em que se encontra. A célula inicia o ciclo celular na fase G1, com valor correspondente de ploidia igual a 2,0. Na fase seguinte (fase S) o material genético começa a ser duplicado, elevando assim o valor de ploidia (entre 2,0 e 4,0 u.a.). Logo a seguir, na fase G2, o núcleo começa a organizar os cromossomos para que, na fase seguinte (mitose), a divisão celular inicie-se de fato. É na mitose (ploidia 4,0) do ciclo celular que atuam as drogas consideradas neste estudo.

Valores de ploidia abaixo de 2,0 indicam células hipodiplóides e valores acima de 4,0 células hipertetraplóides. Tais tipos celulares podem ser resultado de erros no processo de divisão. É exatamente este tipo de célula que se espera encontrar nos tratamentos em que as drogas foram ministradas.

4. Descrição do estudo

4.1. Amostra

A amostra é composta por um total de 4.500 células (1500 de cada linhagem) de mama de 3 mulheres. Todas as células de uma determinada linhagem são provenientes de uma única mulher.

4.2. Delineamento experimental

Neste estudo foram utilizadas três linhagens de células de mama: Normal, tumoral Moderada e tumoral Agressiva. Outros dois fatores estão presentes no estudo: droga (Taxol e Vincristina) e tempo (24h e 48h).

Cada linhagem possui 6 tratamentos: 3 no tempo 24h e 3 no tempo 48h. Dentre os tratamentos do tempo 24h, temos 1 tratamento controle, 1 tratamento que recebeu a droga Taxol e o tratamento restante recebeu a droga Vincristina, ocorrendo o mesmo nos tratamentos do tempo 48h. Em cada tratamento foram analisadas 250 células, com três réplicas para cada tratamento.

Nos tratamentos do nível 24h do fator tempo as células foram cultivadas em um meio de cultura líquido, com um tipo de droga e por um período de 24 horas. Após esse período, as células foram fixadas² e suas estruturas analisadas.

Os tratamentos do nível 48h do fator tempo passaram por duas etapas: a primeira, assim como o tratamento descrito anteriormente, consistiu no cultivo das células em um meio de cultura líquido, com um tipo de droga e por um período de 24 horas. Após esse período, o meio de cultura líquido com a droga foi removido e então colocado um novo meio de cultura líquido sem a droga por um novo período de 24 horas, totalizando 48h. Essa segunda etapa também é chamada de fase de recuperação. Após esse novo período, as células foram fixadas e suas estruturas analisadas. O delineamento pode ser visualizado na Tabela A.1.

4.3. Execução do experimento

As placas contendo as células inseridas em meio de cultura líquido foram colocadas em estufa a 37 graus Celsius durante 72 horas com a intenção de simular o ambiente do corpo humano. Após esse período, cada placa recebeu um corante que tinha como função “tingir” o material genético (DNA) presente no núcleo das células. Terminado esse

² As células são mortas e suas estruturas preservadas para análise do DNA.

processo, uma lâmina de microscópio, por placa, era produzida para análise em microscópio. Uma câmera então foi conectada ao equipamento para transmitir a imagem a um computador que, através de um software específico, mediu a intensidade da fluorescência produzida pelo corante no DNA de cada uma de 250 células.

Estas amostras de 250 células de cada lâmina foram selecionadas aleatoriamente pela própria pesquisadora e como critério de inclusão deveriam ter seus núcleos claramente definidos e serem interfásicas (não estarem em mitose).

4.4. Descrição das variáveis

O estudo possui apenas uma variável resposta: ploidia (u.a)³. Esta variável mede a quantidade de DNA presente no interior do núcleo celular e através dela é possível ter conhecimento da fase do ciclo celular em que se encontra a célula.

A variável será analisada na forma contínua e na forma categorizada. As categorias de classificação encontram-se na Tabela A.3.

As variáveis explicativas são três: linhagem (Normal, Moderada, Agressiva), droga (Controle, Taxol, Vincristina) e tempo (24h, 48h). Por serem variáveis explicativas qualitativas, estas serão denominadas fatores.

5. Análise descritiva

Iniciaremos a análise do banco de dados considerando a variável ploidia como quantitativa. Em uma primeira abordagem foi pesquisada a independência entre as respostas de ploidia para as células de cada linhagem no grupo controle. Para isso, gráficos com a distribuição das observações indexadas foram construídos (Gráficos B.1 a B.3) os quais indicaram um padrão típico de independência.

Analisaremos esta variável em três etapas: independentemente dos fatores linhagem, tempo e droga; separadamente por cada linhagem e por último observando seu comportamento em cada um dos 18 tratamentos. Em seguida, dada a categorização

³ Unidades arbitrárias

definida na Tabela A.3, analisamos o possível efeito dos fatores em cada tratamento por meio de tabelas de contingência e gráficos de barras.

5.1. Análise descritiva da ploidia como variável quantitativa independentemente de tratamento

O Gráfico B.1 mostra o histograma da variável ploidia independentemente da linhagem da célula, tempo e droga utilizados no tratamento. Pela análise do gráfico há indicação de que o padrão de variação da variável segue um modelo de mistura de distribuições, dada a característica de bi-modalidade notada no gráfico, que pode ser vista pela concentração de valores próximos de 2,0 e de 4,0. Este padrão de variação dos valores de ploidia já é conhecido na literatura, o qual descreve as diferentes fases do ciclo celular em que o conjunto das 250 células se apresenta. Outra característica que pode ser notada é a assimetria dos dados no histograma apresentado.

5.2. Análise descritiva da ploidia como variável quantitativa para cada linhagem independentemente de tempo e droga

O intuito desta seção é verificar o quão parecidas, ou diferentes, podem ser as linhagens de células utilizadas no estudo, independentemente dos outros fatores envolvidos. Os Gráficos B.5 a B.7 mostram os histogramas da variável ploidia para cada linhagem de célula. No Gráfico B.2, histograma da linhagem Normal, podemos notar de forma mais acentuada a bi-modalidade supracitada na Seção 5.1, enquanto que no Gráfico B.3, histograma da linhagem Moderada, esse padrão de variação parece ter uma influência menor na distribuição da variável. Para a linhagem Agressiva, pelo Gráfico B.4, não se nota a bi-modalidade, mas sim uma distribuição leptocúrtica marcante, com grande concentração de células com valores de ploidia próximos de 2,0.

5.3. Análise descritiva da ploidia como variável quantitativa para cada tratamento

É interessante, de acordo com os objetivos do estudo, analisarmos o efeito dos fatores linhagem, droga e tempo, na variável ploidia. Desta forma, analisaremos o padrão

de variação das respostas de ploidia segundo o tempo e droga dentro de cada linhagem, e então faremos a comparação das linhagens entre si em cada nível dos outros fatores. Os Gráficos B.8 a B.13 apresentam os histogramas e boxplots para cada tratamento e a Tabela A.2 apresenta estatísticas descritivas dos valores de ploidia dentro de cada tratamento.

Para a linhagem Normal, pela análise dos Gráficos B.8 e B.11, em conformidade com o que havíamos citado na Seção 5.2, a bi-modalidade é bastante evidente em todos os tratamentos, enquanto que parece não existir um determinado padrão entre os tempos 24h e 48h. Podemos dizer também que não há evidências fortes quanto ao efeito das drogas (Taxol e Vincristina) com relação ao controle, a partir dos gráficos analisados, isto é, não há indicação de diferenças (aparentemente significativas) entre os grupos tratados e o controle.

Na linhagem Moderada, analisando agora os Gráficos B.9 e B.12, podemos verificar que a característica de bi-modalidade está presente em alguns tratamentos, enquanto que não parece haver uma relação clara entre os tempos 24h e 48h. Aqui também não há evidências claras quanto à diferença entre os grupos tratados com a droga e os seus respectivos controles.

Na linhagem Agressiva, a partir dos Gráficos B.10 e B.13, podemos dizer que os histogramas de alguns tratamentos apresentam uma bi-modalidade mais discreta, se comparada a essa característica em outras linhagens. Pelo boxplot apresentado, podemos verificar que a variação da ploidia para essa linhagem é bem pequena, com exceção apenas aos tratamentos com a droga Vincristina. Além disso, merece destaque o fato de que os tratamentos com a droga Vincristina mostram diferenças marcantes com relação ao controle, como aumento de variância em ambos os tempos e, no tempo 24h, o boxplot se encontra deslocado mais acima do que o controle, o que significa dizer que, nesse tempo, as células apresentam valores de ploidia maiores do que no grupo que não recebeu nenhuma droga.

Por último, analisando as linhagens conjuntamente, podemos dizer que as células da linhagem Agressiva possuem valores de ploidia menores do que a das outras linhagens, independentemente dos demais fatores. O mesmo ocorre quanto à variabilidade, já que os tratamentos da linhagem Agressiva apresentaram menor desvio

padrão. Por outro lado, a linhagem Normal apresentou a maior variância relativamente às outras linhagens.

5.4. Análise descritiva da ploidia categorizada para cada tratamento.

Tendo em vista os resultados encontrados sobre a distribuição da variável ploidia, a qual apresentou bi-modalidade, assimetria, curtose positiva, passaremos à categorização da variável, que será dividida em classes de ploidia de acordo com a definição apresentada na Tabela A.3.

Da mesma forma que na Seção 5.3, analisamos inicialmente dentro de cada linhagem e, em seguida, fazemos a análise de forma conjunta.

Verificando as Tabelas A.4 e A.5, podemos notar que, em todos os tratamentos da linhagem Normal, a classe 2 é a de maior frequência. Nos tratamentos com a droga Vincristina, independentemente do tempo, há um aumento considerável na frequência da classe 5, com relação ao controle. A predominância destas classes pode ser conferida de forma mais clara nos Gráficos B.14 e B.12. Esse efeito acentuado da droga Vincristina relativamente ao controle pode ser um indício de aneuploidia nas células que receberam a droga. A análise gráfica também nos mostra que os grupos tratados com a droga Taxol não diferem de forma marcante com relação ao controle.

Na linhagem Moderada, a partir das Tabelas A.6 e A.7 e dos Gráficos B.16 e B.17, podemos perceber que a classe de maior frequência é a classe 2. No entanto, nos tratamentos com a droga Vincristina existe uma diferença na frequência das outras classes, já que no tempo 24h há uma diminuição, com relação ao grupo controle, na quantidade de células na classe 3 e um aumento na frequência de células da classe 5, enquanto que, no tempo 48h, há um aumento significativo na frequência de células da classe 1 (32%), também com relação ao controle. Para a droga Taxol, isso ocorre somente no tempo 24h, onde há um aumento no número de células na classe 2 e uma diminuição de células da classe 5, com relação ao controle.

Na linhagem Agressiva, segundo as Tabelas A.8 e A.9 e os gráficos B.18 e B.19, a classe 2 contém a maioria das células dentro de todos os tratamentos, com exceção apenas dos tratamentos com a droga Vincristina, no tempo 24h. Nesse último grupo, a classe predominante é a classe 3 (47%), e ainda há um aumento considerável na

freqüência de células da classe 1 (28%). Pode-se dizer que esta distribuição diferencia bastante este grupo do seu respectivo controle, o que poderia ser um indício de aneuploidia.

Por fim, analisando de forma conjunta todas as linhagens de células presentes no estudo, notamos que a droga Taxol mostrou diferenças marcantes relativamente ao grupo controle somente na linhagem Moderada no tempo 24h. Enquanto que na droga Vincristina percebem-se diferenças em praticamente todos os tratamentos, com relação ao grupo que não recebeu nenhum tipo de droga. Além disso, apenas em alguns tratamentos com a droga Vincristina a classe 5 aparece com freqüências relativas maiores de que 15%, o que poderia ser um indício de aneuploidia.

6. Análise inferencial da variável ploidia categorizada

A análise inferencial da variável ploidia quantitativa, utilizando diversas transformações na variável, não demonstrou resultados satisfatórios pela análise de diagnóstico, mesmo com classes mais flexíveis de distribuição (Birnbau-Saunders) ou distribuições assimétricas. Com isso, optamos pelo ajuste de modelos de dados categorizados.

Considerando a variável ploidia categorizada (Tabelas A.4 a A.9 do Apêndice A) foram ajustados modelos log-lineares e modelos funcionais lineares (vide Paulino e Singer, 2006), para analisar os possíveis efeitos dos fatores tempo e droga no comportamento da variável ploidia para cada uma das 3 linhagens em questão, separadamente. Modelos que englobavam as 3 linhagens simultaneamente foram ajustados mas não obtiveram ajustes satisfatórios, além de envolverem muitos parâmetros e serem de difícil interpretação.

Os modelos funcionais lineares apresentaram bons ajustes e suas interpretações são simplificadas. Neste caso, a função definida para as 5 classes de resposta foi a classe média de ploidia. Na formulação do modelo adotou-se a parametrização casela de referência, o que significa que a análise foi feita com relação a uma referência pré-fixada, que no caso é o valor esperado da classe média de ploidia no grupo controle no tempo 24 horas. A Tabela A.10 no Apêndice A possui os valores das estatísticas de ajuste

obtidos por estes modelos, e as Tabelas A.11 a A.13 possuem as estimativas de seus parâmetros.

Os modelos log-lineares possibilitam comparar efeitos dos fatores e suas interações considerando cada classe de ploidia relativamente a uma delas. Na análise adotou-se uma classe, que é a união das classes 1 e 2, que continuará sendo chamada de classe 2, como referência para todas as demais, uma vez que esta proporcionou os melhores ajustes. Também na formulação deste modelo adotou-se a parametrização caselas de referência, que nesse caso são as chances de classificação de uma célula nas classes 3, 4 e 5, com relação à classe 2, no grupo controle, tempo 24 horas. Os resultados destes ajustes podem ser encontrados no Apêndice A, Tabela A.14 a Tabela A.16. Segundo interesse da pesquisadora, neste relatório só discutiremos os resultados referentes às classes 4 e 5 dos modelos log-lineares. As conclusões sobre a classe 3 estão apresentadas nas tabelas de resultados acima referidas e podem ser interpretadas de maneira análoga.

Mais detalhes sobre os dois modelos podem ser encontrados no Apêndice C, que possui uma abordagem mais técnica a respeito.

6.1 Modelo funcional linear para linhagem Normal

Para a linhagem Normal o efeito de interação droga*tempo não foi significativo. O modelo reduzido que se ajustou aos dados mostrou efeito significativo apenas do tratamento Vincristina. O valor esperado da classe média de ploidia estimado pelo modelo para o tratamento controle no tempo 24 horas (casela de referência) é 2,942 (p-valor < 0,001), um valor próximo à classe 3 de ploidia. Importante salientar que, pelo fato que nenhum dos efeitos relacionados à droga Taxol e ao tempo serem significativos, considera-se casela de referência a união dos tratamentos Taxol e Controle original em ambos os tempos. O acréscimo neste valor quando do uso da droga Vincristina é de 0,404 (p-valor < 0,001). As alterações na classe média da ploidia referentes ao uso da droga Taxol e à mudança no nível do fator tempo de 24 horas para 48 horas não são significativas. Estes resultados podem ser visualizados com o apoio do gráfico de perfis de médias para os dados da linhagem Normal (Gráfico B.20).

A Tabela A.11 do Apêndice A possui os valores das estimativas dos parâmetros bem como seus erros-padrão e p-valores.

6.2 Modelo funcional linear para linhagem Moderada

Pelo modelo o efeito da droga Vincristina no tempo 48 horas, que é a diferença do valor esperado da classe média de ploidia do grupo Vincristina para o grupo Controle, é 0,935 ($p\text{-valor} < 0,001$) menor que o efeito no tempo 24 horas (efeito de interação). Essa mesma relação é inversa para a droga Taxol, onde o efeito no tempo 24 horas é 0,599 ($p\text{-valor} < 0,001$) menor que no tempo 48 horas.

Para a linhagem Moderada, o modelo funcional linear que se ajustou aos dados possui efeitos de interação significativos e, portanto, o estudo dos efeitos do fator droga deve ser feito fixando-se cada nível do fator tempo, por exemplo. Sendo assim, podemos afirmar que o valor esperado da classe média de ploidia no tratamento controle no tempo 24 horas é de 2,842 ($p\text{-valor} < 0,001$). Fixando-se o nível 24 horas do fator tempo, o valor esperado da classe média de ploidia decresce em 0,546 ($p\text{-valor} < 0,001$) quando utilizada a droga Taxol. Ao utilizar a droga Vincristina, ainda no tempo 24 horas, o valor esperado da classe média de ploidia é acrescido em 0,258 ($p\text{-valor} = 0,021$) em relação ao valor do grupo controle. Estes resultados podem ser visualizados a partir do gráfico de perfis de médias, Gráfico B.21.

Observando agora apenas o grupo controle, temos que o valor esperado da classe média de ploidia no tempo 24 horas pode ser considerado igual ao do tempo 48 horas, ou seja, o efeito do fator tempo não é significativo ($p\text{-valor} = 0,080$).

A Tabela A.12 do Apêndice A possui os valores das estimativas dos parâmetros bem como seus erros-padrão e p-valores.

6.3 Modelo funcional linear para linhagem Agressiva

Para esse modelo somente a interação entre tempo e Vincristina pôde ser considerada significativa. Para essa droga, o efeito no tempo 48 horas é 1,136 menor que no tempo 24 horas.

Também segundo o modelo, apenas a droga Vincristina altera o valor esperado da classe média de ploidia de maneira significativa ($p\text{-valor} < 0,001$), não sendo significativo o efeito da droga Taxol.

O valor esperado da classe média de ploidia nas células do grupo controle no tempo 24 horas (casela de referência) é 2,406 ($p\text{-valor} < 0,001$). O acréscimo neste valor fixando-se o nível 24 horas do fator tempo quando do uso da droga Vincristina é de 1,240 ($p\text{-valor} < 0,001$). Vale ressaltar que a casela de referencia, nesse modelo, se refere ao conjunto de células que se formam a partir da união das células que não receberam nenhuma droga com as células que receberam a droga Taxol, já que essa droga não apresentou nenhum efeito.

O efeito causado pela mudança no nível do fator tempo de 24 para 48 horas não causa mudança significativa no valor esperado da classe média no grupo controle ($p\text{-valor} = 0,136$). O Gráfico B.22 ilustra estes resultados.

A Tabela A.13 do Apêndice A possui os valores das estimativas dos parâmetros bem como seus erros-padrão e p-valores.

6.4 Modelo log-linear para linhagem Normal

Segundo o modelo ajustado para essa linhagem, os efeitos de interação entre a droga Vincristina e o tempo somente foram percebidos na chance relativa da classe 3. Para todas as outras classes e para a droga Taxol podemos dizer que não houve interação significativa entre droga e tempo.

Como os parâmetros relacionados ao efeito da droga Taxol não se mostraram significativos no ajuste do modelo, o grupo controle, de interesse para se concluir sobre os efeitos dos fatores, é formado pelas células que não receberam nenhuma droga e as células que receberam a droga Taxol. Para a classe 4, como o parâmetro do tempo não se mostrou significativo, o grupo Controle também é formado pelas células do nível 48 horas do fator tempo.

Para esta linhagem, nas caselas de referência, podemos dizer que a chance de se classificar uma célula na classe 2 é 1,4 vezes a chance de se fazer essa classificação na

classe 4 (ver 7ª coluna, Tabela A.14). Além disso, a chance de se classificar uma célula na classe 2 é 8,7 vezes a chance na classe 5.

Pelo modelo ajustado, podemos dizer também que a chance relativa de se encontrar uma célula na classe 5 no tempo 24 horas é 1,8 vezes a chance de se encontrar células desta mesma classe no tempo 48 horas, sendo este o efeito do tempo na classe 5.

Para a droga Vincristina, podemos dizer que a chance relativa de se classificar uma célula na classe 5 quando se utiliza essa droga é 7,6 vezes a chance em comparação ao grupo controle (ver 6ª coluna). Para a classe 4, essa relação é inversa, já que a chance relativa de se classificar uma célula nesta classe no grupo controle é 1,6 vezes a chance quando se utiliza a droga Vincristina.

Estes resultados podem ser visualizados com o apoio dos gráficos de perfis dos logaritmos das chances para os dados da linhagem Normal (Gráficos B.23 a B.25). As estimativas dos parâmetros do modelo ajustado podem ser vistas na Tabela A.14. A estatística de Wald (p -valor = 0,124) mostra que não há evidências para se rejeitar o ajuste do modelo.

6.5 Modelo log-linear para linhagem Moderada

No modelo log-linear ajustado para a linhagem Moderada, quatro parâmetros da interação se mostraram significativos, sendo dois deles para a droga Taxol e o tempo, e os outros dois para a droga Vincristina e o tempo. Na classe 5, para droga Taxol, concluímos a partir do modelo que o efeito (razão de chances) desta droga no tempo 48 horas é 82,3 vezes o efeito no tempo 24 horas (ver 6ª coluna, Tabela A.14). Por outro lado, na droga Vincristina classe 4, podemos dizer que o efeito desta droga no tempo 24 horas é 8,2 vezes o efeito da droga no tempo 48 horas (ver 7ª coluna).

Como a droga Taxol não apresentou nenhum tipo de efeito na classe 4, o grupo Controle para essa classe é formado pelo conjunto das células que não receberam nenhuma droga e o das células que receberam a droga Taxol. Na classe 5, como não há nenhum tipo de efeito da droga Vincristina, o grupo Controle para essa classe é formado

pela união dos conjuntos das células que receberam esta droga com o das células que formavam o grupo Controle de origem.

Também nesta linhagem, para as caselas de referência, podemos dizer que a chance de se classificar uma célula na classe 2 é 3,8 e 3,3 vezes a chance de se fazer essa classificação nas classes 4 e 5, respectivamente.

No tempo 24 horas, segundo o modelo para esta linhagem, podemos dizer que a chance, com relação à classe 2, de se encontrar uma célula na classe 5 é 24,2 vezes a chance de se encontrar células da mesma classe no grupo 48 horas. Para a classe 4, a chance relativa no tempo 48 horas é 1,7 vezes a do tempo 24 horas. Como há interação significativa do tempo com as drogas do estudo em ambas as classes, ou seja, para cada nível do fator droga o efeito do tempo é diferente, esses resultados se referem ao grupo Controle.

Com relação aos grupos tratados com a droga Taxol, podemos dizer que a chance relativa de se classificar uma célula na classe 5, no grupo Controle, é 49,1 vezes a chance de se fazer essa mesma classificação no grupo tratado com a droga referida. Como a interação, na classe 5, da droga Taxol com o tempo é significativa, esse efeito se refere ao tempo 24 horas.

Para a droga Vincristina, para esta linhagem, de acordo com o modelo ajustado, podemos dizer que a chance relativa de se encontrar uma célula na classe 4, no grupo tratado com a droga, é 1,7 vezes a chance de se encontrar células dessa mesma classe no grupo Controle. Essas conclusões se referem ao tempo 24 horas, pois a interação entre o tempo e a droga nesta classe é significativa.

Os Gráficos B.26 a B.28 ilustram os resultados deste modelo. As estimativas dos parâmetros do modelo ajustado podem ser vistas na Tabela A.15. A estatística de Wald (p -valor = 0,100) indica que o modelo parece se ajustar aos dados.

6.6 Modelo log-linear para linhagem Agressiva

Para a linhagem Agressiva, somente as interações entre a droga Vincristina e o tempo se mostraram significativas ao nível de significância de 5%. Na classe 5, o efeito (razão de chances) desta droga no tempo 24 horas é 45,4 vezes o efeito no tempo 48

horas. Para a classe 4, o efeito da droga no tempo 24 horas é 3,7 vezes o efeito no tempo 48 horas.

Assim como nos modelos log-lineares da linhagem Normal, os parâmetros da droga Taxol não se mostraram significativos nesse modelo, logo o grupo Controle para essa linhagem deve ser formado pelas células que não receberam droga e as que receberam Taxol.

Para a linhagem Agressiva, nas caselas de referência, a chance de se classificar uma célula na classe 2 é 52,7 vezes a chance de se classificar esta mesma célula na classe 5, enquanto que a chance de se classificar uma célula na classe 2 nessa linhagem é 5,9 vezes a chance de fazer essa classificação na classe 4.

Ainda segundo o modelo ajustado, o efeitos do tempo nas classes 4 e 5 não se mostraram significativos, para o nível de significância de 5%.

Para a droga Vincristina, a chance relativa de se encontrar uma célula da classe 5 no grupo tratado com esta droga é 131,8 vezes a chance relativa de se encontrar células dessa mesma classe no grupo Controle. Para a classe 4, a chance relativa de se encontrar células no grupo tratado é 7,3 vezes a chance de se encontrar células dessa classe no grupo Controle.

Estes resultados podem ser visualizados com o apoio dos gráficos de perfis dos logaritmos das chances para os dados da linhagem Normal (Gráficos B.29 a B.31). As estimativas dos parâmetros do modelo ajustado podem ser vistas na Tabela A.16. A estatística de Wald (p -valor = 0,437) mostra que não há evidências para se rejeitar o ajuste do modelo.

7. Conclusões

Através da análise inferencial que utilizou como ferramenta os modelos funcionais lineares e os modelos log-lineares, podemos concluir que para a linhagem Normal de células não existe efeito significativo da droga Taxol, enquanto que o tempo se mostrou significativo somente para as classes 3 e 5, não tendo significância no modelo que considerava a classe média de ploidia como resposta. A droga Vincristina aumenta o valor esperado da classe média de ploidia, segundo o modelo funcional linear,

independentemente do tempo. Isso é ratificado no modelo log-linear na medida que a chance de se classificar uma célula na classe 5 é maior nos grupos tratados com essa droga com relação ao grupo controle.

Para a linhagem Moderada, podemos dizer que o efeito da droga Vincristina no tempo 48 horas é menor que no tempo 24 horas, dado que a chance de encontrar células da classe 4 é maior no tempo 24 horas do que no tempo 48 horas, para essa droga. Por outro lado, na droga Taxol essas conclusões são inversas, ou seja, o efeito no tempo 48 horas é maior que no tempo 24 horas, pois a chance de encontrar células na classe 5 é maior no tempo 48 horas que no tempo 24 drogas, quando utiliza-se essa droga. Fixando-se o nível Controle do fator droga o efeito da mudança do nível 24 horas para 48 horas do fator tempo não é significativo, segundo o modelo funcional linear. E fixando o nível 24 horas do fator tempo, podemos concluir que a Vincristina aumenta o valor esperado da classe média de ploidia, novamente porque a chance de classificar uma célula na classe 5 é maior quanto utiliza-se essa droga se comparada ao controle.

Analisando os modelos para linhagem agressiva concluímos que a droga Taxol não altera de maneira significativa o valor esperado da classe média de ploidia das células, para o modelo funcional linear, nem os logaritmos das chances das classes 3, 4 e 5, nos modelos log-lineares. Para a droga Vincristina, o efeito desta no tempo 24 horas é maior que no tempo 48 horas, o que condiz com a conclusão do modelo log-linear, que diz que a chance de encontrar uma célula na classe 5 é maior no tempo 24 horas. Para o nível Controle do fator droga, podemos dizer que não existe efeito de tempo, para ambos modelos.

Ressaltamos que cuidados devem ser tomados quanto a inferir os resultados deste trabalho para a população geral, dado que as todas células da amostra de cada linhagem são provenientes de uma única doadora, respectivamente, comprometendo assim a representatividade amostral.

APÊNDICE A
TABELAS

Tabela A.1 Categorias dos fatores

LINHAGEM	TEMPO	DROGA
NORMAL	24H	CONTROLE
		TAXOL
		VINCRISTINA
	48H	CONTROLE
		TAXOL
		VINCRISTINA
MODERADA	24H	CONTROLE
		TAXOL
		VINCRISTINA
	48H	CONTROLE
		TAXOL
		VINCRISTINA
AGRESSIVA	24H	CONTROLE
		TAXOL
		VINCRISTINA
	48H	CONTROLE
		TAXOL
		VINCRISTINA

Tabela A.2 Medidas resumo da variável ploidia para cada tratamento

LINHAGEM	TEMPO	DROGA	MÉDIA	DP	MÍN	1º Q	MEDIANA	3º Q	MÁX
NORMAL	24H	CONTROLE	3,06	1,25	1,63	2,04	2,72	3,93	9,05
		TAXOL	2,95	1,44	1,46	1,87	2,54	3,70	8,85
		VINCRISTINA	3,55	1,63	2,05	2,42	2,73	4,60	10,56
	48H	CONTROLE	3,04	1,24	1,75	2,06	2,35	4,07	10,82
		TAXOL	3,05	1,20	1,60	2,02	2,79	3,98	8,99
		VINCRISTINA	3,46	1,42	1,70	2,26	3,13	4,48	10,32
MODERADO	24H	CONTROLE	2,89	1,09	1,28	2,01	2,71	3,50	5,97
		TAXOL	2,35	0,82	1,32	1,71	1,95	3,06	5,64
		VINCRISTINA	3,15	1,31	1,06	2,12	2,77	4,15	9,35
	48H	CONTROLE	2,67	0,95	1,63	1,94	2,11	3,52	7,70
		TAXOL	2,73	0,88	1,37	1,96	2,34	3,57	4,75
		VINCRISTINA	2,19	0,84	1,02	1,53	1,80	3,06	5,64
AGRESSIVO	24H	CONTROLE	2,42	0,78	1,55	1,92	2,13	2,67	5,56
		TAXOL	2,41	0,87	1,62	1,91	2,05	2,45	7,43
		VINCRISTINA	3,64	1,20	1,87	2,61	3,21	4,79	7,25
	48H	CONTROLE	2,31	0,70	1,04	1,95	2,05	2,20	4,65
		TAXOL	2,39	0,98	1,18	1,87	1,98	2,50	8,32
		VINCRISTINA	2,54	1,29	0,82	1,75	1,96	3,46	10,15

Tabela A.3 Categorias da variável ploidia

Ploidia (u.a.)	Classificação
0 a 1,6	Classe 1
1,6 a 2,5	Classe 2
2,5 a 3,5	Classe 3
3,5 a 4,5	Classe 4
Acima de 4,5	Classe 5

Tabela A.4 Tabela de contingência para linhagem Normal, tempo 24h

Classes	Droga			Total
	Controle	Taxol	Vincristina	
1	0 (0)	4 (2)	0 (0)	4 (1)
2	120 (48)	119 (48)	91 (36)	330 (44)
3	27 (11)	43 (17)	60 (24)	130 (17)
4	90 (36)	69 (28)	29 (12)	188 (25)
5	13 (5)	15 (6)	70 (28)	98 (13)
Total	250 (100)	250 (100)	250 (100)	750 (100)

Tabela A.5 Tabela de contingência para linhagem Normal, tempo 48h

Classes	Droga			Total
	Controle	Taxol	Vincristina	
1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2	129 (52)	119 (48)	110 (44)	358 (48)
3	23 (9)	26 (10)	20 (8)	69 (9)
4	89 (36)	99 (40)	62 (25)	250 (33)
5	9 (4)	6 (2)	58 (23)	73 (10)
Total	250 (100)	250 (100)	250 (100)	750 (100)

Tabela A.6 Tabela de contingência para linhagem Moderada, tempo 24h

Classes	Droga			Total
	Controle	Taxol	Vincristina	
1	21 (8)	37 (15)	11 (4)	69 (9)
2	89 (36)	130 (52)	100 (40)	319 (43)
3	77 (31)	47 (19)	43 (17)	167 (22)
4	36 (14)	35 (14)	53 (21)	124 (17)
5	27 (11)	1 (0)	43 (17)	71 (9)
Total	250 (100)	250 (100)	250 (100)	750 (100)

Tabela A.7 Tabela de contingência para linhagem Moderada, tempo 48h

Classes	Droga			Total
	Controle	Taxol	Vincristina	
1	0 (0)	3 (1)	79 (32)	82 (11)
2	149 (60)	135 (54)	91 (36)	375 (50)
3	35 (14)	42 (17)	63 (25)	140 (19)
4	63 (25)	67 (27)	16 (6)	146 (19)
5	3 (1)	3 (1)	1 (0)	7 (1)
Total	250 (100)	250 (100)	250 (100)	750 (100)

Tabela A.8 Tabela de contingência para linhagem Agressiva, tempo 24h

Classes	Droga			Total
	Controle	Taxol	Vincristina	
1	4 (2)	0 (0)	0 (0)	4 (1)
2	176 (70)	189 (76)	28 (11)	393 (52)
3	35 (14)	26 (10)	117 (47)	178 (24)
4	32 (13)	31 (12)	35 (14)	98 (13)
5	3 (1)	4 (2)	70 (28)	77 (10)
Total	250 (100)	250 (100)	250 (100)	750 (100)

Tabela A.9 Tabela de contingência para linhagem Agressiva, tempo 48h

Classes	Droga			Total
	Controle	Taxol	Vincristina	
1	2 (1)	13 (5)	38 (15)	53 (7)
2	201 (80)	173 (69)	123 (49)	497 (66)
3	18 (7)	22 (9)	29 (12)	69 (9)
4	28 (11)	38 (15)	54 (22)	120 (16)
5	1 (0)	4 (2)	6 (2)	11 (1)
Total	250 (100)	250 (100)	250 (100)	750 (100)

Tabela A.10 Tabela com estatísticas de ajustes dos modelos funcionais lineares escolhidos

Modelo final	Estatísticas de ajuste			
	Razão de Verossimilhanças	Pearson	Neyman	Wald
Linhagem Normal	0,8415	0,8416	0,8410	0,8413
Linhagem Moderada	1	1	1	1
Linhagem Agressiva	0,7890	0,7891	0,7890	0,7890

Tabela A.11 Tabela com estimativas do modelo funcional linear para linhagem Normal

	Estimativa	Erro Padrão	Valor-z	Valor-p
Intercepto	2,942	0,033	89,686	0,000
Vincristina	0,404	0,068	5,950	0,000

Tabela A.12 Tabela com estimativas do modelo funcional linear para linhagem Moderada

	Estimativa	Erro Padrão	Valor-z	Valor-p
Intercepto	2,842	0,076	37,356	0,000
Tempo	-0,167	0,095	-1,752	0,080
Taxol	-0,546	0,098	-5,595	0,000
Vincristina	0,258	0,112	2,301	0,021
Tempo*Taxol	0,599	0,127	4,702	0,000
Tempo*Vincristina	-0,935	0,142	-6,612	0,000

Tabela A.13 Tabela com estimativas do modelo funcional linear para linhagem Agressiva

	Estimativa	Erro Padrão	Valor-z	Valor-p
Intercepto	2,406	0,035	68,175	0,000
Tempo	-0,074	0,050	-1,491	0,136
Vincristina	1,240	0,079	15,642	0,000
Tempo*Vincristina	-1,136	0,113	-10,099	0,000

Tabela A.14 Tabela com resultados do ajuste do modelo log-linear para linhagem Normal

Parâmetro	Estimativa (Est.)	Erro Padrão	Valor-z	Valor-p	$e^{EST.}$	$\frac{1}{e^{EST.}}$
Intercepto 3/2	-1,216	0,133	-9,174	0,000	0,296	3,374
Intercepto 4/2	-0,347	0,070	-4,950	0,000	0,707	1,415
Intercepto 5/2	-2,170	0,173	-12,534	0,000	0,114	8,759
Tempo 48 horas 3/2	-0,433	0,198	-2,183	0,029	0,649	1,542
Tempo 48 horas 5/2	-0,596	0,178	-3,339	0,001	0,551	1,814
Vincristina 3/2	0,905	0,208	4,342	0,000	2,472	0,405
Vincristina 4/2	-0,445	0,145	-3,082	0,002	0,641	1,561
Vincristina 5/2	2,028	0,197	10,298	0,000	7,599	0,132
48 horas* Vincristina 3/2	-1,040	0,343	-3,030	0,002	0,353	2,830

Nível descritivo da estatística de ajuste de Wald = 0,124

Tabela A.15 Tabela com resultados do ajuste do modelo log-linear para linhagem Moderada

Parâmetro	Estimativa (Est.)	Erro Padrão	Valor-z	Valor-p	$e^{EST.}$	$\frac{1}{e^{EST.}}$
Intercepto 3/2	-0,390	0,145	-2,685	0,007	0,68	1,48
Intercepto 4/2	-1,307	0,163	-7,996	0,000	0,27	3,69
Intercepto 5/2	-1,383	0,204	-6,778	0,000	0,25	3,99
48 horas 3/2	-1,034	0,235	-4,408	0,000	0,36	2,81
48 horas 4/2	0,551	0,171	3,232	0,001	1,73	0,58
48 horas 5/2	-3,204	0,522	-6,143	0,000	0,04	24,64
Taxol 3/2	-0,846	0,217	-3,892	0,000	0,43	2,33
Taxol 4/2	-0,085	0,166	-0,511	0,610	0,92	1,09
Taxol 5/2	-3,703	1,023	-3,620	0,000	0,02	40,58
Vincristina 3/2	-0,572	0,230	-2,485	0,013	0,56	1,77
Vincristina 4/2	0,554	0,233	2,376	0,018	1,74	0,57
Vincristina 5/2	0,385	0,267	1,442	0,149	1,47	0,68
48 horas*Taxol 3/2	1,043	0,329	3,170	0,002	2,84	0,35
48 horas*Taxol 5/2	4,425	1,271	3,481	0,001	83,49	0,01
48 horas*Vincristina 3/2	1,012	0,329	3,074	0,002	2,75	0,36
48 horas*Vincristina 4/2	-2,152	0,353	-6,091	0,000	0,12	8,60

Nível descritivo da estatística de ajuste de Wald = **0,100**

Tabela A.16 Tabela com resultados do ajuste do modelo log-linear para linhagem Agressiva

Parâmetro	Estimativa (Est.)	Erro Padrão	Valor-z	Valor-p	$e^{EST.}$	$\frac{1}{e^{EST.}}$
Intercepto 3/2	-1,800	0,138	-13,023	0,000	0,17	6,05
Intercepto 4/2	-1,768	0,136	-12,967	0,000	0,17	5,86
Intercepto 5/2	-3,965	0,382	-10,392	0,000	0,02	52,71
Tempo 48 horas 3/2	-0,475	0,216	-2,198	0,028	0,62	1,61
Tempo 48 horas 4/2	-0,006	0,191	-0,033	0,974	0,99	1,01
Tempo 48 horas 5/2	-0,389	0,590	-0,660	0,509	0,68	1,48
Vincristina 3/2	3,230	0,252	12,831	0,000	25,28	0,04
Vincristina 4/2	1,991	0,288	6,916	0,000	7,32	0,14
Vincristina 5/2	4,881	0,442	11,038	0,000	131,79	0,01
48 horas*Vincristina 3/2	-2,669	0,363	-7,357	0,000	0,07	14,43
48 horas*Vincristina 4/2	-1,309	0,354	-3,699	0,000	0,27	3,70
48 horas*Vincristina 5/2	-3,817	0,756	-5,051	0,000	0,02	45,45

Nível descritivo da estatística de ajuste de Wald = 0,437

APÊNDICE B

GRÁFICOS

Gráfico B.1 Gráfico dos valores observados segundo a ordem de observação para Linhagem Normal grupo Controle

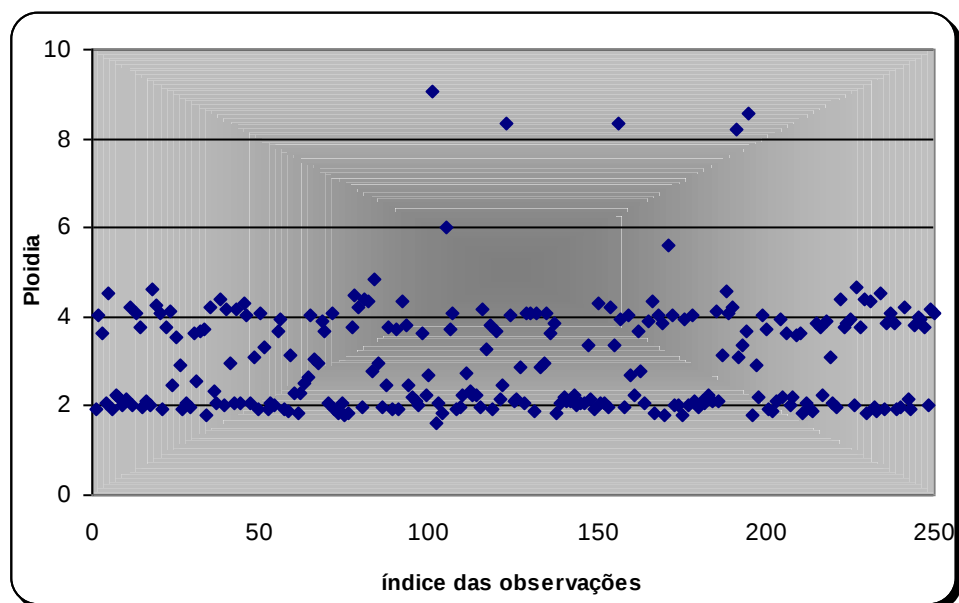


Gráfico B.2 Gráfico dos valores observados segundo a ordem de observação para Linhagem Moderada grupo Controle

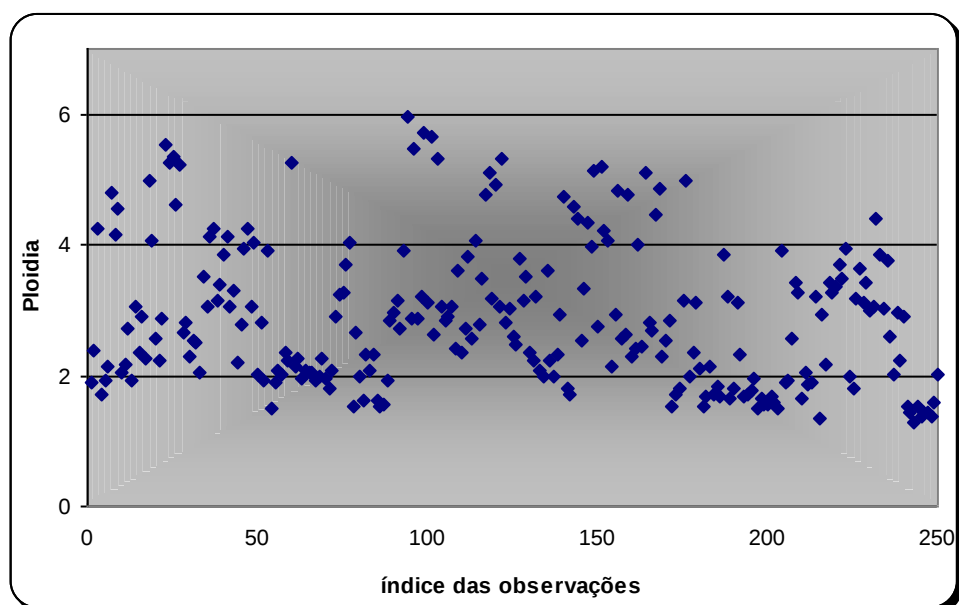


Gráfico B.3 Gráfico dos valores observados segundo a ordem de observação para Linhagem Agressiva grupo Controle

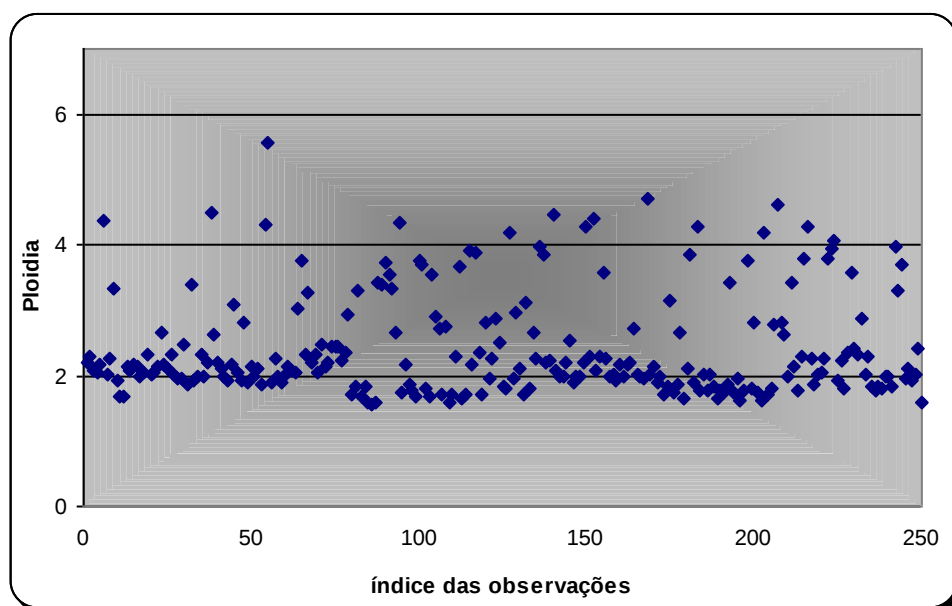


Gráfico B.4 Histograma da variável ploidia

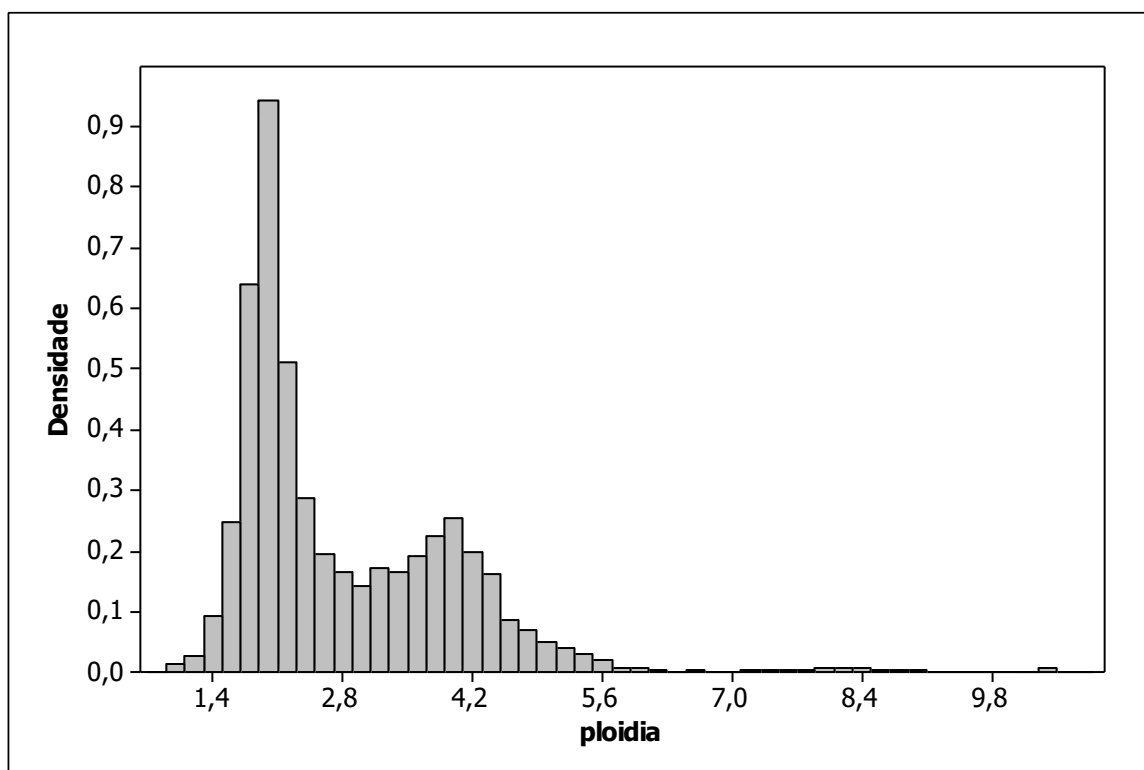


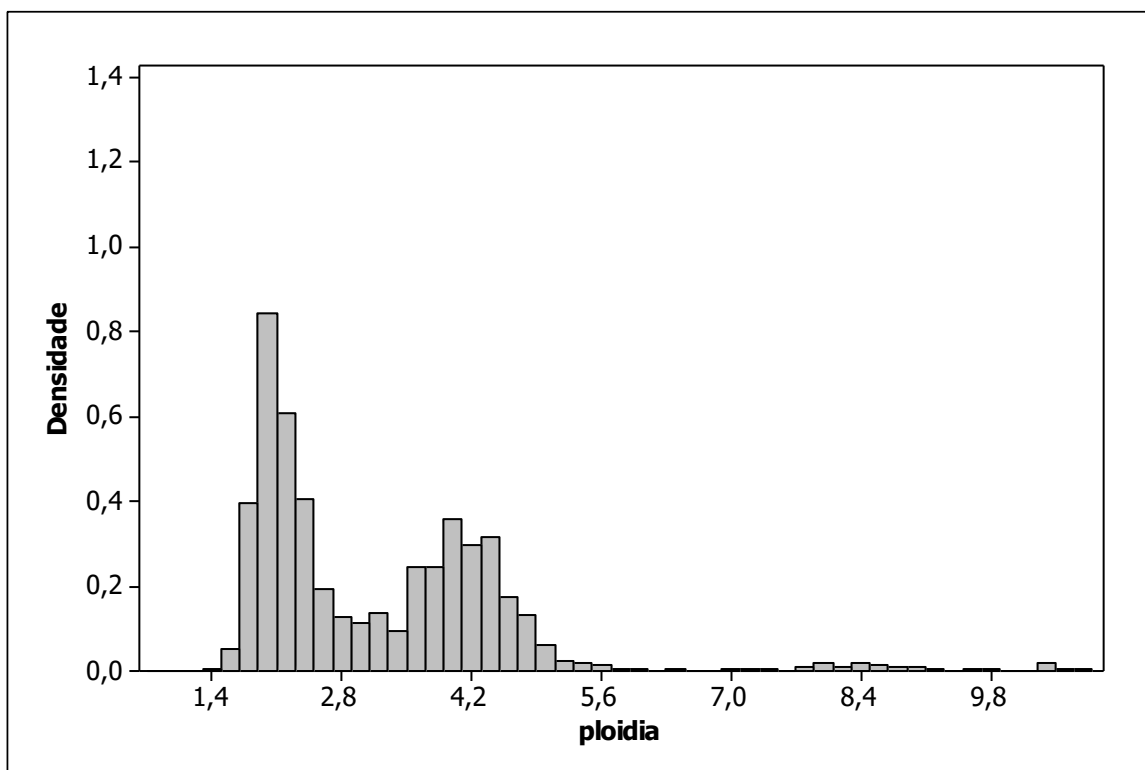
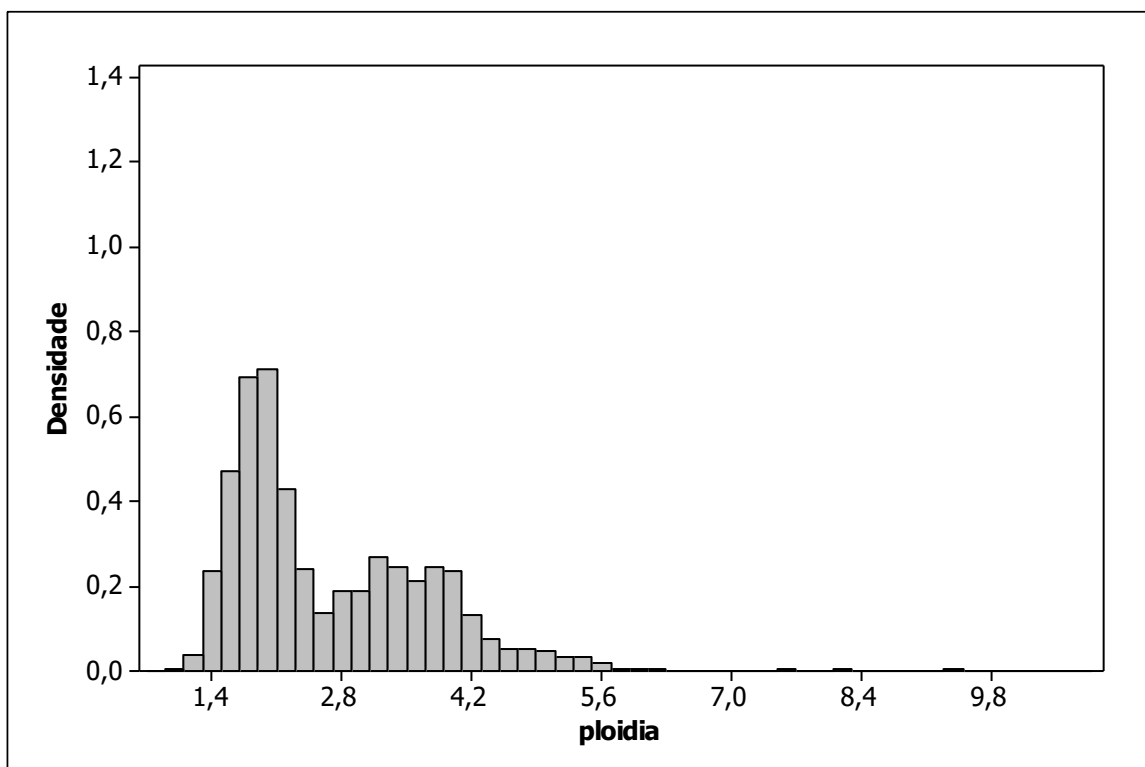
Gráfico B.5 Histograma da variável ploidia na linhagem Normal**Gráfico B.6** Histograma da variável ploidia na linhagem Moderada

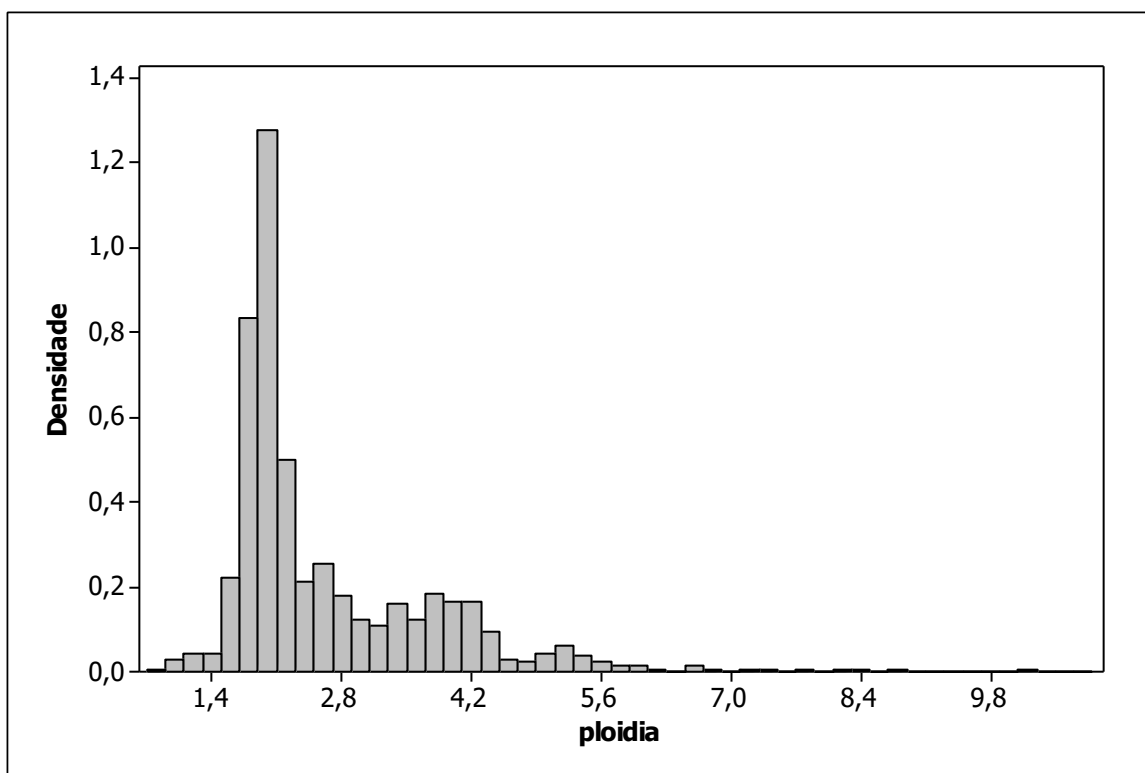
Gráfico B.7 Histograma da variável ploidia na linhagem Agressiva

Gráfico B.8 Histogramas da variável ploidia na linhagem Normal para cada tratamento

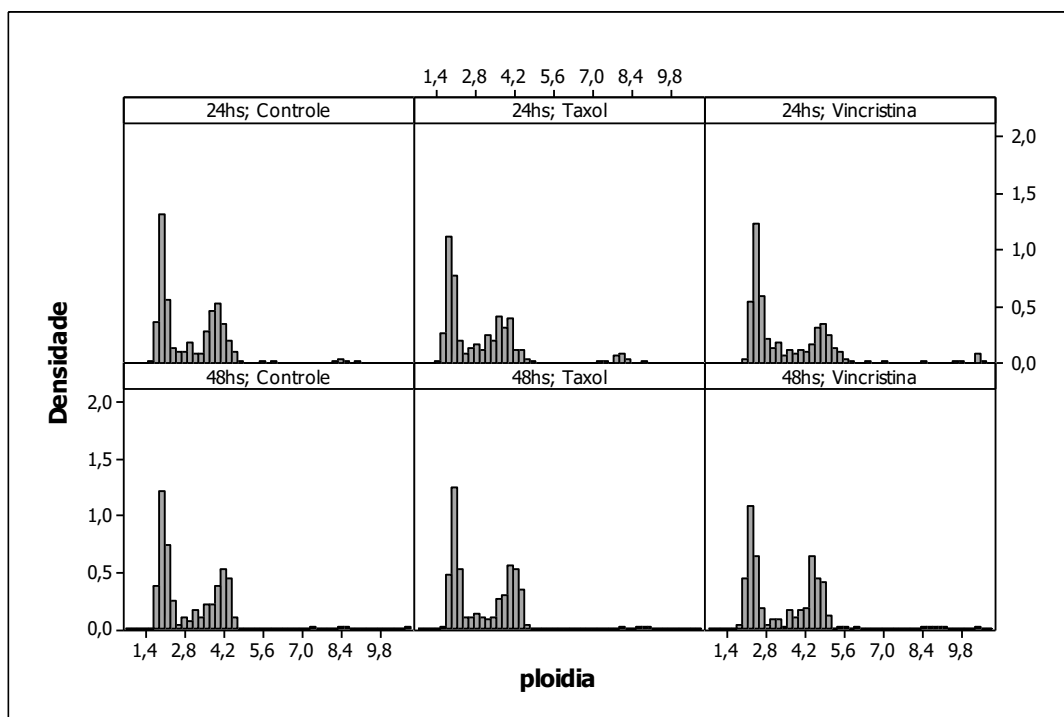


Gráfico B.9 Histogramas da variável ploidia na linhagem Moderada para cada tratamento

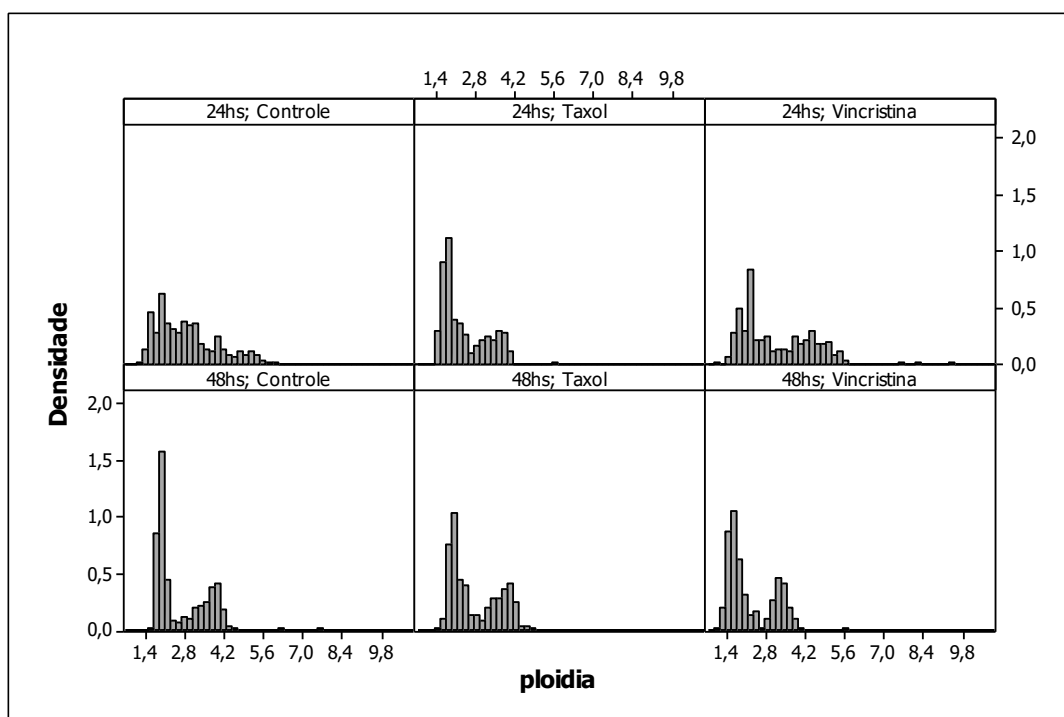


Gráfico B.10 Histogramas da variável ploidia na linhagem Agressiva para cada tratamento

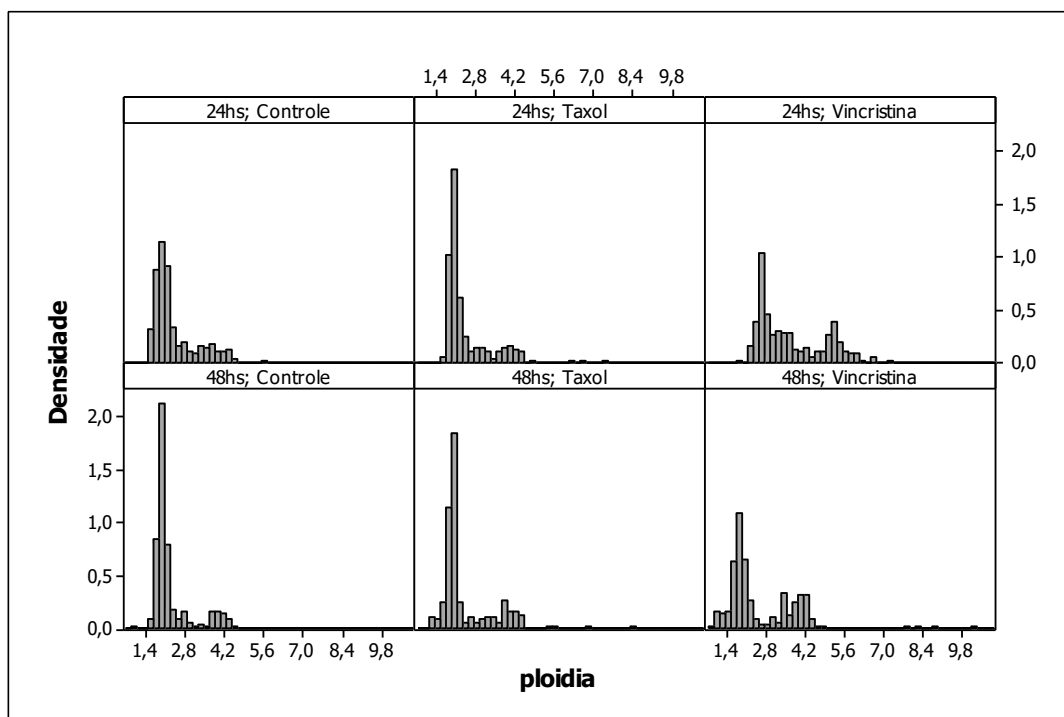


Gráfico B.11 Boxplots da variável ploidia na linhagem Normal para cada tratamento

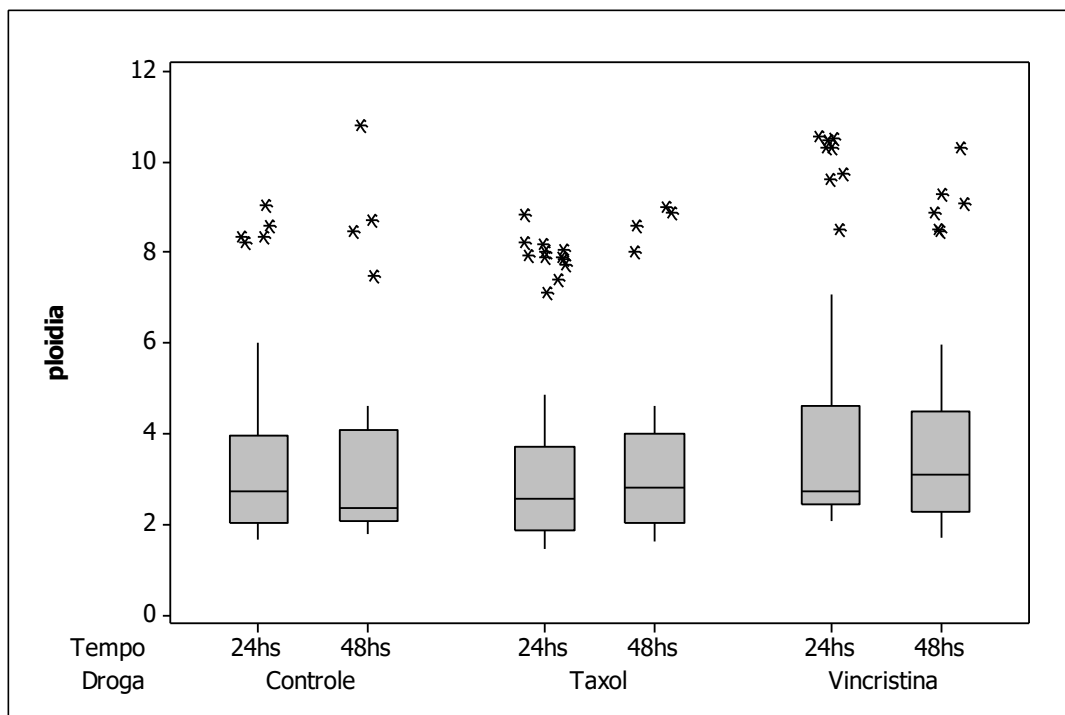


Gráfico B.12 Boxplots da variável ploidia na linhagem Moderada para cada tratamento

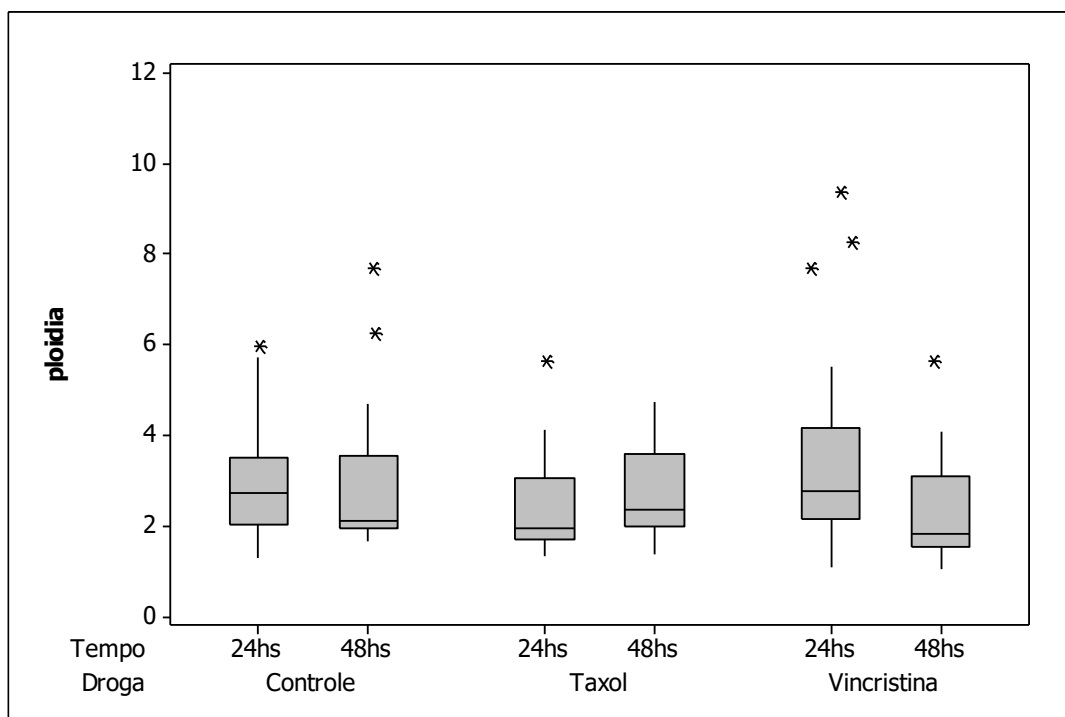


Gráfico B.13 Boxplots da variável ploidia na linhagem Agressiva para cada tratamento

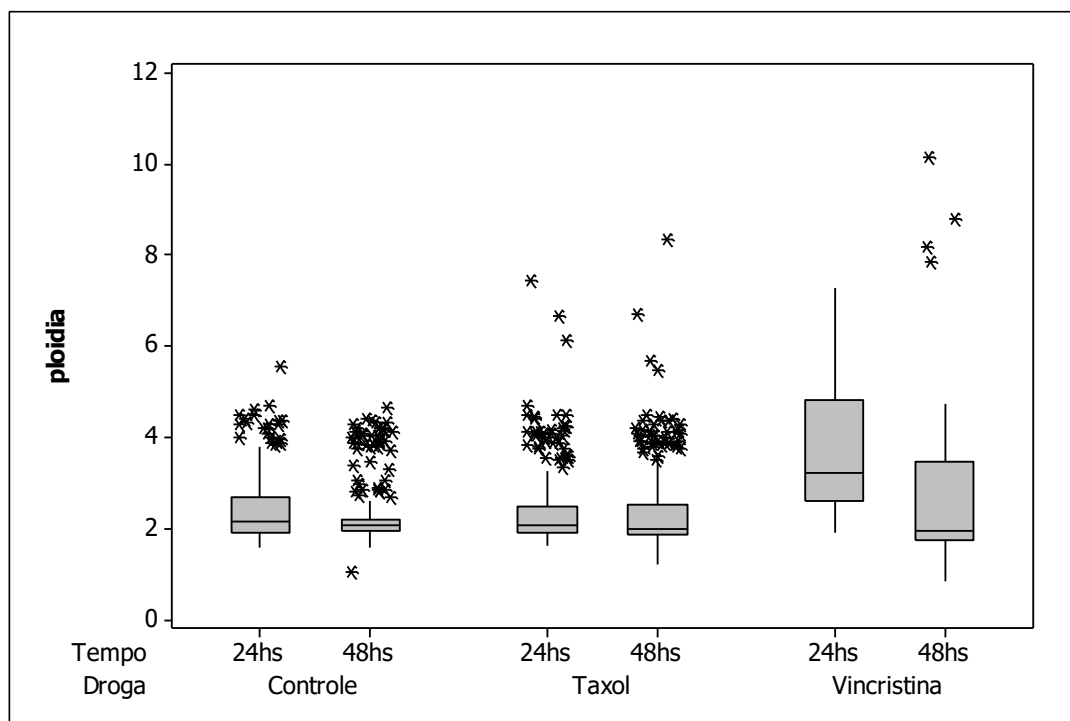


Gráfico B.14 Gráfico de barras com os percentuais das classes de ploidia na linhagem Normal e tempo 24 horas

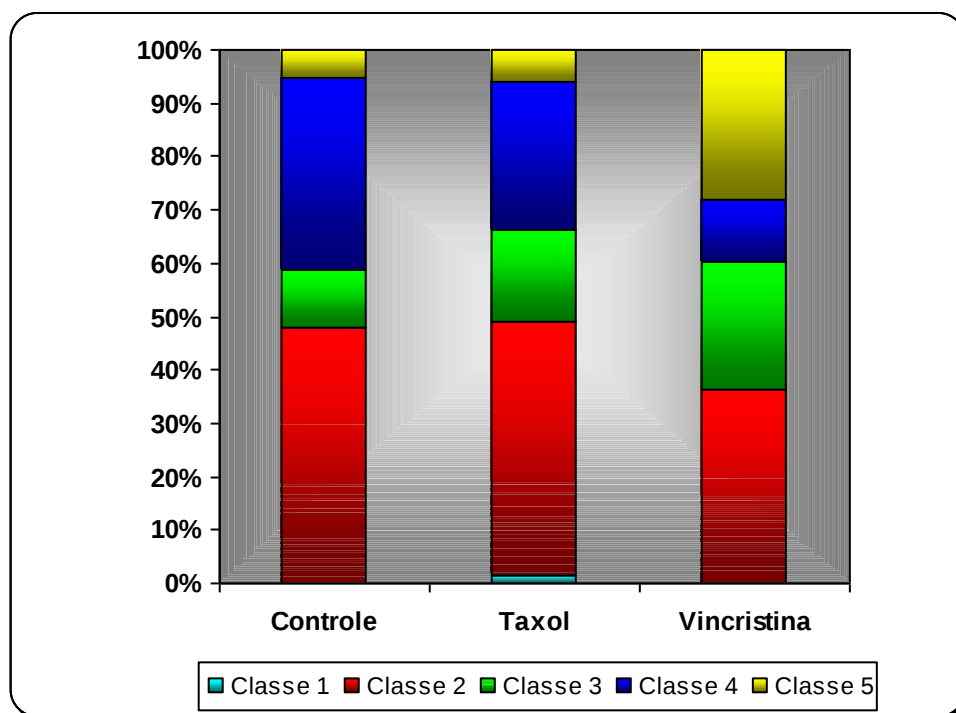


Gráfico B.15 Gráfico de barras com os percentuais das classes de ploidia na linhagem Normal e tempo 48 horas

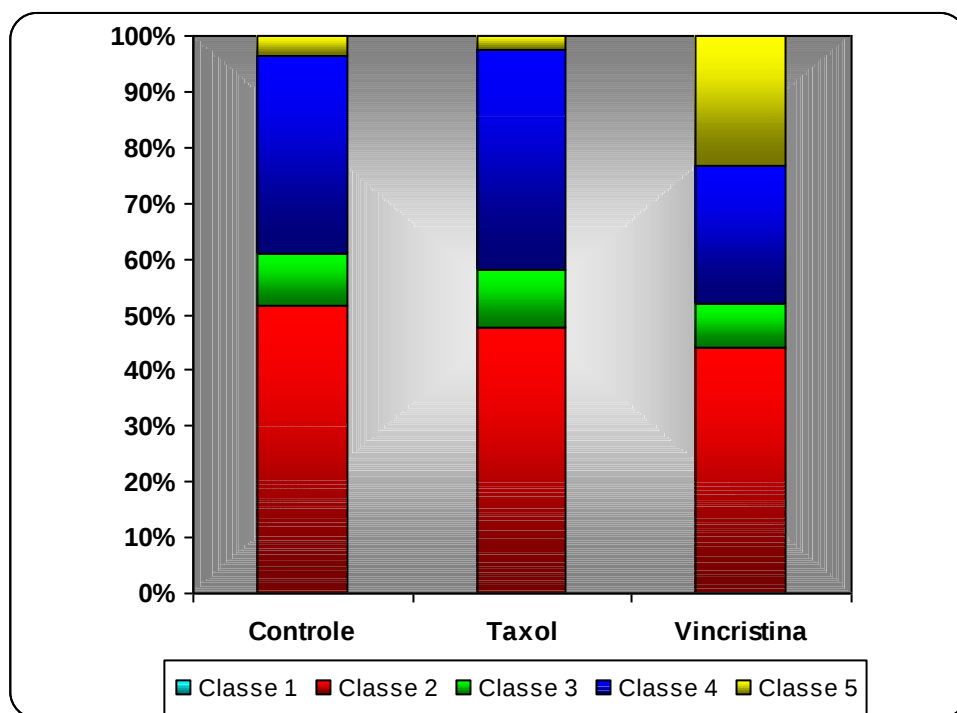


Gráfico B.16 Gráfico de barras com os percentuais das classes de ploidia na linhagem Moderada e tempo 24 horas

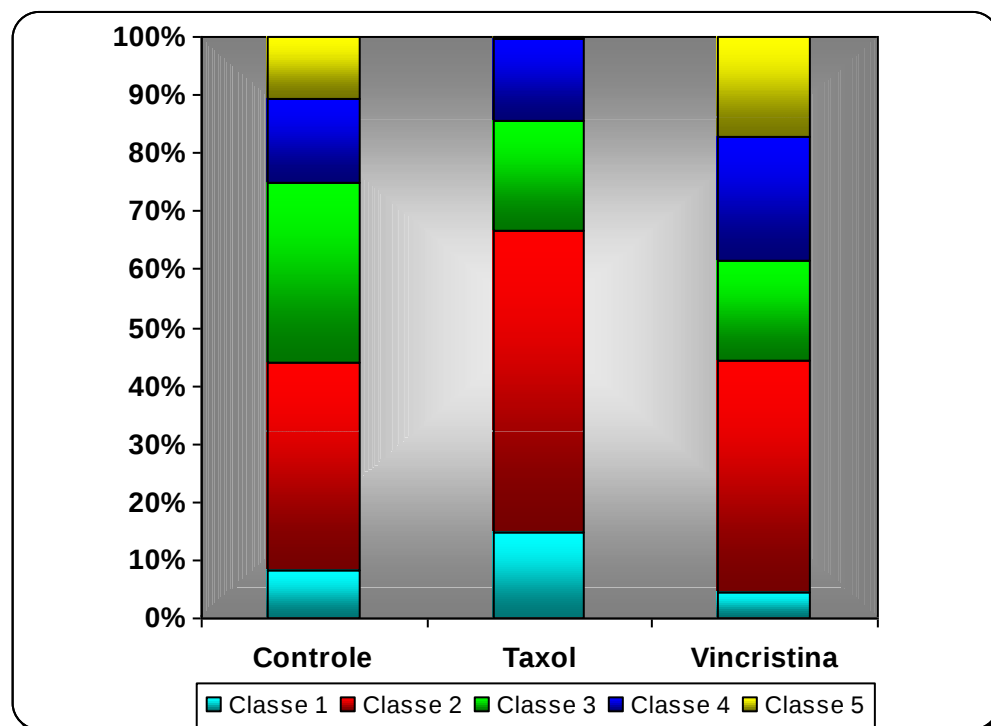


Gráfico B.17 Gráfico de barras com os percentuais das classes de ploidia na linhagem Moderada e tempo 48 horas

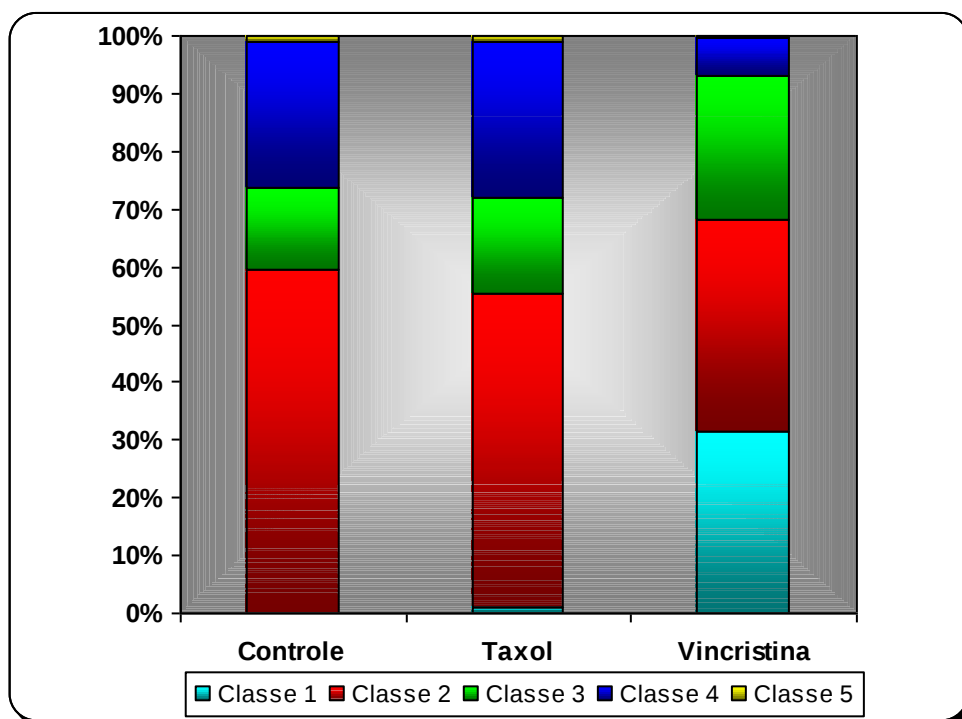


Gráfico B.18 Gráfico de barras com os percentuais das classes de ploidia na linhagem Agressiva e tempo 24 horas

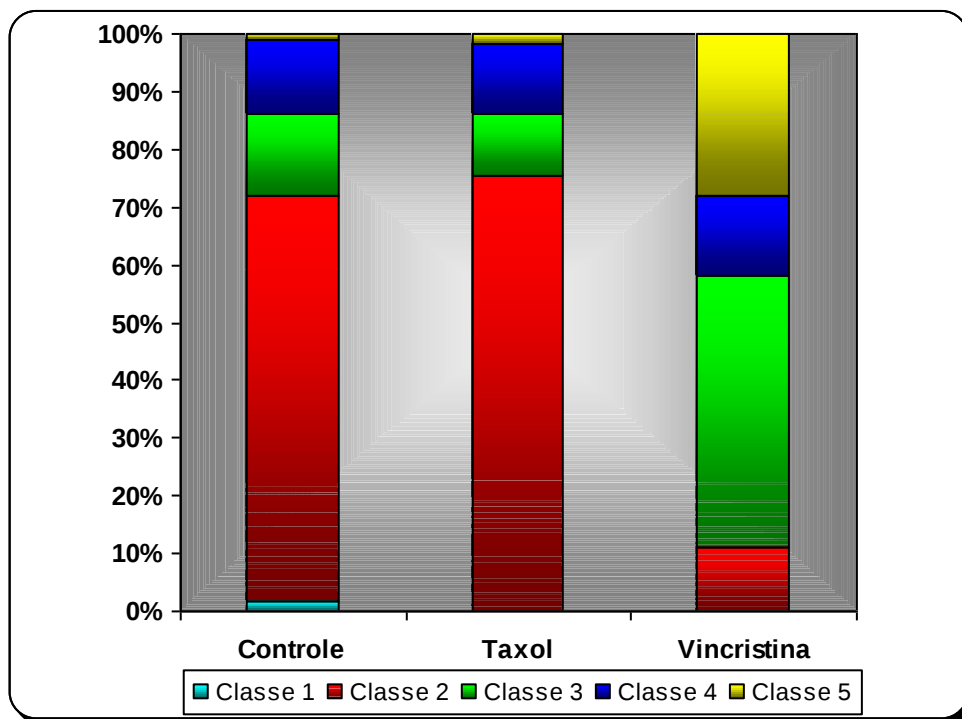


Gráfico B.19 Gráfico de barras com os percentuais das classes de ploidia na linhagem Agressiva e tempo 48 horas

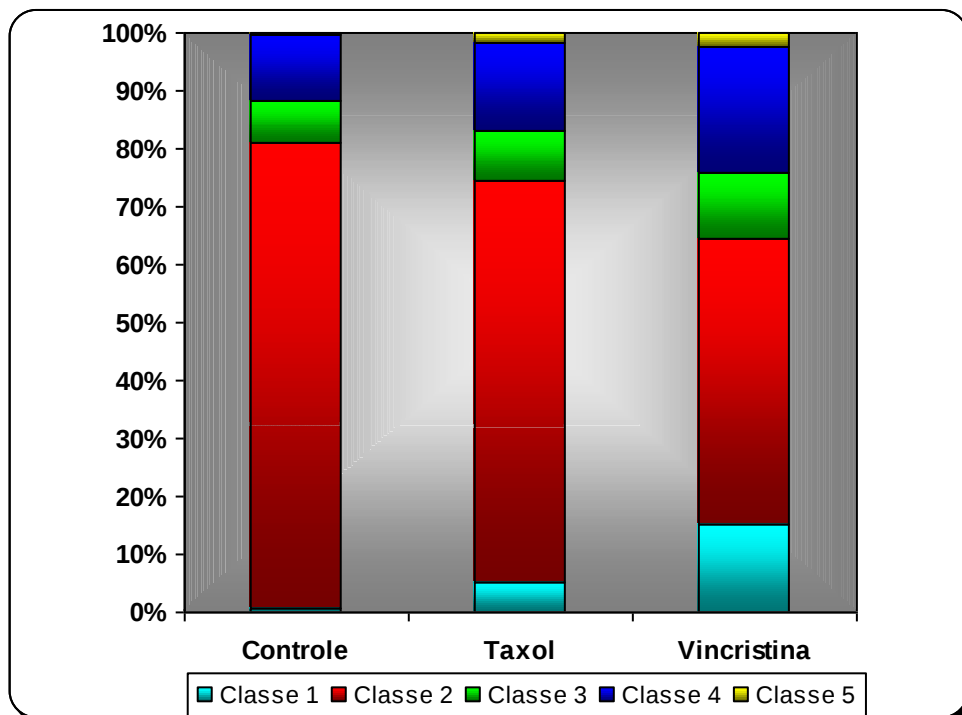


Gráfico B.20 Gráfico de perfis de classes médias de ploidia para linhagem Normal

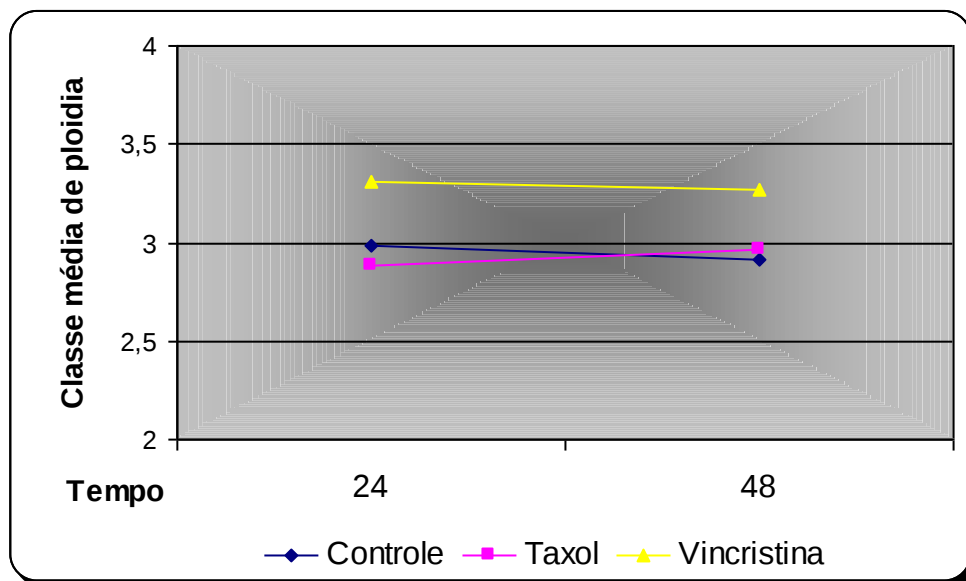


Gráfico B.21 Gráfico de perfis de classes médias de ploidia para linhagem Moderada

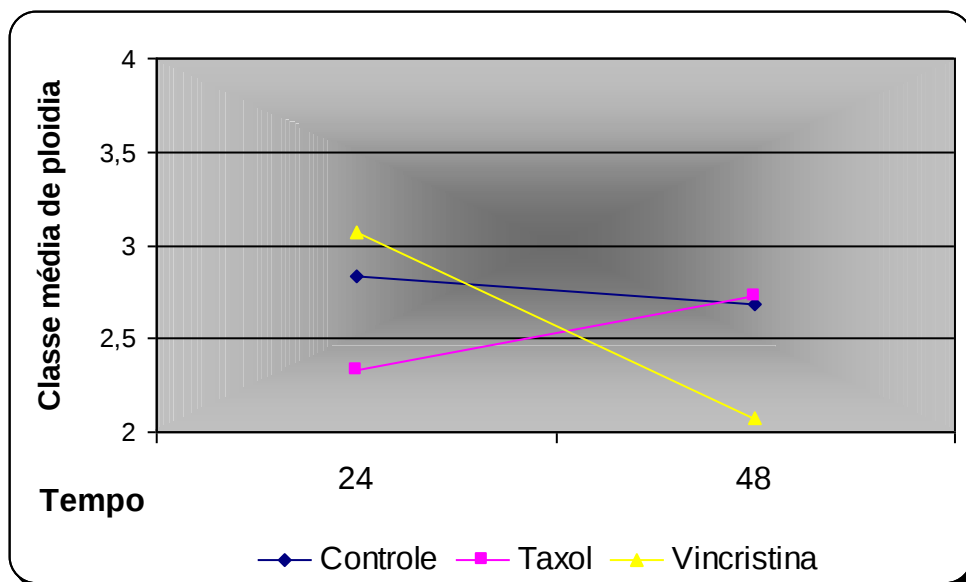


Gráfico B.22 Gráfico de perfis de classes médias de ploidia para linhagem Agressiva

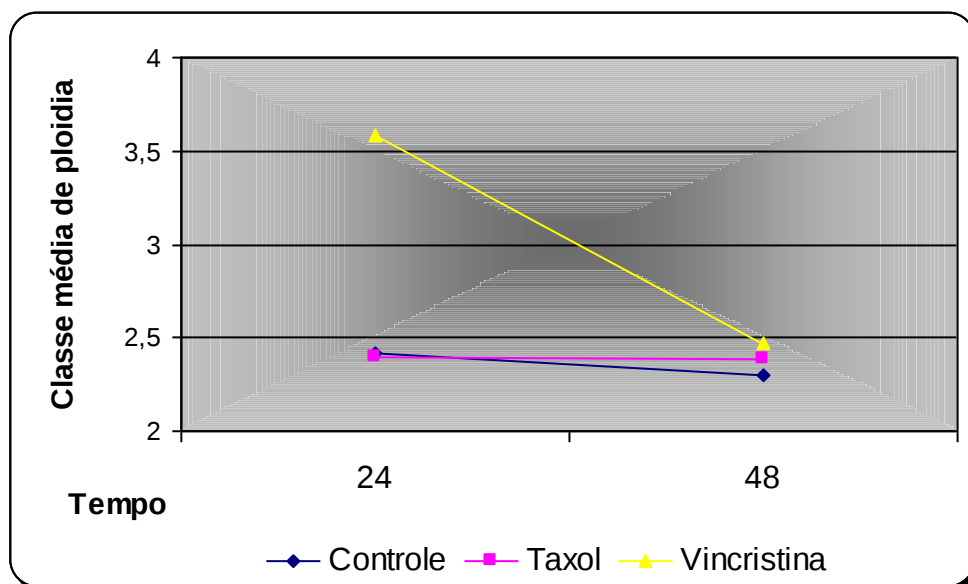


Gráfico B.23 Gráfico de perfis dos logaritmos das chances da classe 3 com relação à classe 2 para linhagem Normal

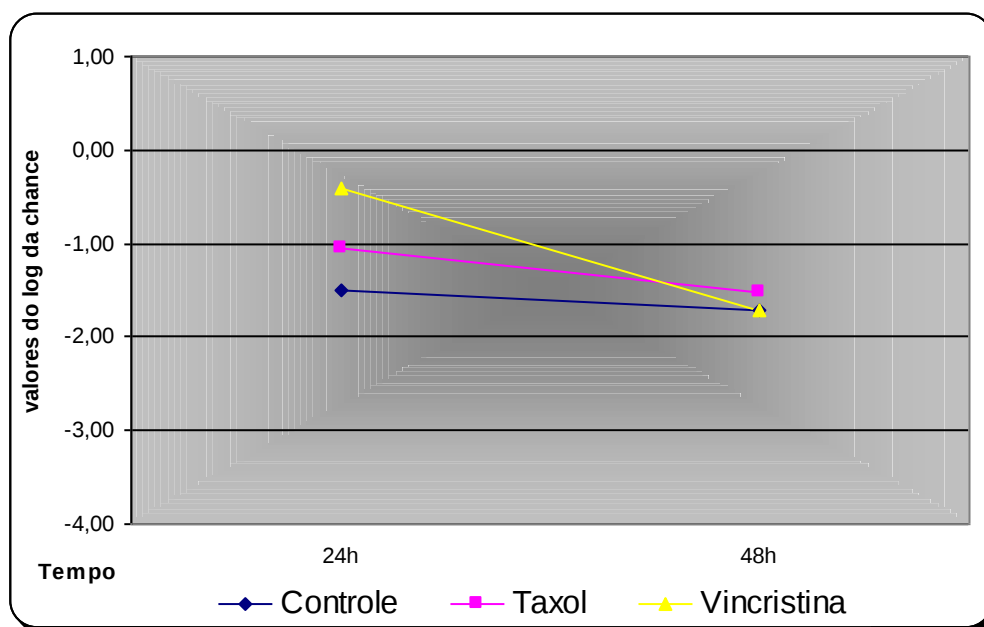


Gráfico B.24 Gráfico de perfis dos logaritmos das chances da classe 4 com relação à classe 2 para linhagem Normal

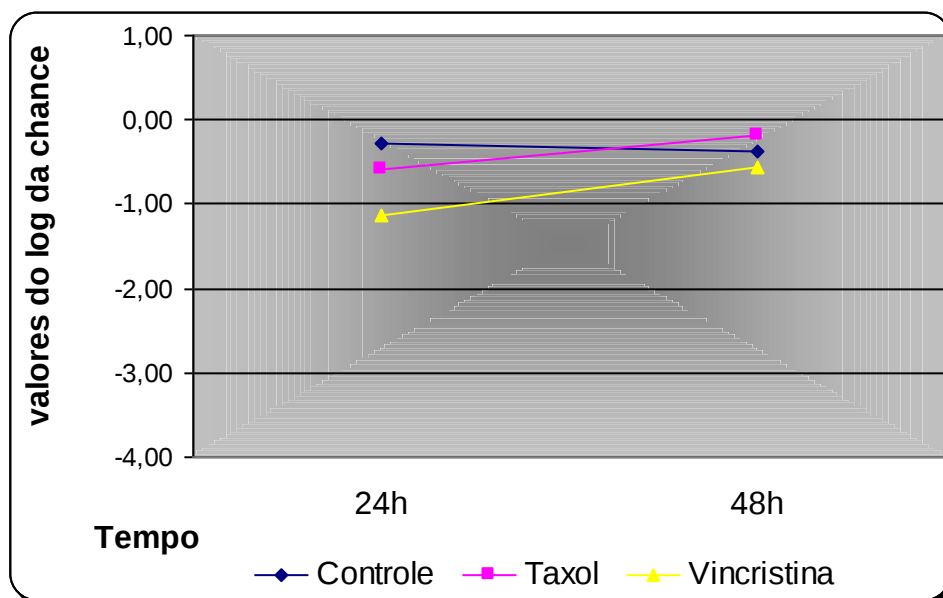


Gráfico B.25 Gráfico de perfis dos logaritmos das chances da classe 5 com relação à classe 2 para linhagem Normal

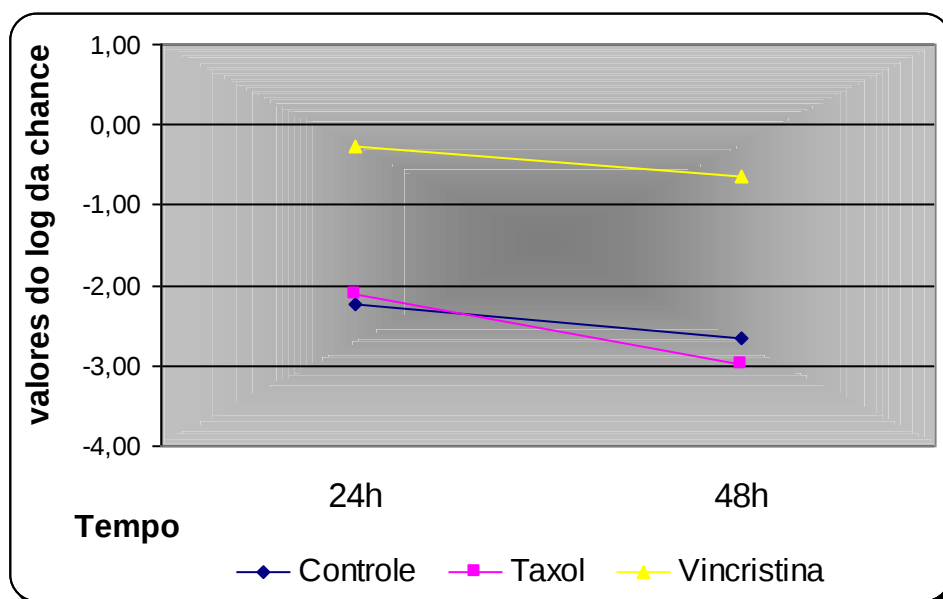


Gráfico B.26 Gráfico de perfis dos logaritmos das chances da classe 3 com relação à classe 2 para linhagem Moderada

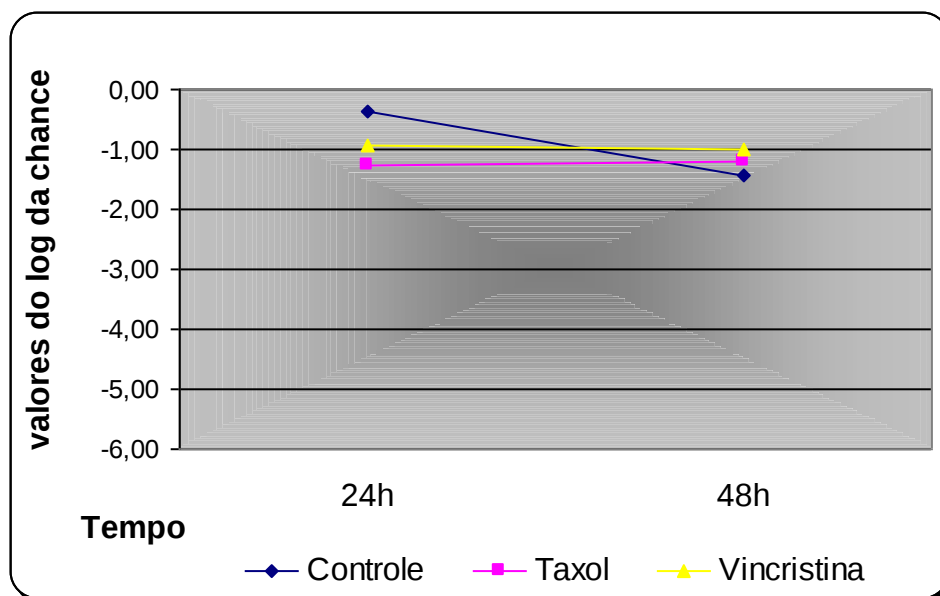


Gráfico B.27 Gráfico de perfis dos logaritmos das chances da classe 4 com relação à classe 2 para linhagem Moderada

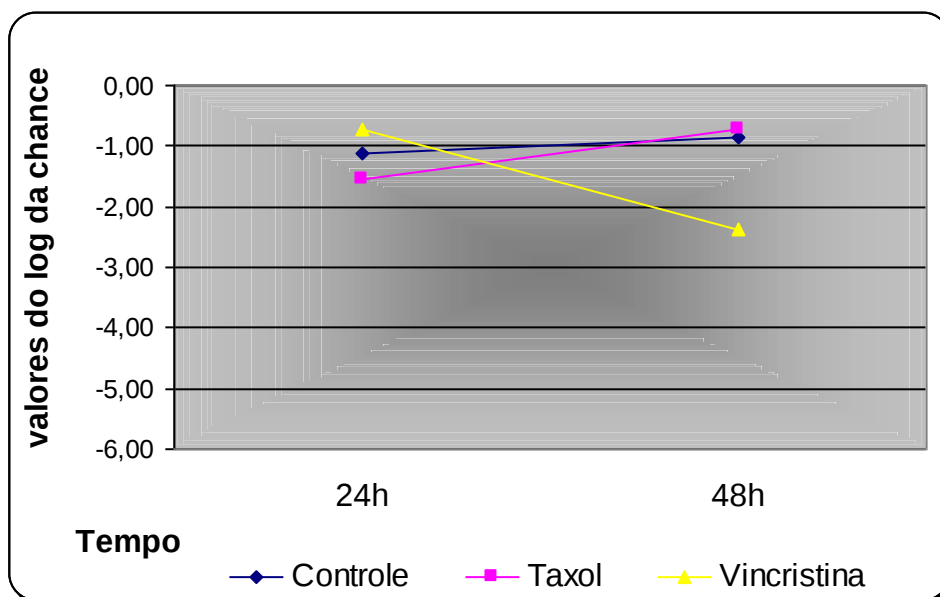


Gráfico B.28 Gráfico de perfis dos logaritmos das chances da classe 5 com relação à classe 2 para linhagem Moderada

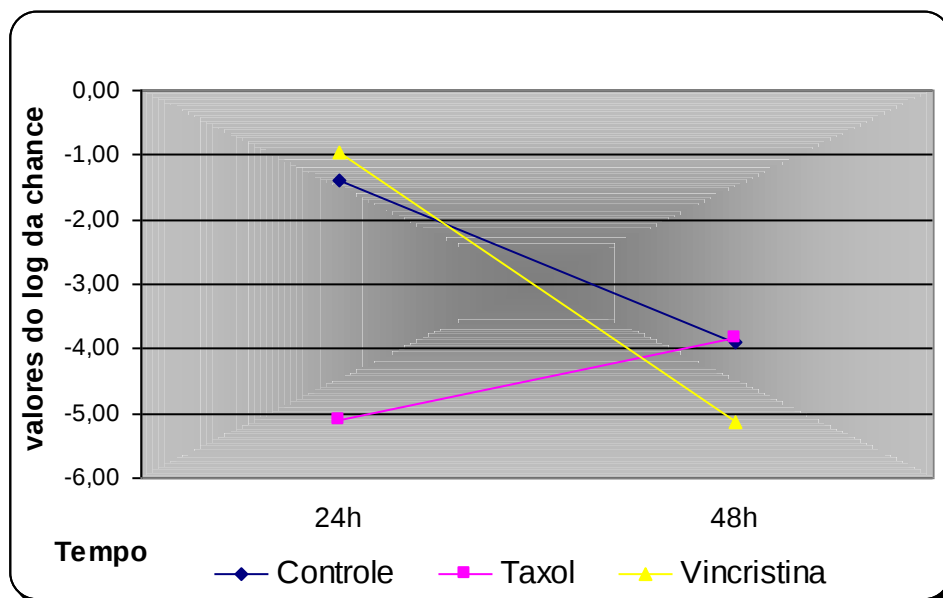


Gráfico B.29 Gráfico de perfis dos logaritmos das chances da classe 3 com relação à classe 2 para linhagem Agressiva

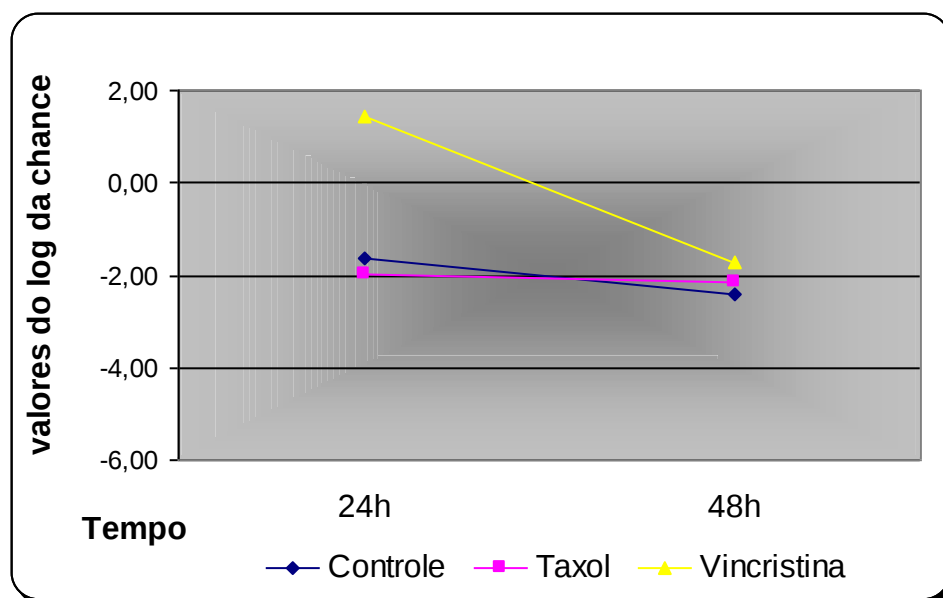


Gráfico B.30 Gráfico de perfis dos logaritmos das chances da classe 4 com relação à classe 2 para linhagem Agressiva

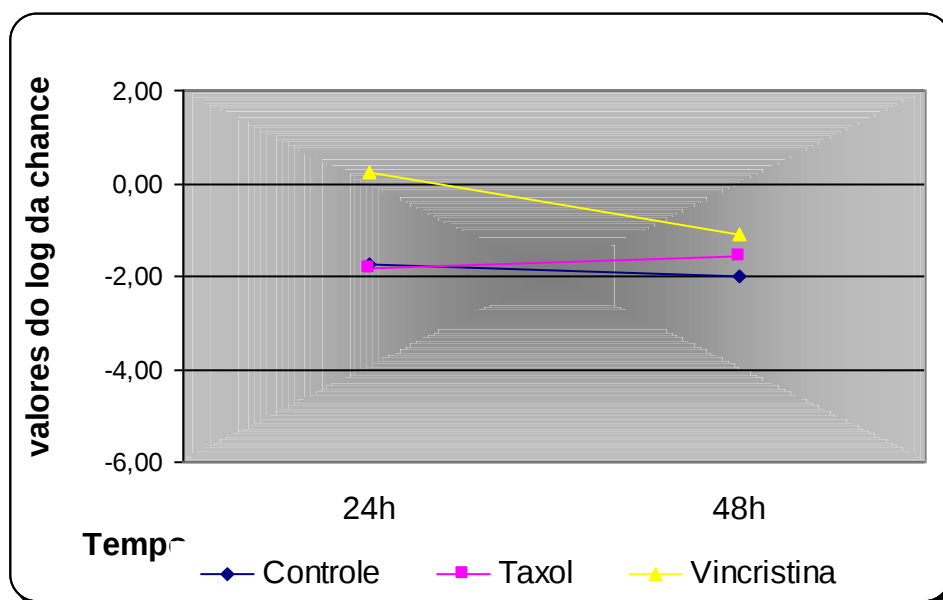
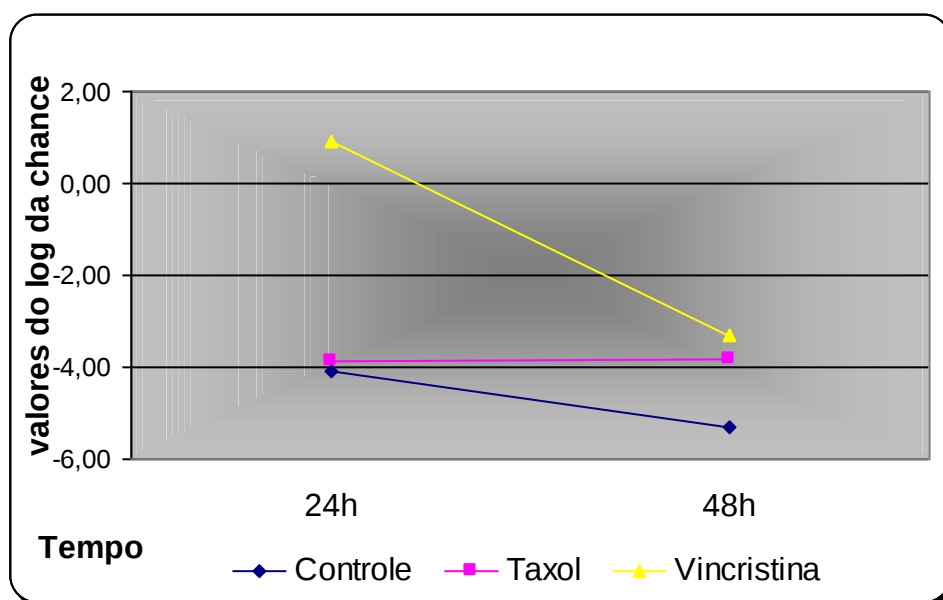


Gráfico B.31 Gráfico de perfis dos logaritmos das chances da classe 5 com relação à classe 2 para linhagem Agressiva



APÊNDICE C

MODELOS

Os ajustes realizados para cada uma das 3 linhagens consideraram nível de significância de 0,05 e respeitaram o seguinte procedimento:

Inicialmente foi ajustado o modelo saturado (que inclui os efeitos de todos os fatores e suas possíveis interações) correspondente. Após este ajuste foram retiradas do modelo as interações não significativas. Os parâmetros referentes aos efeitos principais só foram retirados do modelo caso não existisse nenhuma interação significativa no qual este estivesse presente. Foi ajustado então um modelo reduzido contendo apenas os parâmetros restantes e seguiu-se com o procedimento até que nenhum parâmetro pudesse ser retirado do modelo. O modelo mais reduzido que se ajustou aos dados foi o modelo adotado para a análise. O método utilizado para estimar os parâmetros dos modelos foi o de máxima verossimilhança, vide Paulino e Singer (2006).

Para a linhagem moderada não foi possível obter nenhuma redução nos parâmetros envolvidos e o modelo saturado foi usado na análise dos efeitos dos fatores.

Todos os modelos funcionais lineares ajustados utilizaram a parametrização casela de referência. Nos 3 modelos as caselas de referência foram os tratamentos Controle no nível 24 horas do fator tempo.

Os modelos funcionais ajustados podem ser descritos da seguinte forma:

$$F(\pi_{ijk}) = \underset{\sim}{X} \underset{\sim}{\beta} \text{ com } \underset{\sim}{\beta} = [\beta_1 \ \beta_2 \ \beta_3 \ \beta_4 \ \beta_5 \ \beta_6]^t ,$$

onde,

$$\underset{\sim}{F}(\pi_{ijk}) = \begin{bmatrix} 0,75 \cdot \pi_{111} + 2,0 \cdot \pi_{112} + 3,0 \cdot \pi_{113} + 4,0 \cdot \pi_{114} + 5,25 \cdot \pi_{115} \\ 0,75 \cdot \pi_{121} + 2,0 \cdot \pi_{122} + 3,0 \cdot \pi_{123} + 4,0 \cdot \pi_{124} + 5,25 \cdot \pi_{125} \\ \dots \\ 0,75 \cdot \pi_{231} + 2,0 \cdot \pi_{232} + 3,0 \cdot \pi_{233} + 4,0 \cdot \pi_{234} + 5,25 \cdot \pi_{235} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mu_{11} \\ \mu_{12} \\ \mu_{13} \\ \mu_{21} \\ \mu_{22} \\ \mu_{23} \end{bmatrix} ;$$

$\underset{\sim}{X}$ é matriz de planejamento;

π_{ijk} é a probabilidade de, em uma amostra de células do nível i do fator tempo ($i=1$: 24h, $i=2$: 48h) e nível j do fator droga ($j=1$: Controle, $j=2$: Taxol, $j=3$: Vincristina), classificarmos a célula na classe k ($k = 1, 2, 3, 4, 5$);

μ_{ij} pode ser chamada de classe média de ploidia no tempo i e droga j ;

$\underset{\sim}{F}(\pi_{ij})$ é a função linear utilizada no modelo aplicada ao vetor de probabilidades;

β_1 é o valor esperado de ploidia para células da casela de referência, com $\beta_1 = \mu_{11}$;;

β_2 é o acréscimo no valor esperado de ploidia quando mudamos do nível 24 horas para 48 horas no fator tempo, com $\beta_2 = \mu_{21} - \mu_{11}$;

β_3 é o acréscimo no valor esperado de ploidia quando mudamos do nível Controle para o nível Taxol, tal que, $\beta_3 = \mu_{12} - \mu_{11}$;

β_4 é o acréscimo no valor esperado de ploidia quando mudamos do nível Controle para o nível Vincristina, tal que, $\beta_4 = \mu_{13} - \mu_{11}$;

β_5 é o efeito de interação entre nível 48 horas do fator tempo e nível Taxol do fator droga, com $\beta_5 = (\mu_{12} - \mu_{11}) - (\mu_{22} - \mu_{21})$;

β_6 é o efeito de interação entre nível 48 horas do fator tempo e nível Vincristina do fator droga, com $\beta_6 = (\mu_{13} - \mu_{11}) - (\mu_{23} - \mu_{21})$.

Os pesos utilizados na função linear $\tilde{F}$ foram escolhidos por serem os pontos médios de cada uma das 5 classes de ploidia. O peso 5,25 referente às células da classe 5 foi assim determinado por manter a mesma distância dos limites do intervalo utilizados na classe 1.

Os modelos log-lineares ajustados possuem a seguinte estrutura:

$$\tilde{A}^{\log} \left(\pi_{ijk} \right) = \tilde{X} \tilde{\beta} \text{ com } \tilde{\beta} = [\beta_1, \dots, \beta_{24}]^t,$$

$$\tilde{A}^{\log} \pi_{ijk} = \left[\log \left(\frac{\pi_{111}}{\pi_{113}} \right) \dots \log \left(\frac{\pi_{115}}{\pi_{113}} \right) \log \left(\frac{\pi_{121}}{\pi_{123}} \right) \dots \log \left(\frac{\pi_{125}}{\pi_{123}} \right) \dots \log \left(\frac{\pi_{231}}{\pi_{233}} \right) \dots \log \left(\frac{\pi_{235}}{\pi_{233}} \right) \right]^t,$$

$$\tilde{X} = \text{matriz de planejamento}$$

Através do ajuste destes modelos é possível estudar os efeitos dos fatores e suas interações com relação à classe 2 (classe 1 + classe 2, originais) nas 4 classes restantes.

Detalhes sobre os modelos funcionais lineares e log-lineares adotados na análise de dados categorizados podem ser encontrados, por exemplo, em Paulino e Singer (2006).

