

Item b

Primeiramente, aplicaremos a PERMANOVA usando o pacote **adonis2** para as 3 situações:

- Situação 1: 12 variáveis dependentes (os 8 genes e os 4 miRNAs) e 1 variável independente (classificação dos grupos DS, FC, e CB).
- Situação 2: 8 variáveis dependentes (os 8 genes) e 1 variável independente (a classificação dos os grupos: DS, FC, e CB).
- Situação 3: 4 variáveis dependentes (os 4 miRNAs) e 1 variável independente (a classificação dos grupos: DS, FC, e CB).

Adotaremos um nível de significância $\alpha = 0.05$.

Abaixo, mostramos as saídas da PERMANOVA para as 3 situações, respectivamente.

Tabela 13: PERMANOVA para a situação 1

	Df	SumOfSqs	R2	F	Pr(>F)
Model	2	171.6775	0.1909	8.1379	0.001
Residual	69	727.8141	0.8091	NA	NA
Total	71	899.4916	1.0000	NA	NA

Tabela 14: PERMANOVA para a situação 2

	Df	SumOfSqs	R2	F	Pr(>F)
Model	2	83.7435	0.1358	5.4194	0.002
Residual	69	533.1174	0.8642	NA	NA
Total	71	616.8608	1.0000	NA	NA

Tabela 15: PERMANOVA para a situação 3

	Df	SumOfSqs	R2	F	Pr(>F)
Model	2	87.9340	0.3111	15.5818	0.001
Residual	69	194.6968	0.6889	NA	NA
Total	71	282.6308	1.0000	NA	NA

No teste, a hipótese nula é de igualdade dos grupos por variável dependente (a depender das 3 situações acima mencionadas), para todas variáveis dependentes.

Para as 3 situações, a um nível de significância α , há evidências para rejeitar a hipótese nula, ou seja, caso considerarmos um espaço de hipóteses fechado, há evidências de que existe diferença em pelo menos um grupo dentro de uma variável dependente, pelo menos em uma variável dependente.

Aplicaremos testes post hoc para entendermos quais grupos diferem, em especial, o post hoc de Bonferroni. Usaremos a função **pairwise.adonis**.

Abaixo, mostramos as saídas do post hoc para as 3 situações, respectivamente.

Tabela 16: Post Hoc para a situação 1

pairs	Df	SumsOfSqs	F.Model	R2	p.value	p.adjusted	sig
FC vs CB	1	127.6318	11.1454	0.1524	0.001	0.003	*
FC vs DS	1	44.8480	8.2711	0.1287	0.001	0.003	*
CB vs DS	1	72.3255	3.2727	0.1406	0.005	0.015	.

Tabela 17: Post Hoc para a situação 2

pairs	Df	SumsOfSqs	F.Model	R2	p.value	p.adjusted	sig
FC vs CB	1	59.8248	7.0551	0.1022	0.001	0.003	*
FC vs DS	1	22.6261	6.1441	0.0989	0.004	0.012	.
CB vs DS	1	40.3831	2.4162	0.1078	0.055	0.165	.

Tabela 18: Post Hoc para a situação 3

pairs	Df	SumsOfSqs	F.Model	R2	p.value	p.adjusted	sig
FC vs CB	1	67.8070	22.8164	0.2690	0.001	0.003	*
FC vs DS	1	22.2219	12.7739	0.1857	0.001	0.003	*
CB vs DS	1	31.9424	5.9307	0.2287	0.007	0.021	.

Para a situação 1 (Tabela 16) as comparações entre os pares FC vs CB (valor-p = 0.001, valor-p ajustado = 0.003), FC vs DS (valor-p = 0.001, valor-p ajustado = 0.003) e CB vs DS (valor-p = 0.005, valor-p ajustado = 0.015) foram todas significativas estaticamente, portanto havendo evidências de que os grupos apresentam diferenças entre si.

Para a situação 2 (Tabela 17) as comparações entre os pares FC vs CB (valor-p = 0.001, valor-p ajustado = 0.003) e FC vs DS (valor-p = 0.004, valor-p ajustado = 0.012) foram significativas estaticamente, portanto havendo evidências de que o grupo FC difere de CB e que o grupo FC difere de DS. A comparação CB vs DS (valor-p = 0.055, valor-p ajustado = 0.165) não foi estatisticamente significativa, não havendo evidências para rejeitar que os grupos CB e DS possuam igualdades.

Para a situação 3 (Tabela 18) as comparações entre os pares FC vs CB (valor-p = 0.001, valor-p ajustado = 0.003), FC vs DS (valor-p = 0.001, valor-p ajustado = 0.003) e CB vs DS (valor-p = 0.007, valor-p ajustado = 0.021) foram todas significativas estaticamente, portanto havendo evidências de que os grupos apresentam diferenças entre si.

Adicionalmente, iremos aplicar os testes **nonpartest** sobre os dados. É uma coleção de testes não-paramétricos multivariados, que, especialmente, tem uma interpretação bem mais fácil do que o **adonis**: adquire-se o efeito de tratamento “k” caso o que pode ser definido como a probabilidade de que um sujeito escolhido aleatoriamente do tratamento “k”, que neste estudo não é outra coisa que o grupo, exiba um nível de expressão mais alto do que um sujeito escolhido aleatoriamente de qualquer um dos grupos de tratamento, incluindo o tratamento “k”. Essa probabilidade é mostrada nas tabelas ‘releffects’ a seguir.

Abaixo, mostramos as saídas do **nonpartest** para as 3 situações, respectivamente, com 2 tabelas por situação.

Tabela 19: Tabela ‘results’: nonpartest para a situação 1

	Test Statistic	df1	df2	P- value	Permutation Test p-value
ANOVA type test p-value	18.244	8.815	165.1599	0	0
McKeon approx. for the Lawley	14.140	24.000	96.4111	0	0
Hotelling Test					
Muller approx. for the	9.261	24.972	121.0743	0	0
Bartlett-Nanda-Pillai Test					
Wilks Lambda	11.589	24.000	116.0000	0	0

Tabela 20: Tabela ‘releffects’: nonpartest para a situação 1

	TP53	CDK	PTEN	MDM4	MYB	SHIP	EIF4	CEBPB	155	150	34a	175p
CB	0.2297	0.6508	0.2455	0.6419	0.6369	0.5719	0.7748	0.2932	0.8492	0.5293	0.8214	0.3229
DS	0.6927	0.6701	0.8889	0.8941	0.2457	0.6155	0.8246	0.6450	0.6163	0.8724	0.4774	0.1337
FC	0.5449	0.4306	0.5090	0.3972	0.5024	0.4614	0.3711	0.5347	0.3836	0.4322	0.4136	0.6082

Obs: a Tabela 20 tem alguns nomes de coluna alterados para a visualização. A 2ª coluna corresponde ao gene CDKN1A e as últimas 4 colunas correspondem aos miRNAs, respectivamente: miR_155, miR_150, miR_34a, miR_17_5p

Tabela 21: Tabela ‘results’: nonpartest para a situação 2

	Test Statistic	df1	df2	P- value	Permutation Test p-value
ANOVA type test p-value	16.570	6.695	125.4337	0	0
McKeon approx. for the Lawley	14.084	16.000	97.9292	0	0
Hotelling Test					
Muller approx. for the	10.584	16.666	129.4215	0	0
Bartlett-Nanda-Pillai Test					
Wilks Lambda	12.325	16.000	124.0000	0	0

Tabela 22: Tabela ‘releffects’: nonpartest para a situação 2

	TP53	CDKN1A	PTEN	MDM4	MYB	SHIP	EIF4	CEBPB
CB	0.2297	0.6508	0.2455	0.6419	0.6369	0.5719	0.7748	0.2932
DS	0.6927	0.6701	0.8889	0.8941	0.2457	0.6155	0.8246	0.6450
FC	0.5449	0.4306	0.5090	0.3972	0.5024	0.4614	0.3711	0.5347

Tabela 23: Tabela ‘results’: nonpartest para a situação 3

	Test Statistic	df1	df2	P- value	Permutation Test p-value
ANOVA type test p-value	22.258	6.658	124.7402	0	0
McKeon approx. for the Lawley	13.118	8.000	91.9913	0	0
Hotelling Test					
Muller approx. for the	11.879	8.341	137.7690	0	0
Bartlett-Nanda-Pillai Test					
Wilks Lambda	12.542	8.000	132.0000	0	0

Tabela 24: Tabela ‘releffects’: nonpartest para a situação 3

	miR_155	miR_150	miR_34a	miR_17_5p
CB	0.8492	0.5293	0.8214	0.3229
DS	0.6163	0.8724	0.4774	0.1337
FC	0.3836	0.4322	0.4136	0.6082

Ao olhar a Tabela 19, a Tabela 21 e a Tabela 23, podemos perceber que em todas as situações o valor-p e o valor-p de permutação foram iguais a 0 entre os grupos, para todos os testes multivariados de igualdade de grupos. Ou seja, nas 1000 permutações, nenhuma contribuiu para H_0 .

Se desejarmos, podemos também analisar a Tabela 20, a Tabela 22 e a Tabela 24 para avaliar os efeitos relativos entre cada variável dependente e seus grupos. Acreditamos que os testes anteriores já são suficientes.

Conclusão: Foi possível verificar que as expressões dos genes e dos miRNAs apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados.