

**CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA - CEA - USP**  
**RELATÓRIO DE CONSULTA**

**TÍTULO DO PROJETO:** "Expressão de TGF $\beta$  e de seus receptores e sua ação sobre ciclinas G1 no epitélio gástrico de ratos com proliferação celular estimulada ou inibida".

**PESQUISADORA:** Luciana R. Jordão

**ORIENTADORAS:** Eliana P. Alvares  
Patrícia Gama

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

**FINALIDADE:** Mestrado

**PARTICIPANTES DA ENTREVISTA:** Carlos Alberto de Bragança Pereira  
Julio da Motta Singer  
Luciana R. Jordão  
Eliana P. Alvares  
Patrícia Gama  
Frederico Zanqueta Poletto  
Simone Curti

**DATA:** 20/08/2002

**FINALIDADE DA CONSULTA:** Assessoria na análise do experimento.

**RELATÓRIO ELABORADO POR:** Frederico Zanqueta Poletto  
Simone Curti

## **1. Introdução**

A proliferação celular do epitélio é estimulada nos ratos lactentes e inibida nos adultos. Essa proliferação pode ser influenciada por fatores de crescimento (como as proteínas do grupo TGF $\beta$ ), que são essenciais durante todo o desenvolvimento embrionário e participam da manutenção da integridade da mucosa no adulto.

O objetivo do estudo é avaliar a expressão das proteínas TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 e TGF $\beta$ 3, e seus receptores T $\beta$ RI, T $\beta$ RII e T $\beta$ RIII no epitélio gástrico de ratos alimentados ou em jejum, lactentes ou adultos.

## **2. Descrição do experimento e das variáveis**

Três ratos Wistar formaram cada um dos 4 grupos experimentais (alimentado lactente, jejum lactente, alimentado adulto e jejum adulto), sendo que os lactentes são ratos com 14 dias de vida, os adultos com 60, os em jejum ficaram sem alimentação em suas 16 últimas horas de vida, para os lactentes, e 30 para os adultos.

Os ratos foram anestesiados. Fragmentos do estômago foram lavados em solução fisiológica 0,9%, fixados em paraformaldeído 4,0% por 6 a 8 horas, incluídos em parafina e em seguida submetidos a 2 a 3 cortes de 5  $\mu$ m. Os cortes foram desparafinizados e hidratados.

Dez glândulas foram retiradas para cada proteína e três observadores, independentemente, contaram o número de células com expressão da proteína fraca ou forte da mucosa superficial, parietal do colo, parietal da base e principal (ziruogênica).

O experimento foi realizado de forma que os observadores não sabiam se os ratos estavam sendo alimentados ou em jejum.

## **3. Situação do projeto**

A proteína TGF $\beta$ 1 já foi avaliada e as outras estão em fase de coleta de dados.

#### 4. Sugestões do CEA

Para cada tipo de célula (mucosa superficial, parietal do colo, parietal da base e principal), recomendamos armazenar no Excel os dados obtidos da proteína TGFβ1 com a estrutura ilustrada na Tabela 1.

**Tabela 1:** Número de células da mucosa superficial (dados fictícios)

Id	Alimentacao	Idade	Rato	Glandula	Forte-O1	Forte-O2	Forte-O3	Fraca-O1	Fraca-O2	Fraca-O3	PorcForte-O1	PorcForte-O2	PorcForte-O3	PorcMForte
1	Jejum	Lactente	1	1	46	55	52	86	94	86	0,348	0,369	0,377	0,365
1	Jejum	Lactente	1	2	86	92	85	0	8	3	1,000	0,920	0,966	0,962
1	Jejum	Lactente	1	10	45	52	47	72	80	80	0,385	0,394	0,370	0,383
2	Jejum	Lactente	2	1	46	55	51	48	53	45	0,489	0,509	0,531	0,510
2	Jejum	Lactente	2	2	78	79	78	24	28	24	0,765	0,738	0,765	0,756
2	Jejum	Lactente	2	10	41	49	47	89	91	88	0,315	0,350	0,348	0,338
3	Jejum	Lactente	3	1	27	37	33	28	32	23	0,491	0,536	0,589	0,539
3	Jejum	Lactente	3	2	59	65	63	35	43	39	0,628	0,602	0,618	0,616
3	Jejum	Lactente	3	10	99	106	98	61	68	59	0,619	0,609	0,624	0,617
4	Alimentado	Lactente	1	1	58	60	50	19	21	17	0,753	0,741	0,746	0,747
4	Alimentado	Lactente	1	2	86	89	84	37	44	35	0,699	0,669	0,706	0,691
4	Alimentado	Lactente	1	10	98	107	105	34	38	30	0,742	0,738	0,778	0,753
5	Alimentado	Lactente	2	1	27	28	27	69	70	64	0,281	0,286	0,297	0,288
5	Alimentado	Lactente	2	2	88	91	90	25	35	31	0,779	0,722	0,744	0,748
5	Alimentado	Lactente	2	10	2	10	5	39	41	36	0,049	0,196	0,122	0,122
6	Alimentado	Lactente	3	1	25	25	22	41	47	40	0,379	0,347	0,355	0,360
6	Alimentado	Lactente	3	2	71	79	74	87	89	84	0,449	0,470	0,468	0,463
6	Alimentado	Lactente	3	10	68	68	62	50	51	51	0,576	0,571	0,549	0,565
7	Jejum	Adulto	1	1	67	70	68	81	84	83	0,453	0,455	0,450	0,453
7	Jejum	Adulto	1	2	7	9	0	70	78	70	0,091	0,103	0,000	0,065
7	Jejum	Adulto	1	10	38	40	32	22	26	18	0,633	0,606	0,640	0,626
8	Jejum	Adulto	2	1	37	45	44	39	48	41	0,487	0,484	0,518	0,496
8	Jejum	Adulto	2	2	13	22	18	51	59	55	0,203	0,272	0,247	0,240
8	Jejum	Adulto	2	10	3	11	10	96	98	88	0,030	0,101	0,102	0,078
9	Jejum	Adulto	3	1	83	88	79	69	69	63	0,546	0,561	0,556	0,554
9	Jejum	Adulto	3	2	18	21	19	49	51	46	0,269	0,292	0,292	0,284
9	Jejum	Adulto	3	10	37	43	42	61	69	63	0,378	0,384	0,400	0,387
10	Alimentado	Adulto	1	1	13	19	16	3	12	8	0,813	0,613	0,667	0,697
10	Alimentado	Adulto	1	2	63	67	65	94	99	95	0,401	0,404	0,406	0,404
10	Alimentado	Adulto	1	10	98	104	95	94	95	87	0,510	0,523	0,522	0,518
11	Alimentado	Adulto	2	1	53	54	45	55	56	54	0,491	0,491	0,455	0,479
11	Alimentado	Adulto	2	2	59	68	64	79	79	69	0,428	0,463	0,481	0,457
11	Alimentado	Adulto	2	10	23	29	24	32	35	32	0,418	0,453	0,429	0,433
12	Alimentado	Adulto	3	1	65	73	72	94	98	89	0,409	0,427	0,447	0,428
12	Alimentado	Adulto	3	2	40	47	45	85	91	81	0,320	0,341	0,357	0,339
12	Alimentado	Adulto	3	10	23	24	22	91	101	99	0,202	0,192	0,182	0,192

**Obs.:** **O1**, **O2** e **O3** referem-se às três observadoras. As variáveis que tem seus nomes iniciados por **Forte** ou **Fraca** indicam o número de células com a expressão respectiva da proteína TGFβ1, avaliada pelas observadoras. As variáveis iniciadas por **PorcForte** resumem as contagens citadas acima de cada observadora, calculando a porcentagem

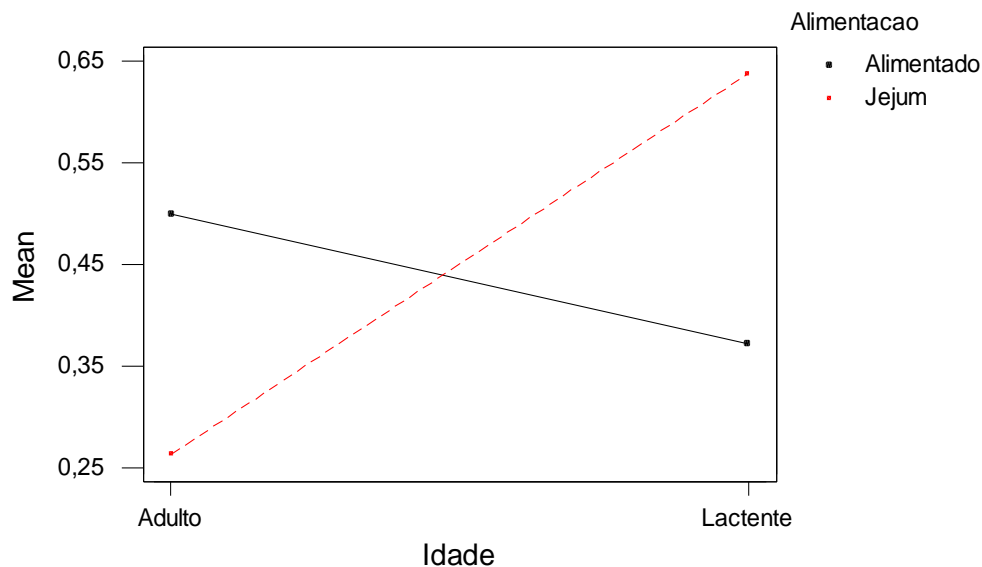
de células com expressão forte. A variável **PorcMForte** é a média aritmética das porcentagens de células com expressão forte das três observadoras.

Primeiramente, sugerimos que seja feita uma análise descritiva como a obtida na Figura 1. Essa análise pode ser realizada no programa Minitab através dos comandos<sup>1</sup>:

```
MTB > %Interact 'Alimentacao' 'Idade';  
SUBC> Response 'PorcMForte';  
SUBC> Title "Porcentagem média de células com expressão forte".
```

**Figura 1: Gráfico de Médias**

Porcentagem média de células com expressão forte



Se for obtido um gráfico como o da Figura 1, podemos dizer que a porcentagem média de células com expressão forte dos ratos alimentados é maior do que os em jejum, para os adultos, enquanto que para os lactentes, é menor. Quando a diferença na resposta dos ratos alimentados para os em jejum não é a mesma para os ratos adultos e os lactentes, diz-se que há interação entre os fatores alimentação e idade.

Um modelo adequado para a análise inferencial é o modelo de efeitos aleatórios (Crowder e Hand, 1990, Diggle et al., 1994 e Verbeke e Molenberghs, 2000), com um

<sup>1</sup> No Minitab, para poder usar comandos é necessário que essa função esteja habilitada. Para verificar isso, basta ver se na janela *Session* está escrito “MTB >”. Se não estiver, siga o procedimento: clique na janela *Session*, no menu *Editor* e na opção *Enable Commands*.

fator aleatório inter indivíduo referente às glândulas e dois fatores fixos entre indivíduos: alimentação (jejum ou alimentado) e idade (lactente ou adulto). Essa análise pode ser realizada usando a função PROC MIXED do programa SAS com o programa<sup>2</sup>:

```
PROC MIXED DATA= TGFB1.mucosa;  
  CLASS Id Alimentacao Idade;  
  MODEL PorcMFORTE = Alimentacao Idade Alimentacao*Idade;  
  ID Id;  
  RANDOM int / TYPE= VC SUBJECT= Id;  
RUN;
```

A parte final do resultado da execução desse programa será da seguinte forma:

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Alimentacao	1	108	0.89	0.3476
Idade	1	108	59.97	<.0001
Alimentacao*Idade	1	108	247.43	0.0002

Primeiramente, deve-se verificar se a interação (Alimentacao\*Idade) é significativa. No exemplo, não há evidências de que sejam iguais ( $p=0,0002$ ), pois o nível descritivo é menor que o nível de significância 0,05. Se a interação não for significativa, deve-se reajustar o modelo sem ela e então avalia-se os efeitos principais (Alimentacao e Idade), de maneira análoga.

Se a interação for significativa, deve-se rodar novamente o programa, adicionando a linha “`LSMEANS Alimentacao*Idade / ADJUST= SCHEFFE;`” antes da última linha do programa ilustrado anteriormente. Esse comando adicional, realizará comparações múltiplas pelo método de Scheffé (ver Neter et al., 1996).

O armazenamento e as análises descritiva e inferencial das outras variáveis podem ser realizadas da mesma maneira descrita.

## Referências bibliográficas:

---

<sup>2</sup> Esse programa supõe que os dados tenham sido importados do Excel para o SAS e estejam alocados na planilha

CROWDER, M. J. e HAND, H. (1990). **Analysis of Repeated Measures**. London: Chapman & Hall. 257p.

DIGGLE, P., LIANG, K. e ZEGER, S. L. (1994). **Analysis of Longitudinal Data**. New York: Oxford. 253p.

NETER, J., KUTNER, M. H., NACHTSHEIN, C. J. e WASSERMAN, W. (1996). **Applied Linear Statistical Models**. Chicago: Irwin. 1408p.

VERBEKE, G. e MOLENBERGHS, G. (2000). **Linear Mixed Models for Longitudinal Data**. New York: Springer. 568p.