Ana Carolina da Cruz

Análise de normalização e significância
em experimentos baseados em
Proteômica

Dissertação apresentada ao Instituto de Matemática e Estatística
da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestra
em Estatística.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Julia Maria Pavan Soler
Programa de pós-graduação em Estatística

São Paulo
2021

Ana Carolina da Cruz

Análise de normalização e significância em experimentos baseados em Proteômica

Dissertação apresentada ao Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestra em Estatística.

Banca Examinadora:

- Prof^a. Dr^a. Julia Maria Pavan Soler (orientadora) – IME/USP
- Prof^a. Dr^a. Luzia Aparecida Trinca – UNESP
- Prof. Dr. George Freitas von Borries – UnB

Dissertação aprovada pela Banca Examinadora em 14 de julho de 2021.

São Paulo
2021

Agradecimentos

Eu gostaria de agradecer todo o apoio que tive da minha família durante o processo de formação deste trabalho e da minha carreira acadêmica, tais pessoas foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui. Além deles, gostaria de agradecer meus amigos em que compartilhei momentos difíceis e felizes durante o mestrado e graduação, mostrando o quanto é importante ter pessoas que te motivam e ajudam a conquistar seus sonhos.

Gostaria de agradecer a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Julia Maria Pavan Soler em que tive oportunidade de aprender e compartilhar conhecimento, uma pessoa super humorada e atenciosa, sempre motivando seus alunos a persistir com seus sonhos e mostrando tudo de incrível que podemos alcançar ao seguir na carreira acadêmica.

Além de tudo, gostaria de agradecer o meu orientador da graduação Prof. Dr. George von Borries em que tive a oportunidade de aprender tantas coisas e que fez com que eu decidisse seguir com o mestrado e agora doutorado. Foi em uma das disciplinas que fiz com ele, que tive certeza que me tornar uma Estatística era o que eu de fato queria alcançar.

Dito isso, só tenho o que agradecer por tudo que aprendi com os meus orientadores e professores da Universidade de Brasília e da Universidade de São Paulo. Além disso, gostaria de agradecer o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa de estudos que tive durante o meu mestrado.

Resumo

Da Cruz, A.C. **Análise de normalização e significância em experimentos baseados em Proteômica**. 2021. Dissertação de Mestrado - Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A análise de dados ômicos vem se expandindo nos últimos anos e com isso tornou-se necessário desenvolver técnicas estatísticas para análise desse tipo de dados. Pensando nos estudos proteômicos, baseados na análise de espectrometria de massas, nota-se que com a grande quantidade de informação coletada a utilização de técnicas de normalização e significância são fundamentais para comparação e identificação de variáveis com comportamento diferencial, podendo auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos. Este trabalho teve como objetivo propor novas técnicas de normalização e significância que levem em consideração a estrutura em que os dados foram coletados para comparar diferentes métodos de preparação de amostras (os quais serão então analisadas para quantificação das proteínas e peptídeos) em busca do mais preciso, além de interpretar as diferentes fontes de variação impostas pelo delineamento do experimento. Como resultados do estudo observou-se que as técnicas propostas neste trabalho foram eficazes na normalização dos dados e na identificação de variáveis significantes, observando ainda diferenças entre os resultados obtidos pelas técnicas propostas com os resultados baseados na metodologia de normalização TIC. Além disso, notou-se que o método IGD (em gel) no geral apresentou as menores quantificações e o método ISD (em solução) se mostrou o mais preciso.

Palavras-chave: proteômica; modelo misto heterocedástico; decomposição de matrizes; componentes principais; modelos gráficos probabilísticos.

Abstract

Da Cruz, A.C. **Normalization and significance analysis in Proteomics experiments**. 2021. Masters Thesis - Institute of Mathematics and Statistics, University of São Paulo, São Paulo.

In the past years, omic data analysis has expanded, as a result, statistical techniques are being developed to study this kind of data. Concerning the amount of data generated by Mass Spectrometry based Proteomics experiments normalization and significance analysis are fundamental to compare and to find variables with differential abundance. This paper aims to propose new normalization and significance models that take the data's structure into account, to compare different preparation methods, which will be analyzed to quantify proteins and peptides, to find the most precise, and to explain the technical variation sources imposed by the experiment. It was found that the techniques proposed in this paper were efficient at their purposes, and was observed differences between results from these techniques with results from the normalization method TIC. Besides, IGD (in gel) had the lowest variable abundance, and ISD (in solution) was the preparation method most precise.

Keywords: proteomics; heterocedastic mixed model; matrix decomposition; principal components; probabilistic graph models.

Sumário

1	Introdução	13
2	Histórico	15
3	Descrição dos dados	19
3.1	Objetivos	21
3.2	Delineamento do Experimento	21
4	Metodologia	23
4.1	Modelo de normalização	23
4.1.1	Modelo Linear Clássico	24
4.1.2	Modelo Linear Misto com erros homocedásticos	28
4.1.3	Modelo Linear Misto com erros heterocedásticos	38
4.2	Modelo de significância	42
4.3	Racional da Análise	42
4.4	Análises Multivariadas	43
4.4.1	Análise de Componentes Principais	44
4.4.2	Análise de Grafos Probabilísticos	45
5	Análise	47
5.1	Experimento SRM	47
5.1.1	Modelo de normalização	51
5.1.2	Modelo de significância	55
5.2	Experimento DDA - noNorm Peptídeos	56
5.2.1	Modelo de normalização	56
5.2.2	Modelo de significância	57
5.3	Experimento DDA - TIC Peptídeos	61
5.3.1	Modelo de significância	62
5.4	Experimento DDA - noNorm Proteínas	64
5.4.1	Modelo de normalização	64

5.4.2	Modelo de significância	66
5.5	Experimento DDA - TIC Proteínas	69
5.5.1	Modelo de significância	70
5.6	Análise dos experimentos	72
5.7	Análises Multivariadas	73
5.7.1	Análise de Componentes Principais	73
5.7.2	Análise de Grafos Probabilísticos	77
6	Considerações Finais	91
	Referências Bibliográficas	93
	APÊNDICE A – Tabelas suplementares	97
A.1	Experimento SRM	97
A.2	Experimento DDA - noNorm Peptídeos	102
A.3	Experimento DDA - TIC Peptídeos	107
A.4	Experimento DDA noNorm Proteínas	109
A.5	Experimento DDA - TIC Proteínas	114

Capítulo 1

Introdução

A análise de dados ômicos vem se expandindo nos últimos anos, deixando de ser voltada somente à avaliação do genoma e partindo para outros níveis, como por exemplo proteoma, metaboloma e epigenoma, possibilitando assim avaliar de forma holística todo o sistema biológico.

Pensando nos estudos proteômicos tem-se que grande parte deles se baseiam na análise de espectrometria de massa, que consiste na identificação e quantificação de peptídeos e proteínas presentes em amostras biológicas por meio da ionização e fragmentação desses materiais. Contudo, existem diferentes métodos de espectrometria e de preparação de amostras que podem ser utilizados para quantificação das variáveis de interesse.

No estudo desenvolvido por Klont *et al.* [18] foram comparados diferentes métodos de preparação utilizados para quantificação e identificação de proteínas e peptídeos em estudos proteômicos. Os autores tinham como objetivo verificar a existência de um método de preparação universal a ser utilizado independente do tipo de amostra avaliada. Neste estudo foram encontradas diferenças nas quantificações das proteínas e peptídeos no que diz respeito à perda, variabilidade e características biológicas das proteínas e peptídeos identificados.

Dessa forma, este trabalho visa dar continuidade ao estudo desenvolvido por eles [18], propondo técnicas estatísticas que permitam comparar os diferentes métodos utilizados quanto à precisão e quantificação dos peptídeos e proteínas avaliadas, porém considerando a estrutura do delineamento do experimento, possibilitando assim identificar e interpretar as diferentes fontes de variação impostas pela estruturação dos dados.

Primeiramente serão propostas técnicas de normalização para estudos proteômicos baseados em modelos de regressão, com intuito de comparar os diferentes métodos de preparação de amostras avaliados no estudo e identificar as diferentes fontes de

variação técnica impostas pelo delineamento. Em seguida, será proposto uma forma de se retirar tais fontes de variação dos dados para avaliar a significância das variáveis quantificadas em diferentes condições de interesse.

Além disso, as metodologias de normalização propostas neste trabalho serão comparadas com uma técnica comumente utilizada na Bioinformática para normalização da abundância de proteínas e peptídeos em amostras biológicas, com intuito de se avaliar o quanto a técnica de normalização escolhida pode influenciar nos resultados.

Por fim, com base nos resultados obtidos pelas técnicas propostas será avaliada ainda a estrutura dos dados em cada experimento por meio de análises multivariadas para identificar possíveis agrupamentos nos dados e grafos de causalidade entre os peptídeos e as proteínas avaliadas.

Capítulo 2

Histórico

A análise de dados ômicos avalia a estrutura e o funcionamento de moléculas biológicas, considerando diferentes níveis do sistema molecular: genético (Genômica), proteico (Proteômica), metabólico (Metabolômica), dentre outros. O termo ômico se refere ao fato de que todas ou quase todas as instâncias do espaço molecular avaliado estão sendo medidas. Dessa forma, tem-se uma visão holística do sistema biológico.

Durante muitos anos, experimentos ômicos focavam principalmente na análise do genoma. Contudo, nas últimas décadas esse tipo de análise vem se expandindo para avaliar outros níveis, tais como transcriptoma, proteoma, lipoma, epigenoma e metaboloma. Sendo que, atualmente, com o avanço tecnológico, além da criação de novos estudos, tornou-se possível ainda avaliar diferentes níveis de uma amostra biológica simultaneamente (estudos multiômicos).

Pensando no estudo voltado à constituição proteica do organismo, tem-se como objetivo avaliar o proteoma, entendendo as funções que ocorrem no nível proteico, tais como: as modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína e outras, uma vez que, por meio da análise da expressão gênica, tais informações acabam sendo perdidas na análise do RNA. Dessa forma, tem-se por meio da Proteômica a possibilidade de caracterizar a localização, abundância, modificações pós-traducionais e interações biomoleculares das proteínas presentes em um organismo. Um dos objetivos dessa análise é encontrar biomarcadores que ajudem no diagnóstico precoce e no tratamento de doenças [1].

Em relação à metodologia utilizada neste tipo de análise (Figura 2.1), os passos comuns a serem seguidos consistem em inicialmente avaliar uma amostra biológica, por exemplo, um tecido hepático. Sendo que, dessa amostra são extraídas as proteínas, caso a análise seja realizada no nível de proteína, as quais são separadas por eletroforese unidimensional (1 - DE) ou bidimensional (2 - DE) ou por cromatografia líquida (LC). No entanto, se estivermos avaliando os peptídeos da amostra, as proteí-

nas extraídas passam por um processo de digestão, dado pela utilização de proteases (enzimas) que quebram as ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, com o intuito de se obter uma mistura de peptídeos e seguir com a análise. Após a separação, o conteúdo passa por um processo de ionização e de fragmentação. Por meio dos fragmentos obtidos é realizada a análise de massas e detecção de peptídeos por meio da espectrometria de massa (MS). Na fase final, para identificação dos peptídeos e ou proteínas presentes na amostra, são utilizadas bases de dados disponíveis para consulta e anotação.

Figura 2.1 – Um Fluxo típico em estudos proteômicos

Atualmente, tem-se duas metodologias comumente utilizadas em estudos proteômicos: *bottom-up* (também denominada de *shotgun*) e a *top-down*. A primeira consiste em avaliar os peptídeos presentes na amostra, seguindo o fluxo apresentado na Figura 2.1. A segunda metodologia consiste em avaliar as proteínas e não os peptídeos, as quais também passam por uma análise de espectrometria de massa. A metodologia *shotgun* possui diversas vantagens, como reprodutibilidade e sensibilidade, porém, por se avaliar os peptídeos e não as proteínas, as modificações pós-traducionais acabam por não ser avaliadas.

A identificação e quantificação das proteínas e/ou peptídeos é dada por meio da espectrometria de massa (MS), um procedimento bastante utilizado em estudos proteômicos por apresentar sensibilidade e ser versátil na identificação e quantificação de proteínas e/ou peptídeos. A MS consiste em identificar a estrutura molecular de

um composto por meio da ionização e fragmentação em pequenos íons, em seguida, analisando o resultado obtido pela ionização e fragmentação, é deduzido a ordem em que os fragmentos estão unidos, de tal forma que é possível identificar peptídeos e/ou proteínas por meio da comparação com as informações presentes em bases de dados.

Tratando-se especificamente dos procedimentos realizados durante a análise MS, tem-se que após a digestão da proteína ou de um conjunto de proteínas em uma mistura de peptídeos, tal conteúdo é analisado por meio de um espectrômetro de massa para quantificar a razão massa/carga desse composto, sendo que por meio dessa quantificação é possível identificar os peptídeos presentes na amostra. Todavia, muitas vezes é de interesse identificar as proteínas presentes na amostra biológica e não somente os peptídeos, sendo assim, tem-se a necessidade de inferir por meio da identificação dos peptídeos, as proteínas presentes na amostra. Para tornar esse processo de identificação mais preciso é comum analisar os peptídeos que foram identificados como mais abundantes em uma primeira análise MS, e identificar as cadeias de peptídeos por meio de uma segunda MS (MS² - tandem MS), dessa forma é possível obter a sequência completa dos aminoácidos dos peptídeos e/ou proteína e até mesmo as modificações pós-traducionais.

Além disso, é interessante ressaltar que, durante o processo de identificação das proteínas e/ou peptídeos, pode ser de interesse a identificação de um certo conjunto específico de proteínas e/ou peptídeos, para identificar, por exemplo, biomarcadores. Esse tipo de análise pode ser realizada por meio do Monitoramento de Reação Seleccionada (SRM, do inglês Targeted Mass Spectrometry), que consiste em identificar e quantificar componentes com propriedades de fragmentação conhecidas. Dessa forma, a SRM seleciona os peptídeos por meio de suas medidas de razão/carga dadas pela primeira análise de massa, depois esses peptídeos selecionados são fragmentados em pequenos componentes e avaliados por um segundo espectrômetro de massa para identificar os componentes de interesse.

Outra técnica de quantificação proteômica bastante utilizada é a Aquisição de Dados Dependentes (DDA, do inglês Data Dependent Acquisition) e consiste em identificar de forma simultânea milhares de proteínas e/ou peptídeos em um material biológico. Assim como para SRM, são selecionados peptídeos na primeira análise de massa, porém ao invés de selecionar peptídeos específicos por meio de suas medidas de razão massa/carga, na DDA os peptídeos selecionados são os mais abundantes e, por meio da segunda análise de massa, é possível identificar tais peptídeos e proteínas presentes na amostra biológica.

Atualmente com a expansão desse tipo de análise, tem-se como resultado uma grande quantidade de informações complexas que buscam responder diversas ques-

tões relacionadas a diferentes problemas. Dessa forma, a busca por metodologias estatísticas que possam avaliar tais informações, levando em consideração a complexidade dos dados ainda continua em aberto [8].

Capítulo 3

Descrição dos dados

No estudo desenvolvido por Klont [18], foram comparados diferentes métodos de preparação utilizados para identificação e quantificação de proteínas e peptídeos em estudos proteômicos (*bottom-up*) baseados em espectrometria de massa em busca de identificar a existência de um possível método que poderia ser considerado em todos os cenários. Para comparação foram avaliadas a perda relativa de peptídeos e proteínas identificados nas amostras em cada método, a precisão das quantificações e o potencial de descoberta. Nessa comparação, foi possível observar diferenças entre os métodos quanto à precisão, quantificação e características biológicas das proteínas e peptídeos quantificados pelos experimentos realizados. Além disso, foi ressaltada a importância em selecionar o método mais adequado considerando a estrutura dos dados e métodos a serem estudados, ao invés de utilizar sempre o mesmo método de preparação—normalmente o ISD (em solução)—, sem se atentar ao tipo de amostra biológica sendo avaliada.

Dito isso, este trabalho busca dar continuidade ao estudo realizado em Klont [18], buscando propor metodologias estatísticas que considerem a estrutura dos dados para comparar os diferentes métodos de preparação estudados, em busca de identificar o que produz a maior quantificação de proteínas ou peptídeos e o de maior precisão. Além disso, será proposto para análise de significância um modelo estatístico baseado nas observações sem variação sistemática para identificação de variáveis com comportamento diferencial entre os métodos avaliados.

Neste estudo serão comparados, assim como no estudo do Klont [18], quatro métodos de preparação (digestão) comumente utilizados em estudos proteômicos para identificação de proteínas e peptídeos em amostras biológicas, quais sejam: em solução (ISD), no filtro (OFD), em gel (IGD) e na paleta (OPD). Serão avaliados dois métodos de espectrometria de massa: SRM e DDA (MS - *Target* SRM e MS - *Shotgun* DDA). As amostras biológicas foram coletadas a partir de três tecidos humanos cancerígenos

das regiões da cabeça e do pescoço, mais precisamente dos pólipos nasais (NP), da glândula parótida (P) e das amídalas (T).

Além dos três tecidos coletados, foi obtida uma mistura dos tecidos, denominada *pool* (Pool). A utilização desse tipo de amostra, representada por uma mistura das demais, normalmente está relacionada ao custo do experimento. Aliás, a utilização da agregação de observações como uma nova observação é comum em estudos moleculares e visa aumentar a habilidade de encontrar diferenças entre grupos por meio da redução da variação existente entre as mesmas observações. [17]

O experimento foi construído hierarquicamente da seguinte maneira: para cada um dos tecidos foram obtidas quatro subamostras (réplicas), as quais foram alocadas aleatoriamente a cada um dos métodos de preparação. Após os procedimentos de preparação, o produto final de cada método é uma mistura de peptídeos e para cada uma das 16 misturas foram obtidas 10 réplicas, as quais foram alocadas aleatoriamente de forma balanceada a cada método de espectrometria de massa (SRM, DDA) para a quantificação das proteínas e peptídeos.

Na tabela 3.1, temos a estruturação dos dados conforme o delineamento do experimento. Considerando cada método de espectrometria separadamente, temos 80 unidades experimentais.

Tabela 3.1 – Estrutura dos dados

Tecido	Método	Experimento SRM					Experimento DDA				
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
NP	ISD										
	OPD										
	IGD										
	OFD										
P	ISD										
	OPD										
	IGD										
	OFD										
T	ISD										
	OPD										
	IGD										
	OFD										
Pool	ISD										
	OPD										
	IGD										
	OFD										

Para o método MS - SRM, os peptídeos (variáveis) a serem quantificados foram previamente especificados. Dessa forma, temos como resultado do experimento uma

base de dados $\mathbf{Y}_{80 \times p}$, em que p representa cada variável quantificada e o número de linhas é dado pelo número de realizações do experimento ($4 \times 4 \times 5 = 80$, quatro tecidos, quatro métodos e cinco réplicas).

Para o método MS - DDA, as variáveis (peptídeos e proteínas) obtidas foram aleatórias, ou seja, não foram especificadas previamente, resultando em duas bases de dados $\mathbf{Y}_{80 \times q}$ e $\mathbf{Y}_{80 \times s}$, em que q e s representam os peptídeos e as proteínas identificadas e quantificadas no experimento, respectivamente.

Neste trabalho serão avaliadas cada base de dados obtida pelos métodos de espectrometria de massa (SRM - peptídeos, DDA - peptídeos e DDA - proteínas) separadamente. Dessa forma, para cada recorte serão ajustados modelos estatísticos para realização do pré-processamento dos dados, com o intuito de se retirar variabilidade indesejável imposta pela forma de coleta dos dados. Além disso, serão estimados modelos de significância para identificação dos peptídeos e proteínas com expressão diferencial entre os tecidos e métodos de preparação.

3.1 Objetivos

Considerando as quantificações obtidas por cada experimento avaliado, este trabalho tem como objetivos:

- Avaliar a existência de possível diferença entre os métodos de preparação utilizados nos experimentos;
- Identificar qual método possui a maior quantificação de proteínas e ou peptídeos e qual o mais preciso;
- Estimar e interpretar as fontes de variação técnica impostas pelo delineamento dos experimentos.

Além disso, será de interesse ainda comparar os resultados obtidos pelo método de normalização proposto nesse trabalho com o método TIC (mais detalhes serão discutidos no Capítulo 4), bastante utilizado na Bioinformática, avaliando assim, o impacto que o modelo de normalização escolhido tem na análise dos peptídeos e proteínas avaliados em estudos proteômicos.

3.2 Delineamento do Experimento

Para propor modelos estatísticos que comparem os diferentes métodos de preparação de amostras e que considerem a estrutura dos dados experimentos é importante

entender a estrutura do delineamento do experimento: as unidades amostrais e experimentais, fatores experimentais, o processo de randomização e a estrutura da variável resposta de interesse [9].

Sendo assim, considerando a descrição dos dados realizada anteriormente, temos que a estrutura das unidades experimentais (que foram aleatorizadas aos tratamentos) caracteriza um modelo de medidas repetidas, pois a mesma amostra de tecido foi avaliada nos diferentes métodos de preparação e espectrometria de massa.

Nota-se que as unidades experimentais foram aleatorizadas aos tratamentos sob uma estrutura hierárquica, em que o nível 1 está representado pelos tecidos (NP, P, T e Pool), o nível 2 é dada pelas subamostras atribuídas aos métodos dentro de tecido e o nível 3 corresponde às réplicas por subamostra dentro de método e dentro de cada tecido.

O delineamento do experimento pode assim ser identificado como um Split-Split-Plot, com quatro *plots* completos, representados pelos quatro tecidos (NP, P, T, Pool), cada um contendo quatro *subplots*, os quais contêm 10 réplicas cada.

Deste modo, estão sendo avaliados três fatores principais no experimento: tecido, método de preparação e método de espectrometria de massa completamente cruzados em um esquema fatorial $4 \times 4 \times 2$. Observa-se que o fator tecido não possui réplica genuína e que cada combinação de tratamento foi aplicada às subunidades experimentais.

A análise será realizada separadamente para cada método de espectrometria de massa, sendo que, para cada recorte, temos que o fator método dentro de tecido possui cinco réplicas e é definido como efeito fixo de interesse no estudo. Além disso, como mencionado anteriormente, para o método MS - *Target* SRM são quantificados um número fixo de variáveis, no caso, peptídeos (alvo) de interesse. Já para o método MS - *Shotgun* DDA, em que é realizada uma varredura completa, as variáveis quantificadas são aleatórias e é possível medir diferentes níveis de profundidade (peptídeos e proteínas). Espera-se que os resultados obtidos pelo método DDA sejam extremamente desbalanceados (na estrutura das variáveis quantificadas nas réplicas) quando comparado ao SRM. Todavia, para reduzir essa diferença, serão consideradas somente as variáveis que tiverem sido quantificadas em pelo menos três das cinco réplicas dentro de cada método aninhado a tecido.

No Capítulo 4 serão descritos em detalhes o racional da análise e as metodologias propostas neste trabalho. Já no Capítulo 5 serão apresentados os resultados obtidos pela análise dos dados, buscando responder às questões de interesse deste estudo.

Capítulo 4

Metodologia

Um dos principais focos em estudos proteômicos consiste em identificar proteínas com expressão diferencial quanto à suas abundâncias. Os instrumentos utilizados nesses estudos são bastante sensíveis para possibilitar a detecção de mudanças expressivas nas amostras, porém essa sensibilidade também capta mudanças devido à experimentação, preparação da amostra e instrumentação. Dessa forma, é crucial ter em mãos dados fidedignos, sem viés ou erros sistemáticos. Portanto, a utilização de um processo de normalização é fundamental, pois remove tais variações indesejáveis e mantém a acurácia e precisão das conclusões obtidas pelo estudo.

Muitas vezes, nesses estudos é comum mensurar centenas ou milhares de peptídeos e proteínas em cada amostra. Devido a isso, na análise de significância, as comparações múltiplas que permitem identificar mudanças expressivas nas proteínas, devem ser realizadas de forma correta para assegurar que os resultados obtidos representem de fato mudanças reais no proteoma e não falsos positivos.

Neste Capítulo serão apresentados o racional da análise, os modelos propostos para normalização e significância dos resultados dos experimentos. Além disso, serão apresentados, para cada modelo, códigos em R que possibilitem realizar os ajustes e estimação envolvidos na análise proposta [29] [3].

4.1 Modelo de normalização

Usualmente em estudos baseados em experimentos de espectrometria de massa as amostras avaliadas são processadas em diferentes passos, podendo ser no mesmo instrumento ou em instrumentos diferentes. Sendo assim, torna-se necessário ajustar os íons quantificados em diferentes realizações para uma escala comparável. Esse procedimento é chamado de normalização (dos dados proteômicos). O objetivo da normalização é retirar a variabilidade indesejável devido à técnica, mantendo varia-

ções devido às fontes biológicas.

Um dos métodos mais utilizados para essa finalidade nesse tipo de estudo consiste em ajustar cada amostra por meio da sua corrente de íon total (TIC, do inglês Total Ion Current), ou seja, cada variável quantificada na amostra, tem sua abundância dividida pela intensidade total da amostra. Esse método é bastante popular, pois não é computacionalmente intensivo e simples de calcular.

No entanto, esse tipo de método é influenciado por variáveis que possuem observações com alta ionização. Além disso, o método TIC considera que a maioria das variáveis não sofre influência sobre as condições que estão sendo testadas e, muitas vezes, além de retirarem a variação sistemática, acabam retirando também a variação biológica de interesse.

Sendo assim, tem-se a necessidade de utilizar outras técnicas que sejam mais assertivas para normalização dos dados em estudos proteômicos. Os modelos de regressão podem ser utilizados como procedimentos de normalização [38]. A grande vantagem é que permitem controlar (filtrar) fontes de variação conhecidas provenientes do delineamento do experimento para o ajuste dos dados, sendo possível assim retirar vieses e variações sistemáticas por meio da utilização dos resíduos do modelo ajustado. Portanto, neste trabalho, serão propostos três métodos de normalização baseados em modelos de regressão linear para obtenção de observações sem variação técnica.

Neste contexto, os possíveis modelos que podem ser propostos para realização da normalização são: (1) Modelo Linear Clássico, (2) Modelo Linear Misto com erros homocedásticos, e (3) Modelo Linear Misto com erros heterocedásticos. Esses modelos atendem diversas situações por serem flexíveis quanto à estrutura dos dados a serem avaliados. O leitor já familiarizado com essas metodologias pode se encaminhar para a seção 4.3 com o Racional da Análise.

4.1.1 Modelo Linear Clássico

O Modelo Linear Clássico é um dos modelos mais simples para normalização dos dados por considerar somente efeitos fixos e muitas vezes homocedasticidade dos erros. Tal modelo pode ser definido da seguinte forma,

$$y_{ijkl} = \mu + \beta_j + \epsilon_{ijkl} \quad (4.1)$$

em que,

$$\epsilon_{ijkl} \sim N_1(0; \sigma^2) \quad (4.2)$$

y_{ijkl} representa a quantificação da l -ésima variável avaliada na k -ésima réplica, no

j -ésimo método de preparação e no i -ésimo tecido.

Além disso, temos que μ corresponde a média geral, β_j o efeito do j -ésimo método de preparação, e os erros ϵ_{ijkl} independentes e identicamente distribuídos.

Considerando que $E(\epsilon_{ijkl}) = 0$ e $\text{Var}(\epsilon_{ijkl}) = \sigma^2$, temos que

$$E(y_{ijkl}) = \mu + \beta_j, \quad (4.3)$$

$$\text{Var}(y_{ijkl}) = \sigma^2. \quad (4.4)$$

O Modelo (4.1) pode ser reescrito em forma matricial, facilitando a obtenção dos estimadores dos parâmetros do modelo. Sendo assim, temos abaixo o modelo em sua forma matricial,

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\epsilon}, \quad (4.5)$$

sendo que, $\mathbf{y}$ representa o vetor de respostas, $\mathbf{X}$ é a matriz de delineamento dos efeitos fixos $\boldsymbol{\beta}$, $\boldsymbol{\beta}$ representa o vetor dos efeitos fixos do modelo e $\boldsymbol{\epsilon}$ é o vetor de erros.

A estimação dos parâmetros $\boldsymbol{\beta}$ pode ser obtida pelo Método dos Mínimos Quadrados bem como pelo de Máxima Verossimilhança.

Método dos Mínimos Quadrados

Considerando o modelo na forma matricial (4.5), temos que a estimação por meio do Método dos Mínimos Quadrados consiste em minimizar a soma de quadrados Q da distância entre $\mathbf{y}$ e seu valor esperado $E(\mathbf{y}) = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta}$.

Dessa forma, os estimadores de $\boldsymbol{\beta}$ representam os valores que minimizam $Q = (\mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta})^T(\mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta})$.

Sendo assim, temos que

$$Q = (\mathbf{y}^T - \boldsymbol{\beta}^T \mathbf{X}^T)(\mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta}) \quad (4.6)$$

$$= \mathbf{y}^T \mathbf{y} - \mathbf{y}^T \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} - \boldsymbol{\beta}^T \mathbf{X}^T \mathbf{y} + \boldsymbol{\beta}^T \mathbf{X}^T \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} \quad (4.7)$$

$$= \mathbf{y}^T \mathbf{y} - 2\mathbf{y}^T \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\beta}^T \mathbf{X}^T \mathbf{X}\boldsymbol{\beta}. \quad (4.8)$$

Portanto, o valor que minimiza Q é dado pela solução da equação

$$\frac{\partial Q}{\partial \boldsymbol{\beta}} = 0 \implies -2\mathbf{X}^T \mathbf{y} + 2\mathbf{X}^T \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} = 0, \quad (4.9)$$

uma vez que,

$$\frac{\partial(\mathbf{A}\boldsymbol{\theta})}{\partial \boldsymbol{\theta}} = \mathbf{A}^T \quad (4.10)$$

e

$$\frac{\partial(\boldsymbol{\theta}^T \mathbf{A} \boldsymbol{\theta})}{\partial \boldsymbol{\theta}} = (\mathbf{A} + \mathbf{A}^T) \boldsymbol{\theta} = 2\mathbf{A} \boldsymbol{\theta} \quad (4.11)$$

se $\mathbf{A}$ for simétrica.

Logo,

$$\hat{\boldsymbol{\beta}} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{y}, \quad (4.12)$$

se $\mathbf{X}$ for de posto completo.

Máxima Verossimilhança

Levando em consideração o modelo descrito em (4.5), temos que

$$\mathbf{y} \sim N_N(\mathbf{X}\boldsymbol{\beta}; \sigma^2 \mathbf{I}). \quad (4.13)$$

A função de verossimilhança para o modelo é a densidade de probabilidade para os dados, dado os parâmetros, porém é vista, como uma função dos parâmetros com os dados fixos. Portanto, temos

$$L(\boldsymbol{\beta}, \sigma^2 \mid \mathbf{y}) = (2\pi)^{-\frac{N}{2}} (\sigma^2)^{-\frac{N}{2}} \exp \left[-\frac{1}{2\sigma^2} (\mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta})^T (\mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta}) \right]. \quad (4.14)$$

O logaritmo da função de verossimilhança fica expresso como

$$l(\boldsymbol{\beta}, \sigma^2 \mid \mathbf{y}) = -\frac{N}{2} \log(2\pi) - \frac{N}{2} \log \sigma^2 - \frac{1}{2\sigma^2} [(\mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta})^T (\mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta})]. \quad (4.15)$$

Considerando a função log-verossimilhança do modelo (4.5), temos que a estimação dos parâmetros do modelo é dada pela resolução das seguintes equações

$$\frac{\partial l}{\partial \boldsymbol{\beta}} = 0 \implies \mathbf{X}^T (\mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta}) = 0, \quad (4.16)$$

$$\frac{\partial l}{\partial \sigma^2} = 0 \implies -\frac{N}{2\sigma^2} + \frac{1}{2\sigma^4} (\mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta})^T (\mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta}) = 0. \quad (4.17)$$

Logo, temos que os estimadores de σ^2 e $\boldsymbol{\beta}$ são dados por

$$\hat{\boldsymbol{\beta}} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{y} \quad (4.18)$$

e

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{(\mathbf{y} - \mathbf{X}\hat{\boldsymbol{\beta}})^T (\mathbf{y} - \mathbf{X}\hat{\boldsymbol{\beta}})}{N}. \quad (4.19)$$

Resíduos

Tendo em vista que os modelos utilizados para normalização visam retirar efeitos indesejáveis, temos que os resíduos desempenham um papel importante nesses modelos, pois representam os valores da variável de interesse sem os efeitos impostos pela técnica utilizada.

Portando para o modelo (4.1), os resíduos podem ser obtidos da seguinte maneira,

$$\hat{\epsilon}_{ijkl} = y_{ijkl} - \hat{y}_{ijkl}, \quad (4.20)$$

em que $\hat{y}_{ijkl}$ corresponde ao valor ajustado de y_{ijkl} pelo modelo.

Em termos matriciais, temos que

$$\hat{\mathbf{y}} = \mathbf{X}\hat{\boldsymbol{\beta}} \quad (4.21)$$

$$= \mathbf{X}(\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{y} \quad (4.22)$$

$$= \mathbf{H}\mathbf{y}, \quad (4.23)$$

com $\mathbf{H} = \mathbf{X}(\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T$ uma matriz simétrica e idempotente. Logo, os resíduos são dados por

$$\hat{\epsilon} = \mathbf{y} - \hat{\mathbf{y}} \quad (4.24)$$

$$= \mathbf{y} - \mathbf{H}\mathbf{y} \quad (4.25)$$

$$= (\mathbf{I}_N - \mathbf{H})\mathbf{y}. \quad (4.26)$$

Ferramenta R – função `lm`

Para realização da análise de normalização via o ajuste desse modelo, que consiste em obter, por exemplo, os valores estimados dos parâmetros e os resíduos, será utilizado o software estatístico R. Sendo possível realizar a análise por meio da função `lm` do pacote `stats`.

Abaixo temos alguns comandos para obtenção das estimativas dos parâmetros e dos resíduos do modelo.

```

1 # Comparação dos efeitos fixos (B)
2 model <- lm(y ~ B, na.action = na.exclude, data = data)
3 model
4
5 # Estimação dos efeitos fixos
6 summary(model)
7
8 # Tabela de Análise de Variância
```

```

9  anova(model)
10
11 # Resíduos
12 residuals(model)

```

4.1.2 Modelo Linear Misto com erros homocedásticos

O Modelo Linear Misto pode ser adotado para levar em consideração a estrutura Split-Split-Plot do experimento, sendo que, devido à estruturação hierárquica das unidades experimentais e do processo de randomização, pode-se definir efeitos aleatórios para cada nível hierárquico presente no delineamento. Portanto, pensando na estrutura do experimento descrito no Capítulo 3, temos que para o nível 1, é definida a variável $\mathbf{u}_1$ correspondente ao efeito aleatório entre os tecidos. Para o nível 2, define-se a variável $\mathbf{u}_2$, correspondente ao efeito aleatório entre as subamostras aninhadas aos seus correspondentes tecidos.

Portanto, pode-se definir o modelo da seguinte maneira:

$$y_{ijkl} = \mu_{ij} + \beta_j + \epsilon_{ijkl}, \quad (4.27)$$

em que,

$$\epsilon_{ijkl} \sim N_1(0; \sigma^2), \quad (4.28)$$

$$\mu_{ij} = \mu + u_{1i} + u_{2j(i)}, \quad (4.29)$$

y_{ijkl} representa a quantificação da l -ésima variável avaliada na k -ésima réplica, no j -ésimo método de preparação e no i -ésimo tecido.

Além disso, temos que: μ corresponde à média geral, β_j o efeito do j -ésimo método de preparação, u_{1i} o efeito aleatório do i -ésimo tecido, $u_{2j(i)}$ o efeito aleatório entre a mistura de peptídeos obtida pelo j -ésimo método de preparação aninhado ao i -ésimo tecido e os erros ϵ_{ijkl} são independentes e identicamente distribuídos.

Levando em consideração que as observações que compartilham o mesmo efeito aleatório são correlacionadas. Pode-se definir as distribuições condicionais e marginais das respostas. Sendo que os valores ajustados e os resíduos podem ser obtidos com base nas distribuições condicionais ou marginais.

Diferentemente dos Modelos Lineares de efeitos fixos, os Modelos Lineares Mistos por meio da incorporação de efeitos aleatórios consideram a correlação existente entre as observações dentro de um mesmo grupo.

Nesta subsecção são apresentadas a formulação dos Modelos Lineares Mistos com um e dois níveis e a estimação dos parâmetros por Máxima Verossimilhança e Máxima

Verossimilhança Restrita.

Modelo Linear Misto com um único nível

Considerando o modelo proposto por Laird [19], temos que o vetor de repostas n_i -dimensional $\mathbf{y}_i$ para o i -ésimo grupo pode ser descrito como

$$\mathbf{y}_i = \mathbf{X}_i\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}_i\mathbf{u}_i + \boldsymbol{\epsilon}_i, \quad i = 1, \dots, M. \quad (4.30)$$

Temos que,

$$\boldsymbol{\epsilon}_i \sim N(\mathbf{0}; \sigma^2 \mathbf{I}), \quad (4.31)$$

$$\mathbf{u}_i \sim N(\mathbf{0}; \boldsymbol{\Psi}), \quad (4.32)$$

$\boldsymbol{\Psi}$ é positiva-definida.

Além disso, $\boldsymbol{\beta}$ é o vetor de efeitos fixos p -dimensional, $\mathbf{u}_i$ representa o vetor de efeitos aleatórios q -dimensional, $\mathbf{X}_{i n_i \times p}$ e $\mathbf{Z}_{i n_i \times q}$ são conhecidas e representam respectivamente as matrizes de delineamento dos efeitos fixos e aleatórios e $\boldsymbol{\epsilon}_i$ é o vetor n_i -dimensional de erro intragrupo.

Os erros $\boldsymbol{\epsilon}_i$ e os efeitos aleatórios $\mathbf{u}_i$ são independentes para diferentes grupos e entre si no mesmo grupo.

O modelo em (4.30) pode ser reescrito como

$$\begin{aligned} \mathbf{y}_i &= \mathbf{X}_i\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}_i\mathbf{u}_i + \boldsymbol{\epsilon}_i \\ &= \mathbf{X}_i\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\epsilon}_i^*, \quad i = 1, \dots, M, \end{aligned} \quad (4.33)$$

em que,

$$\boldsymbol{\epsilon}_i^* = \mathbf{Z}_i\mathbf{u}_i + \boldsymbol{\epsilon}_i. \quad (4.34)$$

Devido ao fato de $\boldsymbol{\epsilon}_i^*$ representar uma soma de duas Normais Multivariadas independentes, tem-se que

$$\boldsymbol{\epsilon}_i^* \sim N_M(\mathbf{0}; \sigma^2 \boldsymbol{\Sigma}_i), \quad (4.35)$$

em que

$$\boldsymbol{\Sigma}_i = \mathbf{I} + \frac{\mathbf{Z}_i \boldsymbol{\Psi} \mathbf{Z}_i^T}{\sigma^2}. \quad (4.36)$$

Sendo assim, a distribuição marginal de $\mathbf{y}_i$ é Normal Multivariada com média $\mathbf{X}_i\boldsymbol{\beta}$ e matriz de variâncias e covariâncias $\sigma^2 \boldsymbol{\Sigma}_i$.

A estimação dos parâmetros do modelo pode ser realizada por Máxima Verossimilhança e Máxima Verossimilhança Restrita.

Máxima Verossimilhança

Considere o modelo apresentado em (4.33). Os parâmetros do modelo são β , σ^2 e θ o qual representa os parâmetros que definem Σ_i .

Pelo método de estimação por Máxima Verossimilhança temos que os estimadores são obtidos por meio da maximização da função de verossimilhança ou log-verossimilhança. Sendo assim, temos que a função de verossimilhança para o modelo é dada por:

$$L(\beta, \theta, \sigma^2 \mid \mathbf{y}) = \prod_{i=1}^M (2\pi)^{-\frac{n_i}{2}} (\sigma^2)^{-\frac{n_i}{2}} |\Sigma_i|^{-\frac{1}{2}} \exp \left[-\frac{1}{2\sigma^2} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \beta)^T \Sigma_i^{-1} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \beta) \right]. \quad (4.37)$$

Podemos ainda obter a log-verossimilhança para o modelo, sendo dada por:

$$\begin{aligned} l(\beta, \theta, \sigma^2 \mid \mathbf{y}) = & -\frac{N}{2} \log(2\pi) - \frac{N}{2} \log \sigma^2 + \sum_{i=1}^M -\frac{1}{2} \log(|\Sigma_i|) - \\ & - \frac{1}{2\sigma^2} \left[\sum_{i=1}^M (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \beta)^T \Sigma_i^{-1} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \beta) \right], \end{aligned} \quad (4.38)$$

em que $\sum_{i=1}^M n_i = N$.

Supondo Σ_i conhecida, temos que os valores de β e σ^2 que maximizam a log-verossimilhança em (4.38) são obtidos por meio da resolução das equações

$$\frac{\partial l}{\partial \beta} = 0 \implies \sum_{i=1}^M \mathbf{X}_i^T \Sigma_i^{-1} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \beta) = 0 \quad (4.39)$$

e

$$\frac{\partial l}{\partial \sigma^2} = 0 \implies -\frac{N}{2\sigma^2} + \frac{1}{2\sigma^4} \sum_{i=1}^M (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \beta)^T \Sigma_i^{-1} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \beta) = 0. \quad (4.40)$$

Portanto, os estimadores de β e σ^2 são dados por

$$\hat{\beta}(\theta) = \left(\sum_{i=1}^M \mathbf{X}_i^T \Sigma_i^{-1} \mathbf{X}_i \right)^{-1} \sum_{i=1}^M \mathbf{X}_i^T \Sigma_i^{-1} \mathbf{y}_i, \quad (4.41)$$

$$\hat{\sigma}^2(\theta) = \frac{\sum_{i=1}^M (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\beta}(\theta))^T \Sigma_i^{-1} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\beta}(\theta))}{N}. \quad (4.42)$$

Substituindo $\hat{\sigma}^2(\theta)$ e $\hat{\beta}(\theta)$ em (4.38), obtém-se a função de log-verossimilhança

perfilada, sendo função apenas de $\boldsymbol{\theta}$:

$$l(\boldsymbol{\theta} \mid \mathbf{y}) = \frac{N}{2} \left[\log(N) - \log(2\pi) - \log \left(\sum_{i=1}^M \mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\boldsymbol{\beta}}(\boldsymbol{\theta}) \right)^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\boldsymbol{\beta}}(\boldsymbol{\theta})) - 1 \right] - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^M \log(|\boldsymbol{\Sigma}_i|) \quad (4.43)$$

A log-verossimilhança perfilada em (4.43) é maximizada com respeito a $\boldsymbol{\Sigma}_i$, obtendo o estimador de Máxima Verossimilhança $\hat{\boldsymbol{\Sigma}}_i$. Então, os estimadores de Máxima Verossimilhança $\hat{\boldsymbol{\beta}}$ e $\hat{\sigma}^2$ são obtidos substituindo $\boldsymbol{\Sigma}_i$ por $\hat{\boldsymbol{\Sigma}}_i$.

Agora, para prever os efeitos aleatórios $\mathbf{u}_i$ utiliza-se o melhor preditor linear não viesado (BLUP, do inglês Best linear unbiased prediction) (Searle [31]). Os BLUPs dos efeitos aleatórios $\mathbf{u}_i$ são obtidos por meio da distribuição conjunta das respostas $\mathbf{y}_i$ e dos efeitos aleatórios $\mathbf{u}_i$.

Considerando o modelo apresentado em (4.27) em sua forma matricial e a normalidade dos erros e dos efeitos aleatórios, temos por Henderson [13] que

$$\begin{bmatrix} \mathbf{u}_i \\ \mathbf{y}_i \end{bmatrix} \sim N \left(\begin{bmatrix} \mathbf{0} \\ \mathbf{X}_i \boldsymbol{\beta} \end{bmatrix}, \begin{bmatrix} \boldsymbol{\Psi} & \boldsymbol{\Psi} \mathbf{Z}_i^T \\ \boldsymbol{\Psi} \mathbf{Z}_i & \sigma^2 \boldsymbol{\Sigma}_i \end{bmatrix} \right), \quad (4.44)$$

e por Searle [31],

$$\mathbf{u}_i \mid \mathbf{y}_i \sim N [\boldsymbol{\Psi} \mathbf{Z}_i^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \boldsymbol{\beta}), \mathbf{W}_i], \quad (4.45)$$

em que

$$\mathbf{W}_i = (\boldsymbol{\Psi} - \boldsymbol{\Psi} \mathbf{Z}_i^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} \boldsymbol{\Psi} \mathbf{Z}_i)^{-1}. \quad (4.46)$$

Portanto, o preditor de $\mathbf{u}_i$, $i = 1, \dots, M$, é dado pelas modas condicionais dos efeitos aleatórios, avaliadas nas estimativas de $\hat{\boldsymbol{\beta}}$,

$$\hat{\mathbf{u}}_i = \boldsymbol{\Psi} \mathbf{Z}_i^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\boldsymbol{\beta}}) \quad (4.47)$$

Na prática, $\boldsymbol{\Sigma}_i$ é substituída por seu estimador de Máxima Verossimilhança $\hat{\boldsymbol{\Sigma}}_i$.

Máxima Verossimilhança Restrita

Devido ao fato da estimação das componentes de variância por Máxima Verossimilhança não levar em consideração os graus de liberdade que estão envolvidos na estimação dos efeitos fixos do modelo foi criada a estimação por Máxima Verossimilhança Restrita (REML) com o intuito de corrigir esse problema. [10, 25]

A ideia por trás da estimação por Máxima Verossimilhança Restrita consiste em

estimar as componentes de variância com base nos resíduos pós-estimação dos efeitos fixos. A REML se baseia em combinações lineares do vetor de respostas $\mathbf{y}$ escolhidas de tal forma que as combinações não contenham nenhum efeito fixo, sendo que essas combinações acabam representando os resíduos obtidos pós-estimação dos efeitos fixos.

Em Laird [19] é proposta uma metodologia Bayesiana para obtenção da função de verossimilhança restrita. Para isso é suposto que $\boldsymbol{\beta}$ possui distribuição uniforme em $\mathbb{R}^p$ e a função de verossimilhança é então obtida por meio da integração da $L(\boldsymbol{\beta}, \sigma^2, \boldsymbol{\theta})$ em $\boldsymbol{\beta}$,

$$L_R(\sigma^2, \boldsymbol{\theta}) = \int_{\boldsymbol{\beta} \in \mathbb{R}^p} L(\boldsymbol{\beta}, \sigma^2, \boldsymbol{\theta}) \, d\boldsymbol{\beta}. \quad (4.48)$$

Como visto anteriormente, a função de verossimilhança para o modelo (4.33) é dada por

$$L(\boldsymbol{\beta}, \boldsymbol{\theta}, \sigma^2 \mid \mathbf{y}) = \prod_{i=1}^M (2\pi)^{-\frac{n_i}{2}} (\sigma^2)^{-\frac{n_i}{2}} |\boldsymbol{\Sigma}_i|^{-\frac{1}{2}} \exp \left[-\frac{1}{2\sigma^2} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \boldsymbol{\beta})^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \boldsymbol{\beta}) \right]. \quad (4.49)$$

Considerando o estimador BLUE para $\hat{\boldsymbol{\beta}}$ dado por

$$\hat{\boldsymbol{\beta}}(\boldsymbol{\theta}) = \left(\sum_{i=1}^M \mathbf{X}_i^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} \mathbf{X}_i \right)^{-1} \mathbf{X}_i^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} \mathbf{y}_i \quad (4.50)$$

e a identidade abaixo apresentada em Demidenko, [6]

$$\begin{aligned} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \boldsymbol{\beta})^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \boldsymbol{\beta}) &= \\ &= (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\boldsymbol{\beta}})^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\boldsymbol{\beta}}) + (\hat{\boldsymbol{\beta}} - \boldsymbol{\beta})^T \mathbf{X}_i^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} \mathbf{X}_i (\hat{\boldsymbol{\beta}} - \boldsymbol{\beta}), \end{aligned} \quad (4.51)$$

tem-se que (4.49) pode ser reescrita e a função de verossimilhança restrita pode ser definida como

$$\begin{aligned} L(\boldsymbol{\beta}, \boldsymbol{\theta}, \sigma^2 \mid \mathbf{y}) &= \prod_{i=1}^M (2\pi)^{-\frac{n_i}{2}} (\sigma^2)^{-\frac{n_i}{2}} |\boldsymbol{\Sigma}_i|^{-\frac{1}{2}} \exp \left[-\frac{1}{2\sigma^2} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\boldsymbol{\beta}})^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\boldsymbol{\beta}}) \right] \times \\ &\times \int_{\boldsymbol{\beta} \in \mathbb{R}^p} \exp \left[-\frac{1}{2\sigma^2} (\hat{\boldsymbol{\beta}} - \boldsymbol{\beta})^T \mathbf{X}_i^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} \mathbf{X}_i (\hat{\boldsymbol{\beta}} - \boldsymbol{\beta}) \right] \, d\boldsymbol{\beta}. \end{aligned} \quad (4.52)$$

Sabendo por Demidenko [6] que

$$\int_{z \in \mathbb{R}^p} \exp \left[-\frac{1}{2} (z - m)^T A^{-1} (z - m) \right] \, dz = (2\pi)^{\frac{p}{2}} |A|^{-\frac{1}{2}}, \quad (4.53)$$

para todo vetor $m_{p \times 1}$ e toda matriz $A_{p \times p}$ positiva definida, logo

$$L(\sigma^2, \boldsymbol{\theta} \mid \mathbf{y}) = \prod_{i=1}^M (2\pi)^{-\frac{n_i}{2}} (2\pi)^{\frac{p}{2}} (\sigma^2)^{-\frac{n_i}{2}} |\boldsymbol{\Sigma}_i|^{-\frac{1}{2}} |\mathbf{X}_i^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} \mathbf{X}_i|^{-\frac{1}{2}} \times \\ \times \exp \left[-\frac{1}{2\sigma^2} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\boldsymbol{\beta}})^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\boldsymbol{\beta}}) \right]. \quad (4.54)$$

Pode-se ainda obter a log-verossimilhança dada por

$$l(\boldsymbol{\theta}, \sigma^2 \mid \mathbf{y}) = -\frac{1}{2} \left[(N-p)(\log(2\pi) + \log(\sigma^2)) + \log \left| \sum_{i=1}^M \mathbf{X}_i^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} \mathbf{X}_i \right| + \right. \\ \left. + \sum_{i=1}^M \left(\log |\boldsymbol{\Sigma}_i| + \frac{1}{\sigma^2} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\boldsymbol{\beta}})^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\boldsymbol{\beta}}) \right) \right]. \quad (4.55)$$

Maximizando a log-verossimilhança em função de σ^2 , tem-se que

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{\sum_{i=1}^M (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\boldsymbol{\beta}})^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\boldsymbol{\beta}})}{N-p}. \quad (4.56)$$

Substituindo $\hat{\sigma}^2$ em (4.55), tem-se que a função log-verossimilhança fica em função apenas de $\boldsymbol{\Sigma}_i$:

$$l(\boldsymbol{\theta} \mid \mathbf{y}) = -\frac{1}{2} \left[N-p \log(2\pi) + \log \left(\sum_{i=1}^M (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\boldsymbol{\beta}})^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} (\mathbf{y}_i - \mathbf{X}_i \hat{\boldsymbol{\beta}}) \right) + \right. \\ \left. + \log \left| \sum_{i=1}^M \mathbf{X}_i^T \boldsymbol{\Sigma}_i^{-1} \mathbf{X}_i \right| + \sum_{i=1}^M \log |\boldsymbol{\Sigma}_i| \right]. \quad (4.57)$$

A maximização da $l(\boldsymbol{\theta} \mid \mathbf{y})$ em relação a $\boldsymbol{\Sigma}_i$ por meio de ferramentas computacionais proporciona a obtenção do estimador de $\boldsymbol{\Sigma}_i$. Com isso podemos obter os estimadores de $\boldsymbol{\beta}$ e σ^2 substituindo $\boldsymbol{\Sigma}_i$ pelo seu estimador $\hat{\boldsymbol{\Sigma}}_i$.

Modelo Linear Misto com dois níveis

O Modelo Linear Misto considerando dois níveis de aleatorização hierárquicos, segue a mesma estruturação que o Modelo Linear Misto com apenas um nível apresentado na seção 4.1.2.

Sendo assim, tem-se que o modelo com dois níveis pode ser representado da seguinte maneira:

$$\mathbf{y}_{ij} = \mathbf{X}_{ij} \boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}_{i,j} \mathbf{u}_i + \mathbf{Z}_{ij} \mathbf{u}_{ij} + \boldsymbol{\epsilon}_{ij}; \quad i = 1, \dots, M; j = 1, \dots, M_i, \quad (4.58)$$

tendo

$$\boldsymbol{\epsilon}_{ij} \sim N(\mathbf{0}; \sigma^2 I), \quad (4.59)$$

$$\mathbf{u}_i \sim N(\mathbf{0}; \boldsymbol{\Psi}_1), \quad (4.60)$$

$$\mathbf{u}_{ij} \sim N(\mathbf{0}; \boldsymbol{\Psi}_2), \quad (4.61)$$

e $\boldsymbol{\Psi}_1$ e $\boldsymbol{\Psi}_2$ positivas definidas.

Supõe-se que $\mathbf{u}_i$ são independentes para diferentes i , $\mathbf{u}_{ij}$ são independentes para diferentes i ou j e independentes de $\mathbf{u}_i$. Os erros intra-grupo $\boldsymbol{\epsilon}_{ij}$ são independentes para diferentes i ou j e independentes entre os efeitos aleatórios.

Considerando os mesmos passos realizados para o Modelo Linear Misto com apenas um nível, tem-se que a distribuição marginal das respostas $\mathbf{y}_{ij}$ é dada por

$$\mathbf{y}_{ij} \sim N(\mathbf{X}_{ij}\boldsymbol{\beta}; \boldsymbol{\Sigma}_{ij}), \quad (4.62)$$

em que

$$\boldsymbol{\Sigma}_{ij} = \mathbf{I} + \frac{\mathbf{Z}_{i,j}\boldsymbol{\Psi}_1\mathbf{Z}_{i,j}^T + \mathbf{Z}_{ij}\boldsymbol{\Psi}_2\mathbf{Z}_{ij}^T}{\sigma^2}. \quad (4.63)$$

Com base na distribuição marginal de $\mathbf{y}_{ij}$ podem ser obtidos os estimadores do modelo e os preditores dos efeitos aleatórios.

Considerando primeiramente a estimação por Máxima Verossimilhança, tem-se que a função de verossimilhança para o modelo é dada por:

$$\begin{aligned} L(\boldsymbol{\beta}, \boldsymbol{\Sigma}_{ij}, \sigma^2 \mid \mathbf{y}) &= \prod_{i=1}^M \prod_{j=1}^{M_i} (2\pi)^{-\frac{n_{ij}}{2}} (\sigma^2)^{-\frac{n_{ij}}{2}} |\boldsymbol{\Sigma}_{ij}|^{-\frac{1}{2}} \times \\ &\times \exp \left[-\frac{1}{2\sigma^2} (\mathbf{y}_{ij} - \mathbf{X}_{ij}\boldsymbol{\beta})^T \boldsymbol{\Sigma}_{ij}^{-1} (\mathbf{y}_{ij} - \mathbf{X}_{ij}\boldsymbol{\beta}) \right]. \end{aligned} \quad (4.64)$$

Pode-se ainda obter a log-verossimilhança para o modelo, sendo dada por:

$$\begin{aligned} l(\boldsymbol{\beta}, \boldsymbol{\Sigma}_{ij}, \sigma^2 \mid \mathbf{y}) &= -\frac{N}{2} \log(2\pi) - \frac{N}{2} \log \sigma^2 + \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^{M_i} -\frac{1}{2} \log(|\boldsymbol{\Sigma}_{ij}|) - \\ &- \frac{1}{2\sigma^2} \left[\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^{M_i} (\mathbf{y}_{ij} - \mathbf{X}_{ij}\boldsymbol{\beta})^T \boldsymbol{\Sigma}_{ij}^{-1} (\mathbf{y}_{ij} - \mathbf{X}_{ij}\boldsymbol{\beta}) \right], \end{aligned} \quad (4.65)$$

em que, $\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^{M_i} n_{ij} = N$.

Os estimadores de β e de σ^2 são dados por:

$$\hat{\beta}(\Sigma_{ij}) = \left(\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^{M_i} \mathbf{X}_{ij}^T \Sigma_{ij}^{-1} \mathbf{X}_{ij} \right)^{-1} \mathbf{X}_{ij}^T \Sigma_{ij}^{-1} \mathbf{y}_{ij} \quad (4.66)$$

e

$$\hat{\sigma}^2(\Sigma_{ij}) = \frac{\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^{M_i} (\mathbf{y}_{ij} - \mathbf{X}_{ij} \hat{\beta})^T \Sigma_{ij}^{-1} (\mathbf{y}_{ij} - \mathbf{X}_{ij} \hat{\beta})}{N}, \quad (4.67)$$

sendo que, ao substituir esses resultados em (4.65), obtém-se a log-verossimilhança em função apenas de Σ_{ij} ,

$$\begin{aligned} l(\Sigma_{ij} \mid \mathbf{y}) &= \\ &= \frac{N}{2} \left[\log(N) - \log(2\pi) - \log \left(\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^{M_i} (\mathbf{y}_{ij} - \mathbf{X}_{ij} \hat{\beta}(\Sigma_{ij}))^T \Sigma_{ij}^{-1} (\mathbf{y}_{ij} - \mathbf{X}_{ij} \hat{\beta}(\Sigma_{ij})) \right) - 1 \right] - \\ &- \frac{1}{2} \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^{M_i} \log(|\Sigma_{ij}|). \end{aligned} \quad (4.68)$$

A log-verossimilhança perfilada é maximizada com respeito a Σ_{ij} , obtendo o estimador de Máxima Verossimilhança $\hat{\Sigma}_{ij}$. Então, os estimadores de Máxima Verossimilhança $\hat{\beta}$ e $\hat{\sigma}^2$ são obtidos substituindo Σ_{ij} por $\hat{\Sigma}_{ij}$.

Considerando agora a estimação dos parâmetros por Máxima Verossimilhança Restrita que corrige os graus de liberdade das componentes de variância de acordo com o número de efeitos fixos presentes no modelo, assim como foi realizado para o Modelo Linear Misto com apenas um nível, a função de verossimilhança para o modelo com dois níveis é obtida por meio da integração da verossimilhança completa em β ,

$$L_R(\sigma^2, \Sigma_{ij}) = \int_{\beta \in \mathbb{R}^p} L(\beta, \sigma^2, \Sigma_{ij}) d\beta. \quad (4.69)$$

Considerando o estimador BLUE para β e o estimador para σ^2 dados a seguir:

$$\hat{\beta}(\Sigma_{ij}) = \left(\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^{M_i} \mathbf{X}_{ij}^T \Sigma_{ij}^{-1} \mathbf{X}_{ij} \right)^{-1} \mathbf{X}_{ij}^T \Sigma_{ij}^{-1} \mathbf{y}_{ij}, \quad (4.70)$$

$$\hat{\sigma}^2(\Sigma_{ij}) = \frac{\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^{M_i} (\mathbf{y}_{ij} - \mathbf{X}_{ij} \hat{\beta})^T \Sigma_{ij}^{-1} (\mathbf{y}_{ij} - \mathbf{X}_{ij} \hat{\beta})}{N - p}, \quad (4.71)$$

e seguindo os mesmos passos realizados anteriormente para o modelo com um único

nível, tem-se que a log-verossimilhança somente em termos de Σ_{ij} é dada por:

$$l(\Sigma_{ij} \mid \mathbf{y}) = -\frac{1}{2} \left[N - p \log(2\pi) + \log \left(\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^{M_i} (\mathbf{y}_{ij} - \mathbf{X}_{ij} \hat{\boldsymbol{\beta}})^T \Sigma_i^{-1} (\mathbf{y}_{ij} - \mathbf{X}_{ij} \hat{\boldsymbol{\beta}}) \right) + \right. \\ \left. + \log \left| \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^{M_i} \mathbf{X}_{ij}^T \Sigma_{ij}^{-1} \mathbf{X}_{ij} \right| + \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^{M_i} \log |\Sigma_{ij}| \right], \quad (4.72)$$

$l(\Sigma_{ij} \mid \mathbf{y})$ deve ser maximizada em termos de Σ_{ij} por meio de ferramentas computacionais para obtenção do estimador de Σ_{ij} . Com o estimador $\hat{\Sigma}_{ij}$ é possível obter os estimadores por Máxima Verossimilhança Restrita de $\boldsymbol{\beta}$ e σ^2 , bastando substituir Σ_{ij} por $\hat{\Sigma}_{ij}$.

Resíduos

Para os Modelos Lineares Mistos, pode-se obter três tipos de fontes aleatórias:

- ϵ : erro condicional;
- u_i : efeitos aleatórios;
- ϵ^* : erro marginal.

O ideal seria prever tais quantidades por meio de um resíduo que seja função de uma única fonte de variação e que seja dado por quantidades conhecidas. Quando isso é possível, diz-se que tal resíduo é puro.

Por outro lado, um resíduo que depende de outras fontes de variação além da fonte de interesse é denominado resíduo com confundimento.

Considerando que o objetivo de utilizar modelos de normalização está relacionado com a retirada de fontes de variação que não são de interesse por meio da utilização dos resíduos desse modelo, têm-se que os resíduos podem ser considerados como novas observações, sem viés e acuradas.

Dessa forma, a obtenção dos resíduos condicionais e/ou marginais são de interesse neste trabalho.

Resíduos condicionais

Considerando o modelo apresentado em (4.58), tem-se que, ao considerar o modelo em sua forma matricial, os resíduos condicionais podem ser obtidos da seguinte maneira:

$$\hat{\boldsymbol{\epsilon}} = \mathbf{y} - \mathbf{X}\hat{\boldsymbol{\beta}} - \mathbf{Z}\hat{\mathbf{u}}, \quad (4.73)$$

sendo $\hat{\boldsymbol{\beta}}$ o EBLUE de $\boldsymbol{\beta}$ e $\hat{\mathbf{u}}$ o EBLUP de $\mathbf{u}$.

Resíduos marginais

Agora, para obter os resíduos marginais referentes ao modelo apresentado em (4.58), basta resolver a seguinte equação:

$$\hat{\epsilon}^* = \mathbf{y} - \mathbf{X}\hat{\beta}, \quad (4.74)$$

sendo $\hat{\beta}$ o EBLUE de β .

Ferramenta R – funções lme e lmer

Os Modelos Lineares Mistos com um e dois níveis apresentados em (4.30) e (4.58) podem ser analisados e estimados por meio do software estatístico R com as seguintes funções `lme` e `lmer` dos pacotes **nlme** e **lme4** respectivamente. [3, 29]

```

1 # B efeitos fixos
2 # u1 e u2 efeitos aleatórios
3
4 library(nlme)
5 library(lme4)
6
7 # Modelo Linear Misto com um nível
8
9 # Pacote nlme
10 model1 <- lme(fixed = y ~ B, random = ~ 1 | u1, data = data)
11 model1
12
13 # Tabela de Análise de Variância
14 anova(model1)
15 intervals(model1)
16
17 # Pacote lme4
18 model2 <- lmer(y ~ B + (1|u1) , REML = TRUE, data = data)
19 model2
20 summary(model2)
21
22 # Modelo Linear Misto com mais de um nível
23 # u2 aninhado ao u1
24
25
26 # Pacote nlme
27 model1 <- lme(fixed = y ~ B, random = ~ 1|u1/u2, data = data)
28 model1
29
30 # Tabela de Análise de Variância
31 anova(model1)
32 intervals(model1)

```

```

33
34 # Pacote lme4
35
36 model2 <- lmer(y ~ B + (1 | u1 / u2),
37               REML = TRUE,
38               family = gaussian,
39               data = data)
40
41 model2
42 summary(model2)
43
44 # Predição dos efeitos aleatórios
45 ranef(model2)

```

4.1.3 Modelo Linear Misto com erros heterocedásticos

Os modelos apresentados anteriormente restringem que o erro intragrupo ϵ_{ij} seja considerado independente e identicamente distribuído com média zero e variância constante. Nesta seção o Modelo Linear Misto com um e dois níveis será estendido para possibilitar erros heterocedásticos.

Primeiramente, considere o Modelo Linear Misto com um único nível apresentado em 4.1.2, porém sem a suposição da homocedasticidade dos erros. Pode-se definir tal modelo da seguinte maneira:

$$\mathbf{y}_i = \mathbf{X}_i \boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}_i \mathbf{u}_i + \boldsymbol{\epsilon}_i; \quad i = 1, \dots, M, \quad (4.75)$$

na qual,

$$\boldsymbol{\epsilon}_i \sim N(\mathbf{0}; \sigma^2 \boldsymbol{\Lambda}_i), \quad (4.76)$$

$$\mathbf{u}_i \sim N(\mathbf{0}; \boldsymbol{\Psi}), \quad (4.77)$$

e $\boldsymbol{\Psi}$ e $\boldsymbol{\Lambda}_i$ são positivas definidas.

Os erros $\boldsymbol{\epsilon}_i$ e os efeitos aleatórios $\mathbf{u}_i$ são independentes para diferentes grupos e entre si no mesmo grupo.

Por Thisted [35], como $\boldsymbol{\Lambda}_i$ é positiva definida pode-se obter $\boldsymbol{\Lambda}_i^{\frac{1}{2}}$, com inversa $\boldsymbol{\Lambda}_i^{-\frac{1}{2}}$.

Portanto,

$$\boldsymbol{\Lambda}_i = \left(\boldsymbol{\Lambda}_i^{\frac{1}{2}} \right)^T \boldsymbol{\Lambda}_i^{\frac{1}{2}} \quad (4.78)$$

e

$$\boldsymbol{\Lambda}_i^{-1} = \left(\boldsymbol{\Lambda}_i^{-\frac{1}{2}} \right)^T \boldsymbol{\Lambda}_i^{-\frac{1}{2}}. \quad (4.79)$$

Define-se,

$$\mathbf{y}_i^* = \left(\mathbf{\Lambda}_i^{-\frac{1}{2}}\right)^T \mathbf{y}_i, \quad (4.80)$$

$$\boldsymbol{\epsilon}_i^* = \left(\mathbf{\Lambda}_i^{-\frac{1}{2}}\right)^T \boldsymbol{\epsilon}_i, \quad (4.81)$$

$$\mathbf{X}_i^* = \left(\mathbf{\Lambda}_i^{-\frac{1}{2}}\right)^T \mathbf{X}_i, \quad (4.82)$$

e

$$\mathbf{Z}_i^* = \left(\mathbf{\Lambda}_i^{-\frac{1}{2}}\right)^T \mathbf{Z}_i. \quad (4.83)$$

Considerando as transformações realizadas, temos que

$$\boldsymbol{\epsilon}_i^* \sim N \left[\left(\mathbf{\Lambda}_i^{-\frac{1}{2}}\right)^T \mathbf{0}; \sigma^2 \left(\mathbf{\Lambda}_i^{-\frac{1}{2}}\right)^T \mathbf{\Lambda}_i \left(\mathbf{\Lambda}_i^{-\frac{1}{2}}\right) \right]. \quad (4.84)$$

Logo,

$$\boldsymbol{\epsilon}_i^* \sim N[\mathbf{0}; \sigma^2 I]. \quad (4.85)$$

Dessa forma, o modelo (4.75) pode ser reescrito como

$$\mathbf{y}_i^* = \mathbf{X}_i^* \boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}_i^* \mathbf{u}_i + \boldsymbol{\epsilon}_i^*; \quad i = 1, \dots, M, \quad (4.86)$$

no qual

$$\boldsymbol{\epsilon}_i^* \sim N(\mathbf{0}; \sigma^2 I) \quad (4.87)$$

e

$$\mathbf{u}_i \sim N(\mathbf{0}; \boldsymbol{\Psi}). \quad (4.88)$$

Tem-se que o modelo (4.86) é equivalente ao Modelo Linear Misto Homocedástico com apenas um nível apresentado na seção 4.1.2.

Devido à transformação $\mathbf{y}_i^* = \left(\mathbf{\Lambda}_i^{-\frac{1}{2}}\right)^T \mathbf{y}_i$, tem-se que $d\mathbf{y}_i^* = |\mathbf{\Lambda}_i^{-\frac{1}{2}}| d\mathbf{y}_i$. Portanto, a função de verossimilhança $L(\boldsymbol{\beta}, \sigma^2, \lambda, \boldsymbol{\Sigma}_i)$ para o modelo é dada por,

$$L(\boldsymbol{\beta}, \sigma^2, \lambda, \boldsymbol{\Sigma}_i | \mathbf{y}) = L(\boldsymbol{\beta}, \sigma^2, \lambda, \boldsymbol{\Sigma}_i | \mathbf{y}^*) \prod_{i=1}^M |\mathbf{\Lambda}_i^{-\frac{1}{2}}|, \quad (4.89)$$

em que λ representa os parâmetros que definem $\mathbf{\Lambda}_i$.

Dessa forma, $L(\boldsymbol{\beta}, \sigma^2, \lambda, \boldsymbol{\Sigma}_i | \mathbf{y}^*)$ corresponde à verossimilhança do Modelo Linear Misto Homocedástico, podendo assim considerar os resultados obtidos na seção 4.1.2 como equivalentes para o modelo apresentado em 4.86.

Além disso, pode-se ainda obter a função de verossimilhança restrita para o modelo, bastando integrar a verossimilhança em relação à β , obtendo

$$L_R(\sigma^2, \Sigma_i, \lambda \mid \mathbf{y}) = \int_{\beta \in \mathbb{R}^p} L(\beta, \sigma^2, \Sigma_i, \lambda \mid \mathbf{y}) d\beta \quad (4.90)$$

$$= L_R(\beta, \sigma^2, \Sigma_i, \lambda \mid \mathbf{y}^*) \prod_{i=1}^M \left| \Lambda_i^{-\frac{1}{2}} \right|, \quad (4.91)$$

sendo que, $L_R(\beta, \sigma^2, \Sigma_i, \lambda \mid \mathbf{y}^*)$ equivale à verossimilhança restrita obtida para o Modelo Linear Misto Homocedástico na seção 4.1.2.

Analogamente, pode-se obter as funções de verossimilhança para o caso em que se tem mais de um nível no modelo.

Sendo assim, a função de verossimilhança para o Modelo Linear Misto com dois níveis e erros heterocedásticos é dada por:

$$L(\beta, \sigma^2, \lambda, \Sigma_{ij} \mid \mathbf{y}) = L(\beta, \sigma^2, \lambda, \Sigma_{ij} \mid \mathbf{y}^*) \prod_{i=1}^M \prod_{j=1}^{M_i} \left| \Lambda_{ij}^{-\frac{1}{2}} \right|, \quad (4.92)$$

em que, $L(\beta, \sigma^2, \lambda, \Sigma_{ij} \mid \mathbf{y}^*)$ corresponde à verossimilhança do Modelo Linear Misto Homocedástico com dois níveis.

Assim, pode-se obter a função de verossimilhança restrita para o modelo, sendo dada por

$$L_R(\sigma^2, \Sigma_{ij}, \lambda \mid \mathbf{y}) = \int_{\beta \in \mathbb{R}^p} L(\beta, \sigma^2, \Sigma_{ij}, \lambda \mid \mathbf{y}) d\beta. \quad (4.93)$$

$$= L_R(\beta, \sigma^2, \Sigma_{ij}, \lambda \mid \mathbf{y}^*) \prod_{i=1}^M \prod_{j=1}^{M_i} \left| \Lambda_{ij}^{-\frac{1}{2}} \right|. \quad (4.94)$$

Portanto, pode-se considerar os resultados obtidos para o Modelo Homocedástico, porém considerando o termo $\left| \Lambda_{ij}^{-\frac{1}{2}} \right|$ a mais, sendo que, Λ_{ij} deve ser estimada, assim como Σ_{ij} , por meio de ferramentas computacionais.

Resíduos condicionais

Os resíduos condicionais para o modelo heterocedástico podem ser obtidos seguindo a mesma lógica que os do modelo homocedástico, sendo possível obter os resíduos condicionais a partir da equação a seguir:

$$\hat{\epsilon} = \mathbf{y} - \mathbf{X}\hat{\beta} - \mathbf{Z}\hat{\mathbf{u}}, \quad (4.95)$$

em que $\hat{\beta}$ é o EBLUE de β e $\hat{u}$ é o EBLUP de u .

Resíduos marginais

A obtenção dos resíduos marginais do modelo heterocedástico é dada pela solução da seguinte equação:

$$\hat{\epsilon}^* = y - X\hat{\beta}, \quad (4.96)$$

sendo $\hat{\beta}$ o EBLUE de β .

Ferramenta R – função lme

Os Modelos Lineares Mistos Heterocedásticos com um e mais níveis podem ser estimados e avaliados por meio da função `lme` do pacote **nlme**.

```

1 # B efeitos fixos
2 # u1 e u2 efeitos aleatórios
3
4 library(nlme)
5 library(lme4)
6
7 # Modelo Linear Misto Heterocedástico com um nível
8
9 # Pacote nlme
10
11 g1 <- as.factor(data$u1)
12 model1 <- lme(fixed = y ~ B, random = ~ 1 | u1,
13              weights = varIdent(form = ~ 1 | g1),
14              method = REML,
15              data = data)
16 model1
17
18 # Tabela de Análise de Variância
19 anova(model1)
20 intervals(model1)
21
22 # Modelo Linear Misto Heterocedástico com mais de um nível
23
24 # u2 aninhado a u1
25 # Pacote nlme
26
27 model1 <- lme(fixed = y ~ B, random = ~ 1 | u1 / u2,
28              weights = varIdent(form = ~ 1 | g1),
29              REML = TRUE,
30              data = data)
31 model1
32
```

```

33 # Tabela de Análise de Variância
34 anova(model1)

```

4.2 Modelo de significância

Um dos objetivos principais em estudos proteômicos consiste em detectar mudanças significantes na abundância de proteínas de acordo com diferentes condições que estão sendo avaliadas. A análise de significância nesses estudos é comumente realizada por meio de Testes t em que são comparadas as médias das abundâncias das proteínas entre pares de condições de interesse, em geral, seguidos com correções para múltiplos testes no valor de p , o nível descritivo global. Todavia, é comum ter um número pequeno de amostras, o que pode gerar imprecisão nas estimativas da variabilidade amostral, influenciando na detecção das proteínas com verdadeira expressão diferencial. Muitas vezes proteínas com um alto valor de *fold-change*, ou seja, que apresentam uma grande variação entre diferentes condições (ex. controle e tratamento) são consideradas não significantes. Enquanto, proteínas com baixo *fold-change* são consideradas significantes por apresentarem baixa variabilidade amostral.

Neste trabalho é proposto a utilização de um modelo linear heterocedástico, considerando os resíduos estimados pelo modelo de normalização apresentado na seção 4.1, para avaliar a significância das variáveis (proteínas e peptídeos) na comparação de grupos de interesse.

Dessa forma, para cada variável (peptídeo e proteína) será estimado o modelo a seguir e, por meio dos resultados obtidos, serão realizadas comparações múltiplas com correção da taxa de falsos positivos pelo método FDR [34] dos fatores de interesse (método dentro de tecido) para identificação das variáveis sensíveis aos diferentes métodos de preparação de amostras utilizados. A visualização dos resultados será realizada por meio dos gráficos de vulcão [20], possibilitando a identificação de variáveis com alto valor de *fold-change* e significantes estatisticamente.

A análise de significância será avaliada por meio da estimação do seguinte modelo linear heterocedástico.

$$\hat{r}_{ijkl} = \mu_l + M_j + M(T)_{j(i)} + \epsilon_{ijkl}, \quad (4.97)$$

em que,

$$\epsilon_{ijkl} \sim N_1(0; \sigma_{ijl}^2). \quad (4.98)$$

Nesta análise os resíduos condicionais obtidos pelo modelo de normalização, referentes a cada variável (peptídeo ou proteína), são modelados separadamente, com o intuito de identificar os peptídeos e proteínas com comportamento diferencial biológico e estatístico ao se avaliar os diferentes métodos de preparação de amostras estudados.

4.3 Racional da Análise

Considerando a metodologia apresentada temos a seguir o Racional da Análise para cada recorte dos dados fornecido pelo método de espectrometria de massa. Este

trabalho tem como objetivo geral comparar os diferentes métodos de preparação de amostras em busca de identificar o mais preciso. Os modelos de normalização a serem ajustados já partirão da suposição de presença de efeitos aleatórios, uma vez que o experimento foi construído seguindo uma estrutura Split-Split-Plot, em que as observações avaliadas são correlacionadas de forma hierárquica entre si.

1. Ajustar o modelo de normalização M2: Modelo Linear Misto homocedástico.
2. Ajustar o modelo de normalização M3: Modelo Linear Misto heterocedástico devido ao efeito do tecido.
3. Ajustar o modelo de normalização M4: Modelo Linear Misto heterocedástico devido ao efeito do método dentro do tecido.
4. Comparar a performance dos modelos ajustados e escolher o “melhor” ajuste.
5. Ajustar o modelo de significância para cada variável considerando os resíduos do modelo de normalização.
6. Realizar comparações múltiplas com controle de falsos positivos (FDR) para identificar proteínas e peptídeos com comportamento diferencial entre os fatores sob estudo e visualizar os resultados por meio dos gráficos vulcão.

Além disso, serão comparados os resultados obtidos pela metodologia de normalização proposta neste trabalho com os resultados da metodologia TIC.

4.4 Análises Multivariadas

É importante ressaltar que a Análise de Normalização é realizada considerando todas as proteínas (ou peptídeos) quantificadas simultaneamente em cada ajuste. Isto tem sido recomendado (ver, por exemplo, Wolfinger *et al.* [38]) para finalidade de tornar comparáveis as quantificações das variáveis (proteínas, bem como peptídeos). Já a Análise de Significância é realizada para os dados de cada variável (proteína e peptídeo) separadamente. No entanto, em estudos ômicos, em particular os baseados em espectrometria de massa, é comum o interesse em trabalhar com os dados de forma a estruturar as quantificações das proteínas (ou peptídeos) como respostas multivariadas, avaliadas de acordo com o delineamento sob estudo.

Neste contexto, o trabalho desenvolvido por Smilde *et al.* [32] permite decompor a matriz de dados multivariados em componentes que respeitam as fontes de variação adotadas no delineamento experimental. O método proposto, denominado ASCA (Anova-Simultaneous Component Analysis), permite realizar análises multivariadas, como Componentes Principais, em partições específicas da matriz original de dados multivariados. Essa teoria, devotada à matriz retangular de dados multivariados, segue um paralelo com a decomposição imposta às Somas de Quadrados e Produtos Cruzados da MANOVA, equivalentemente, às Somas de Quadrados Total em uma ANOVA, dividindo as variações e covariações em componentes ortogonais e independentes.

Deste modo, por meio da ASCA os autores introduziram uma estratégia flexível e criaram algoritmos para decomposição dos dados multivariados em componentes ortogonais, sendo possível assim estudar efeitos específicos de interesse e comparar as variáveis coletadas de forma simultânea.

Aplicando esta teoria ao experimento em proteômica analisado neste trabalho, temos que a ASCA pode ser utilizada para decompor os dados nas componentes de variação relacionadas aos efeitos de tecido e de método aninhado ao tecido.

Para isso, em cada experimento MS, serão consideradas como variáveis respostas multivariadas as quantificações não correlacionadas e homocedásticas que passaram pelos modelos de normalização e de significância.

Neste estudo é de interesse avaliar a matriz correspondente ao efeito do método dentro do tecido, denotada por $\mathbf{M}(\mathbf{T})_{80 \times F}$, sendo F o número de proteínas e peptídeos (*features*) quantificadas. Considerando essa componente dos dados totais, serão avaliadas duas técnicas multivariadas, quais sejam Análise de Componentes Principais e Grafos Probabilísticos para representação e entendimento do efeito do método dentro do tecido.

$$y_{ftmr} = \bar{y}_f + (\bar{y}_{ft} - \bar{y}_f) + (\bar{y}_{ftm} - \bar{y}_{ft}) + (y_{ftmr} - \bar{y}_{ftm}), \quad (4.99)$$

$$\mathbf{Y}_{tmr} = \bar{\mathbf{Y}} + (\bar{\mathbf{Y}}_t - \bar{\mathbf{Y}}) + (\bar{\mathbf{Y}}_{tm} - \bar{\mathbf{Y}}_t) + (\mathbf{Y}_{tmr} - \bar{\mathbf{Y}}_{tm}), \quad (4.100)$$

$$\mathbf{Y}_{80 \times F} = \mathbf{M}_{80 \times F} + \mathbf{T}_{80 \times F} + \mathbf{M}(\mathbf{T})_{80 \times F} + \mathbf{E}_{80 \times F}, \quad (4.101)$$

4.4.1 Análise de Componentes Principais

Considerando a decomposição dos dados realizada pela ASCA é possível avaliar por meio da utilização de Componentes Principais e do correspondente Biplot, tanto a representação do efeito de método dentro do tecido (definido em termos das linhas da matriz de dados) quanto dos peptídeos ou proteínas quantificados (variáveis nas colunas da matriz). Dessa forma, podem ser identificadas observações atípicas e até mesmo agrupamento nos dados.

A Análise de Componentes Principais (ACP) é uma técnica multivariada, que tem como objetivo explicar a variabilidade de um conjunto de variáveis com menor perda de informação possível por meio da utilização de combinações lineares dessas variáveis. Essas combinações são denominadas componentes, sendo não correlacionadas entre si e são estimadas por grau de maior explicação, ou seja, a primeira componente é a que possui a maior proporção da variabilidade explicada em relação a variação total presente nos dados, seguida da segunda com maior grau e assim por diante.

Considere $\mathbf{X}_1, \dots, \mathbf{X}_p$ em $\mathbb{R}^n$, um conjunto de p variáveis aleatórias sendo avaliadas em n unidades amostrais. Em nossa aplicação, exceto o experimento SRM, n é muito menor que p tratando-se portanto de dados de alta dimensão (big-p). Neste caso, há diferentes alternativas para se obter os componentes principais, por exemplo, via soluções esparsas [40]. De maneira geral, restringe-se à obtenção das duas primeiras componentes principais, que possibilitam visualizar a estrutura dos dados por meio de gráficos bidimensionais.

Algebricamente as componentes principais representam um novo sistema de coordenadas ortogonal e não correlacionado. As novas coordenadas representam as direções em que a variabilidade é máxima, sendo possível obter uma estrutura de covariâncias e variâncias mais simples e parcimoniosa. A obtenção das componentes principais pode ser realizada por meio da utilização da matriz de covariâncias ou de correlações das variáveis originais. Suponha que $\mathbf{X}' = [\mathbf{X}_1, \dots, \mathbf{X}_p]$ possui a matriz de covariâncias Σ com autovalores $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_p \geq 0$. Sendo que para cada autovalor, existe um autovetor $\mathbf{a}_1, \dots, \mathbf{a}_p$ associado.

Utilizando os autovetores é possível obter as seguintes combinações lineares, conhecidas como componentes principais:

$$\mathbf{Y}_1 = \mathbf{a}'_1 \mathbf{X} = a_{11}\mathbf{X}_1 + \dots + a_{1p}\mathbf{X}_p \quad (4.102)$$

$$\mathbf{Y}_2 = \mathbf{a}'_2 \mathbf{X} = a_{21}\mathbf{X}_1 + \dots + a_{2p}\mathbf{X}_p \quad (4.103)$$

$$\vdots$$

$$\mathbf{Y}_p = \mathbf{a}'_p \mathbf{X} = a_{p1}\mathbf{X}_1 + \dots + a_{pp}\mathbf{X}_p \quad (4.104)$$

Sendo que,

$$\text{Var}(\mathbf{Y}_i) = \mathbf{a}'_i \Sigma \mathbf{a}_i, \quad i = 1, \dots, p \quad (4.105)$$

$$\text{Cov}(\mathbf{Y}_i, \mathbf{Y}_k) = \mathbf{a}'_i \Sigma \mathbf{a}_k, \quad i \neq k, \quad i, k = 1, \dots, p \quad (4.106)$$

Pode ser estabelecida equivalência entre ACP e Análise de Coordenadas Principais, ACoP, ou Escalonamento Multidimensional [7]. Este resultado é bastante importante e útil na redução de dimensionalidade em big-data, como uma alternativa inicial às soluções esparsas. Se $n \ll p$ é mais conveniente obter as Coordenadas Principais cuja decomposição espectral envolvida está baseada na forma quadrática de dimensão n , isto é na matriz de distâncias Euclidianas entre as observações. Se $n \gg p$ é mais conveniente obter os Componentes Principais, já que estão baseados na decomposição espectral da forma quadrática na dimensão p . Esses dois caminhos conduzem a soluções equivalentes. Outras informações sobre a Análise de Componentes Principais podem ser encontradas em Johnson & Wichern. [15]

4.4.2 Análise de Grafos Probabilísticos

Em estudos ômicos é comum ser de interesse avaliar as relações existentes entre fenótipos, proteínas e peptídeos estudados para entender melhor os fatores associados às doenças e para auxiliar na identificação de possíveis tratamentos. Durante muito tempo esse tipo de análise era realizado pela estimação da correlação de Pearson entre as variáveis, identificando associações e não causalidades.

Portanto, foram desenvolvidos métodos probabilísticos para estimar as classes de equivalência da estrutura direcionada entre as variáveis, possibilitando a identificação de possíveis fatores associados às doenças. No qual, a utilização de estudos experimentais controlados e aleatorizados é considerado o padrão ouro para inferir causalidade entre variáveis.

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo avaliar de forma descritiva a estimação da estrutura de causalidade entre as variáveis estudadas, com foco na utilização

de grafos acíclicos direcionados (DAG) considerando os resultados dos experimentos descritos no Capítulo 3, especificamente entre as proteínas, bem como entre os peptídeos.

As definições e conceitos referentes as suposições dos modelos para análise de grafos probabilísticos podem ser encontrados em Spirtes *et al.* [33] e Pearl [26].

A estimação das classes de equivalência é muitas vezes dada pela utilização de algoritmos automatizados. O algoritmo de PC (Peter-Clark) foi um dos primeiros algoritmos desenvolvidos, bastante utilizado por ser capaz de inferir a estrutura causal em um grande volume de dados esparsos, porém possui como suposição a suficiência causal, que nem sempre é satisfeita. Este trabalho, para efeito de exemplificação e por conveniência, utilizará o algoritmo PC para avaliar a causalidade entre as proteínas e os peptídeos quantificados e identificados nos experimentos. No entanto, existem diversos algoritmos que relaxam a suposição de suficiência causal e que podem ser utilizados para avaliar causalidade em estudos proteômicos.

O algoritmo PC inicia com um grafo completamente não direcionado. Então, todos os pares de variáveis são testados para avaliar independência marginal, caso sejam identificados como marginalmente independentes, a aresta entre eles é removida. Após esse primeiro estágio, todos os pares adjacentes restantes são escolhidos e o algoritmo realiza uma busca por um conjunto em que o par seja condicionalmente independente, caso exista, a aresta que conecta o par de variáveis é removida. Após passar por todos os pares de variáveis, o algoritmo tem como resultado o esqueleto do grafo, porém ainda não direcionado. Sendo que o próximo passo consiste em orientar o esqueleto obtido, para isso o algoritmo tenta identificar a orientação do grafo sem criar ciclos ou colisores. Muitas vezes o resultado do algoritmo é um grafo direcionado acíclico parcialmente completo (CPDAG).

Além disso, se o grafo verdadeiro não for esparsos, o tempo de processamento é exponencial, chegando a p^{k+2} , sendo p o número de vértices e k o grau máximo associado a um vértice.

Vale ressaltar ainda a necessidade de considerar correção para múltiplos testes, pois para identificar a estrutura de causalidade entre variáveis, é necessário a realização de múltiplos testes que acabam aumentando a probabilidade de ocorrência do erro tipo I.

Mais detalhes sobre modelos de grafos probabilísticos podem ser encontrados em Spirtes *et al.* [33] e Pearl & Verma [27].

Capítulo 5

Análise

As metodologias apresentadas no Capítulo 4 serão aplicadas aos experimentos SRM e DDA, com o intuito de comparar os diferentes métodos de preparação de amostras por meio da utilização dos modelos de normalização e significância propostos neste trabalho. Os modelos de normalização ajustados serão comparados em termos da estimação dos efeitos fixos relacionados ao método de digestão e a acurácia de suas estimativas. Além disso, será estimado o modelo de significância para cada peptídeo e proteína com base nos resíduos obtidos pelo modelo de normalização escolhido. A identificação dos peptídeos e proteínas significantes será dada pelos gráficos de vulcão apresentando os níveis descritivos e estimativas dos contrastes entre os métodos dentro de tecido. Por fim, serão comparados os resultados do modelo de significância ao se utilizar a técnica de normalização proposta neste trabalho com os obtidos por meio da utilização da técnica TIC utilizada na Bioinformática.

5.1 Experimento SRM

O experimento SRM consistiu em identificar e quantificar 64 peptídeos previamente estabelecidos em cada uma das cinco amostras dadas para cada combinação de tecido (NP, P, T, e Pool) e método de preparação (IGD, ISD, OFD e OPD). Dentre os 64 peptídeos 46 foram identificados e quantificados em todas as amostras avaliadas. Para comparar os métodos de preparação utilizados no experimento serão ajustados os modelos de normalização e significância propostos neste trabalho e pela Tabela 5.1 é possível observar parte dos dados gerados pelo experimento SRM.

A lista com os 64 peptídeos quantificados no experimento SRM está apresentada na Tabela 5.2.

Nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 estão apresentados alguns gráficos descritivos referentes aos dados obtidos pelo experimento SRM. O primeiro gráfico faz referência à distribuição da abundância de peptídeos na escala logarítmica para cada um dos peptídeos quantificados, sendo possível perceber heterocedasticidade quanto à variabilidade e diferença na medida central para cada peptídeo.

Nas demais figuras estão apresentadas as distribuições das quantificações dos peptídeos separadas pelos efeitos de método dentro de tecido e os perfis na escala original e logarítmica, podendo notar que o método IGD, de modo geral, possui os menores valores quanto à abundância de peptídeos.

Tabela 5.1 – Estrutura dos dados SRM

Tecido	Método	Réplica	Peptídeo	y
NP	ISD	1	IPVGPETLGR	19,65
NP	IGD	1	IPVGPETLGR	11,55
NP	OPD	1	IPVGPETLGR	33,56
NP	OFD	1	IPVGPETLGR	42,52
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
P	ISD	2	IIDAALR	27,70
P	IGD	2	IIDAALR	1,14
P	OPD	2	IIDAALR	22,90
P	OFD	2	IIDAALR	32,56
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
T	ISD	3	VVDLLAPYAK	47,31
T	IGD	3	VVDLLAPYAK	14,40
T	OPD	3	VVDLLAPYAK	44,18
T	OFD	3	VVDLLAPYAK	55,93
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
Pool	IGD	1	ADLIAYLK	6,43
Pool	ISD	1	ADLIAYLK	37,64
Pool	OFD	1	ADLIAYLK	49,11
Pool	OPD	1	ADLIAYLK	32,39

Figura 5.1 – SRM - Quantificação de Peptídeos

Tabela 5.2 – Lista de Peptídeos

#	Peptídeo	#	Peptídeo
1	IPVGPETLGR ¹	2	VVDLLAPYAK ¹
3	IIDAALR ¹	4	ADLIAYLK ¹
5	TGPNLHGLFGR ¹	6	EFAAGYNVK ¹
7	YAECGLR	8	TISQHQISTSITSTQK ¹
9	FASEIAGVDDLGTGR ¹	10	GLLTYTSWEDALSR ¹
11	DFTPVCTTELGR ¹	12	GEGGILINSQGER ¹
13	LGANSLDLVVFGR ¹	14	DLVPDLNFIYAQYK ¹
15	FGFYEVFK ¹	16	EQGFLSFWR
17	AAYFGIYDTAK ¹	18	AIWNVINWENVTER ¹
19	MVAQEGPTAFYK	20	NALANPLYCPDYR ¹
21	NAVTFEFGPVPDAR ¹	22	VAGILTVK ¹
23	LVAQLYK ¹	24	ILVPEGTR ¹
25	VPEANSSWMDTVIR ¹	26	ALTGGIAHLFK
27	GLVVPVIR ¹	28	IYELAAGGTAVGTGLNTR ¹
29	SGLGELILPENEPGSSIMPGK	30	LNEHFLNTTDFLDTIK ¹
31	TIEAEEAHGTVTR	32	TPYTDVNIVTIR ¹
33	VAVLGASGGIGQPLSLLK ¹	34	VNVFVIGGHAGK ¹
35	AHGFTFTR	36	LPCIFICENNR
37	GLSSLLYGSIPK ¹	38	GTYQGLTATVLK ¹
39	AVVVNAAQLASYSQSK ¹	40	GIYTGLSAGLLR ¹
41	ALIADSLK ¹	42	IVFSPEEAK ¹
43	LIGPNCPGVINPGECK ¹	44	IDATQVEVNPFGGETPEGQVVCFDAK ¹
45	VPLVVR	46	DFTATDLSEFAAK ¹
47	FFEEVNDPAK ¹	48	ATAEQISSQTGNK ¹
49	VAFITGGGTGLGK ¹	50	LLYDLADQLHAAVGASR ¹
51	TIYAGNALCTVK ¹	52	LGPLQVAR ¹
53	LSVISVEDPPQR ¹	54	LGAGYPMGPFELLDYVGLDTTK
55	LVEVIK	56	DGPGFYTTTR ¹
57	DQLLLGPTYATPK ¹	58	LAAAFVSR
59	QGTFHSQQALEYGTK	60	ITEIYEGTSEIQR
61	QYGQTVATYESCSTAFAK	62	SEYNDQLTR
63	LQINAQNCVHCK	64	TVEALYK
65	LSVTATR	66	ALGVLAQLIWSR
67	EISLLPDNLLR	68	ISAQDAK

¹Peptídeo identificado em todas as amostras.

Figura 5.2 – SRM - Quantificação de Peptídeos considerando Método(Tecido)

Figura 5.3 – SRM - Gráfico de Perfis

5.1.1 Modelo de normalização

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos por meio dos modelos de normalização propostos no Capítulo 4 para o experimento SRM e serão comparados os diversos métodos de preparação utilizados no experimento. A escolha do modelo que melhor se ajusta aos dados será dada pela precisão das estimativas, comportamento dos resíduos e pelo critério AIC-REML.

Na Tabela 5.3 estão apresentadas as principais medidas obtidas para os modelos estimados, quais sejam, as estimativas dos efeitos fixos e efeitos aleatórios preditos, as componentes de variância estimadas, assim como as medidas AIC - REML, AIC - ML e $\log(L)$.

É possível perceber que, em geral, a precisão das estimativas dos efeitos fixos aumenta de acordo com a complexidade do modelo. De forma geral, observa-se que o método IGD (em gel) possui as menores quantificações entre os demais métodos avaliados. Para os modelos M3 e M4, que consideram a presença de heterocedasticidade dos erros, é possível observar que o tecido Pool representa o tecido com menor variabilidade e que ao se considerar o efeito do método dentro do tecido para explicar a variabilidade dos dados, o método de preparação IGD possui a menor variabilidade entre os demais métodos avaliados, sendo que esse comportamento é observado entre quase todos os tecidos, com exceção ao tecido Pool em que o método OPD apresenta uma variabilidade menor igual a 0,3552.

Temos ainda, que a inclusão de efeitos aleatórios devido ao tecido e ao método dentro do tecido é relevante para explicar a variabilidade dos dados obtidos pelo experimento SRM. A escolha do melhor modelo se deu por meio dos critérios de seleção, quais sejam, AIC REML, AIC ML e $\log(L)$, foi considerado ainda a praticidade em identificar por meio das estimativas das componentes de variância desse modelo, o método de preparação com menor variabilidade.

Vale ressaltar que com a utilização dos resíduos dos modelos de normalização variações sistemáticas serão removidas para melhor identificar peptídeos com comportamento diferencial (análise de significância). Uma vez que o intuito nesse tipo de análise é considerar somente a variação biológica presente nas amostras, retirando qualquer tipo de variação devido à técnica utilizada no experimento (método de digestão, processo de randomização, etc.).

Além de comparar os modelos de normalização por meio da precisão das estimativas dos efeitos fixos e dos critérios de seleção de modelos, foram realizados testes estatísticos para comparar os modelos e foram gerados os gráficos dos resíduos para avaliar a qualidade do ajuste.

Foram estimados testes de Razão de Verossimilhança para comparar os modelos de normalização estimados e selecionar o com melhor ajuste. Por meio dos resultados obtidos tem-se que o modelo mais “complexo”, M4, representado por um modelo linear misto com heterocedasticidade devido ao efeito do método dentro do tecido apresentou um melhor ajuste aos dados.

Na Figura 5.4 estão apresentados os resíduos condicionais com base na estimação dada pelo modelo M4 nota-se presença de alguns pontos discrepantes e uma pequena heterocedasticidade a ser considerada nas demais análises realizadas neste trabalho. Os resíduos condicionais, representados pelas observações sem os efeitos fixos e aleatórios estimados, serão utilizados para realização da análise de significância

Tabela 5.3 – Estimativas com desvio padrão dos modelos ajustados

Estimativas	Modelo M2	Modelo M3	Modelo M4
Intercepto (IGD)	0,4714 $\pm$ 0,1091	0,4714 $\pm$ 0,1089	0,4711 $\pm$ 0,1105
ISD	0,4369 $\pm$ 0,1059	0,4372 $\pm$ 0,1056	0,4386 $\pm$ 0,1033
OFD	0,4933 $\pm$ 0,1059	0,4930 $\pm$ 0,1064	0,4932 $\pm$ 0,1039
OPD	0,4263 $\pm$ 0,1059	0,4259 $\pm$ 0,1056	0,4264 $\pm$ 0,1029
$\hat{\sigma}_1^2(u_1)$	0,0080	0,0079	0,0086
$\hat{\sigma}_2^2(u_2)$	0,0038	0,0038	0,0036
$\hat{\sigma}^2$	0,1702	-	-
$\hat{\sigma}^2(\text{NP})$	-	0,1601	-
$\hat{\sigma}^2(\text{P})$	-	0,1837	-
$\hat{\sigma}^2(\text{Pool})$	-	0,1517	-
$\hat{\sigma}^2(\text{T})$	-	0,1834	-
$\hat{\sigma}^2(\text{NP:IGD})$	-	-	0,1026
$\hat{\sigma}^2(\text{NP:ISD})$	-	-	0,1658
$\hat{\sigma}^2(\text{NP:OFD})$	-	-	0,1983
$\hat{\sigma}^2(\text{NP:OPD})$	-	-	0,1739
$\hat{\sigma}^2(\text{P:IGD})$	-	-	0,1100
$\hat{\sigma}^2(\text{P:ISD})$	-	-	0,2336
$\hat{\sigma}^2(\text{P:OFD})$	-	-	0,2237
$\hat{\sigma}^2(\text{P:OPD})$	-	-	0,1680
$\hat{\sigma}^2(\text{Pool:IGD})$	-	-	0,1293
$\hat{\sigma}^2(\text{Pool:ISD})$	-	-	0,1660
$\hat{\sigma}^2(\text{Pool:OFD})$	-	-	0,1855
$\hat{\sigma}^2(\text{Pool:OPD})$	-	-	0,1262
$\hat{\sigma}^2(\text{T:IGD})$	-	-	0,1391
$\hat{\sigma}^2(\text{T:ISD})$	-	-	0,1607
$\hat{\sigma}^2(\text{T:OFD})$	-	-	0,2374
$\hat{\sigma}^2(\text{T:OPD})$	-	-	0,1961
AIC - ML	4915,04	4905,38	4810,41
AIC - REML	4933,44	4988,04	4828,88
$\log(L)$	-2459,72	-2451,90	-2392,44

por representarem quantificações sem presença de variação técnica.

Figura 5.4 – M4: Modelo Linear Misto Heterocedástico devido ao efeito de Método dentro de Tecido

Por fim, foi comparado o comportamento das observações pré- e pós-normalização (observações originais na escala logarítmica e resíduos condicionais do Modelo M4), com o intuito de avaliar se foi possível retirar o efeito da técnica utilizada no experimento. Na Figura 5.5 têm-se as quantificações dos peptídeos para o experimento SRM pré- e pós-normalização, em que é possível perceber comportamentos diferentes entre os dois cenários. Considerando a normalização dada pelo ajuste do modelo estatístico M4, as observações se distribuem de forma semelhante (medida central), porém nota-se a presença de heterocedasticidade que deve ser considerada na realização das demais análises.

Figura 5.5 – SRM - Quantificação de Peptídeos na escala logarítmica e normalizada

(a) SRM - Quantificação de Peptídeos na escala logarítmica

(b) SRM - Quantificação de Peptídeos após normalização

(c) SRM - Quantificação de Peptídeos considerando M(T) na escala logarítmica

(d) SRM - Quantificação de Peptídeos considerando M(T) normalizada

5.1.2 Modelo de significância

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos pelo modelo de significância para detecção de peptídeos com expressão diferencial entre os métodos e tecidos avaliados. Para tal, serão considerados os resíduos condicionais obtidos pelo modelo de normalização, como as variáveis respostas para realização dos testes de comparação múltipla entre métodos e tecidos. Os gráficos vulcão serão utilizados para visualização dos peptídeos com comportamento significativamente diferente.

Dessa forma, considerando o modelo de significância descrito na Seção 4.2, foram gerados os gráficos vulcão para todos os contrastes entre os pares de métodos dentro de tecido, a partir deles foram identificados os peptídeos significantes e com maiores magnitudes de mudança ($fold-change > 2$), indicados pela cor vermelha nos gráficos.

Nota-se que para a maioria dos contrastes estimados não foi identificado nenhum peptídeo signficante, com exceção para algumas comparações dentro do tecido da glândula parótica (P). Mais precisamente, tem-se que para as seguintes comparações ISD - IGD, OFD - ISD e OPD - ISD, foi possível identificar um peptídeo signficante (IPVGPETLGR).

Figura 5.6 – Gráficos vulcão para todos os contrastes entre pares de Métodos dentro de Tecido. Indicação de peptídeos significantes em vermelho (p -valor $< p$ -valor ajustado e $|$ magnitude de mudança $| > 2$)

5.2 Experimento DDA - noNorm Peptídeos

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos pelos modelos de normalização e de significância para o experimento DDA noNorm Peptídeo. O experimento DDA noNorm Peptídeo compõe as quantificações de 41703 peptídeos, essas quantificações não passaram por nenhum processo de normalização, diferentemente dos experimentos TIC, que também serão avaliados para efeito de comparação.

Primeiramente serão estimados os modelos de normalização, que serão comparados quanto às estimativas dos efeitos fixos (métodos de preparação), à precisão dessas estimativas, e em relação aos critérios AIC REML e AIC ML. Após a seleção do modelo de normalização com o melhor ajuste, será estimado o modelo de significância para identificar os peptídeos com comportamento diferencial entre os efeitos do método dentro do tecido.

Vale ressaltar que o experimento DDA consiste em realizar uma varredura por peptídeos e proteínas nos tecidos analisados. Dessa forma, é comum ter como resultado bases com milhares de peptídeos e proteínas quantificadas. Entretanto, pode-se observar uma forte presença de valores faltantes, pois nem todos os peptídeos e proteínas foram identificados em todas as amostras.

Nas Figuras 5.7 e 5.8 estão apresentados os gráficos com as quantificações dos peptídeos na escala original e logarítmica, assim como os gráficos de perfis por método dentro de tecido.

Figura 5.7 – DDA noNorm - Quantificação de Peptídeos considerando Método(Tecido)

Assim como foi realizado no experimento SRM, serão ajustados primeiramente os modelos de normalização, com o intuito de retirar variações sistemáticas devido à técnica utilizada, tornando possível a identificação dos peptídeos que possuem comportamento diferente entre as condições de interesse.

5.2.1 Modelo de normalização

Nesta subseção serão apresentados os resultados obtidos pelos modelos M2, M3 e M4 apresentados no Capítulo 4. Esses modelos levam em consideração a estrutura dos dados por meio da inclusão de efeitos aleatórios devido ao tecido e ao método dentro de tecido. As estimativas dos modelos serão comparadas, assim como suas

Figura 5.8 – DDA noNorm Peptídeos - Gráfico de Perfis

precisões. A seleção do modelo final para normalização dos dados será dada por meio da comparação das medidas AIC - REML e $\log(L)$ e por meio da realização de testes estatísticos.

Avaliando os resultados obtidos pelos modelos de normalização apresentados na Tabela 5.4, têm-se que as estimativas das componentes de variância dos modelos estimados indicam que o tecido das amídalas (T) possui a menor variabilidade entre os demais tecidos. Além disso, têm-se que os métodos IGD e ISD possuem as menores variabilidades entre os métodos avaliados a depender do tecido estudado. Em relação à abundância de peptídeos foi possível observar que o método IGD, assim como no experimento SRM, possui as menores quantificações e, em contraste com esse resultado, o método OPD possui as maiores quantificações médias dentre os métodos de preparação avaliados.

Baseando-se nos resultados obtidos pelos testes de Razão de Máxima verossimilhanças e nas medidas de AIC e $\log(L)$, tem-se que o modelo M4 é o que melhor se ajusta aos dados, em que sua complexidade permite identificar o método de preparação com as quantificações mais precisas.

Ainda, por meio do gráfico de resíduo do modelo M4 apresentado na Figura 5.9, observa-se que devido à presença de valores discrepantes, os resíduos condicionais não se aproximam de uma distribuição normal, porém possuem um comportamento próximo de ser homocedástico.

Na Figura 5.10 foram comparadas as quantificações dos peptídeos na escala logarítmica e normalizada. Sendo possível perceber que após a normalização das quantificações os tecidos avaliados possuem comportamento semelhante quanto à media e variabilidade.

5.2.2 Modelo de significância

Nesta subseção serão apresentados os resultados da análise de significância por meio da utilização dos resíduos condicionais obtidos pelo modelo de normalização M4. Portanto, serão identificados os peptídeos que possuem comportamento diferencial entre os efeitos de método dentro de tecido. Para isso serão realizados testes de comparações múltiplas com ajuste no nível descritivo por FDR e serão utilizados gráficos vulcão para visualização dos resultados.

Tabela 5.4 – Estimativas com desvio padrão dos modelos ajustados

Estimativas	Modelo M2	Modelo M3	Modelo M4
Intercepto (IGD)	7,0209 $\pm$ 0,0523	7,0209 $\pm$ 0,0541	7.0209 $\pm$ 0,0536
ISD	0,2312 $\pm$ 0,0619	0,2312 $\pm$ 0,0642	0.2312 $\pm$ 0,0635
OFD	0,2233 $\pm$ 0,0619	0,2233 $\pm$ 0,0642	0.2233 $\pm$ 0,0635
OPD	0,2865 $\pm$ 0,0619	0,2865 $\pm$ 0,0642	0.2865 $\pm$ 0,0635
$\hat{\sigma}_1^2(u_1)$	0,0013	0,0014	0,0014
$\hat{\sigma}_2^2(u_2)$	0,0015	0,0016	0,0016
$\hat{\sigma}^2$	0,5166	-	-
$\hat{\sigma}^2(\text{NP})$	-	0,5542	-
$\hat{\sigma}^2(\text{P})$	-	0,5093	-
$\hat{\sigma}^2(\text{Pool})$	-	0,4915	-
$\hat{\sigma}^2(\text{T})$	-	0,5163	-
$\hat{\sigma}^2(\text{NP:IGD})$	-	-	0,5434
$\hat{\sigma}^2(\text{NP:ISD})$	-	-	0,5274
$\hat{\sigma}^2(\text{NP:OFD})$	-	-	0,6045
$\hat{\sigma}^2(\text{NP:OPD})$	-	-	0,5419
$\hat{\sigma}^2(\text{P:IGD})$	-	-	0,4833
$\hat{\sigma}^2(\text{P:ISD})$	-	-	0,4815
$\hat{\sigma}^2(\text{P:OFD})$	-	-	0,5717
$\hat{\sigma}^2(\text{P:OPD})$	-	-	0,5037
$\hat{\sigma}^2(\text{Pool:IGD})$	-	-	0,4787
$\hat{\sigma}^2(\text{Pool:ISD})$	-	-	0,4918
$\hat{\sigma}^2(\text{Pool:OFD})$	-	-	0,5852
$\hat{\sigma}^2(\text{Pool:OPD})$	-	-	0,5110
$\hat{\sigma}^2(\text{T:IGD})$	-	-	0,4576
$\hat{\sigma}^2(\text{T:ISD})$	-	-	0,4779
$\hat{\sigma}^2(\text{T:OFD})$	-	-	0,5506
$\hat{\sigma}^2(\text{T:OPD})$	-	-	0,4858
AIC - ML	3733147	3731624	3727615
AIC - REML	3733170	3731648	3727638
$\log(L)$	-1866578	-1865814	-1863797

Figura 5.9 – M4: Modelo Linear Misto Heterocedástico devido ao efeito de Método dentro de Tecido

Figura 5.10 – DDA noNorm - Quantificação de Peptídeos na escala logarítmica e normalizada

(a) DDA noNorm - Quantificação de Peptídeos considerando $M(T)$ na escala logarítmica

(b) DDA noNorm - Quantificação de Peptídeos considerando $M(T)$ normalizada

Primeiramente, o modelo de significância apresentado no Capítulo 4 foi ajustado para cada peptídeo quantificado no experimento. Vale mencionar que as amostras com valores faltantes, ou seja, em que não foi possível quantificar todos os peptídeos, foram retiradas para estimação do modelo de significância, resultando no recorte de 12612 do total de 41703 peptídeos quantificados. Na Figura 5.11 estão apresentados os gráficos de vulcão gerados para o experimento.

Figura 5.11 – Gráficos vulcão para todos os contrastes entre pares de Métodos dentro de Tecido. Indicação de peptídeos significantes em vermelho (p -valor $< p$ -valor ajustado e $|\text{magnitude de mudança}| > 2$)

Com base nos resultados apresentados, foi possível identificar 164 peptídeos considerados significantes entre os efeitos de método dentro de tecido. Tem-se como destaque o contraste NP: ISD - IGD em que foram identificados 37 dos 164 peptídeos com comportamento diferencial no experimento.

Os peptídeos QGFFPDSVNK e QSLQVIESAMER foram considerados significantes em quase todos os contrastes avaliados, com exceção dos contrastes que comparam os métodos ISD e IGD para todos os tecidos. Além disso, têm-se que 48 dos 164 peptídeos foram significantes somente em um contraste, 46 em dois e 53 em três.

Os resultados obtidos pelo modelo de significância para o experimento DDA no Norm Peptídeos serão comparados na próxima seção com os resultados do experimento DDA - TIC Peptídeos, com o intuito de se avaliar possíveis diferenças devido ao método de normalização utilizado.

5.3 Experimento DDA - TIC Peptídeos

Uma prática comum na Bioinformática consiste em realizar a normalização dos dados obtidos pelos experimentos SRM e DDA por meio da técnica TIC, porém, conforme mencionado anteriormente, essa técnica possui fragilidades, como por exemplo, não se sabe ao certo quais fatores estão sendo retirados dos dados ao se realizar a normalização.

Assim, nesta seção serão comparados os resultados do modelo de significância, considerando a normalização TIC e a normalização proposta neste trabalho, com o intuito de se avaliar a semelhança com os resultados apresentados na subseção 5.2.

Por meio dos gráficos apresentados na Figura 5.12 tem-se que na média o método IGD possui as maiores quantificações dentro dos tecidos, com exceção do tecido dos pólipos nasais (NP). Esse resultado contradiz com o que vem sendo observado nos experimentos SRM e DDA noNorm Peptídeos.

Baseando-se nos dados normalizados pela técnica TIC foi ajustado o modelo de significância com o intuito de identificar peptídeos com comportamento diferencial entre os métodos dentro dos tecidos e comparar os resultados com os que foram obtidos na seção anterior. Na Figura 5.14 estão apresentados os gráficos vulcão para todos os contrastes entre pares do efeito de método dentro de tecido. Sendo que, os peptídeos indicados pela cor vermelha representam peptídeos significantes e com maiores magnitudes de mudança.

Figura 5.12 – DDA TIC Peptídeos - Quantificação de Peptídeos considerando Método(Tecido)

Figura 5.13 – DDA TIC Peptídeos - Gráfico de Perfis

5.3.1 Modelo de significância

Foram identificados 188 peptídeos significantes. Assim como foi observado para o experimento DDA noNorm o peptídeo QSLQVIESAMER foi considerado significativo em quase todos os contrastes avaliados com exceção dos contrastes que comparam os métodos ISD e IGD. Já para o peptídeo QGFFPDSVKN, além da não significância nos mesmos contrastes que o peptídeo QSLQVIESAMER, também não foi significativo no contraste P: OPD - OFD. No demais, 66 peptídeos foram considerados significantes somente em um contraste, 47 em dois e 53 em três.

Assim como foi observado na seção anterior, tem-se que no contraste NP: ISD - IGD foram identificados o maior número de peptídeos significantes. No geral, os contrastes que comparam os métodos OPD e IGD apresentaram o menor número de peptídeos com comportamento diferencial.

Figura 5.14 – Gráficos vulcão para todos os contrastes entre pares de Métodos dentro de Tecido. Indicação de peptídeos significantes em vermelho (p -valor $< p$ -valor ajustado e $|\text{magnitude de mudança}| > 2$)

Vale ressaltar que o grupo de peptídeos identificados como significantes não é o mesmo para os experimentos DDA noNorm e DDA TIC. Sendo que, 153 dos 164 peptídeos identificados no experimento DDA noNorm também fazem parte do grupo de peptídeos identificados como significantes no experimento DDA TIC, destacando assim que o modelo de normalização escolhido influencia nos resultados obtidos.

Tabela 5.5 – Peptídeos considerados significantes somente no experimento DDA TIC

Peptídeos
GSNTTSHLHQAVAL
NTAELQPESGK
AQTLPTSVVTITSESSPGK
WEKPESDGGSK
TDPAHDVR
IAEYM(+15.99)NHLIDIGVAGFR
GC(+57.02)PAVLPIHDVYGTLGIVGATTTQR
NWPWMK
QQQQMEQER
GQNVQQVIYATGALAK
LSAEDLVLEGAGLR
LTWFFVNEGLVDGWDDPR
MEELHNQEVQK
FM(+15.99)KPGK
HQDFNSAVQLVENFC(+57.02)R
GGSLPPHTQVHGSR
RKPLNIDHLGEDK
LC(+57.02)YVALDFEQEM(+15.99)ATAASSSSLEK
VTEWQQTYTYDSGIHSGANTC(+57.02)VPSVSSK
NHEEEM(+15.99)NALR
SHPEPQTPK
SSPDLTGCVVTIYEDLR
IEC(+57.02)VSAETTEDC(+57.02)IAK
ISNRPAFM(+15.99)PSEGK
VHKPPK
IHEGC(+57.02)EEPATHNALAK
AM(+15.99)GIM(+15.99)NSFVNDIFER
TEELEEK
TIHELEK
NKDPLNETVVGLYQK
IPFTDIYIGGAPPEILQSR
KEM(+15.99)QPTHPIR
GQTVEQVSNAVGALAK
YGQVTPLEIDILYQLADLYNASGR
GDTPGHATPGHGGATSSAR

5.4 Experimento DDA - noNorm Proteínas

O último experimento que será avaliado neste trabalho corresponde ao experimento DDA noNorm e TIC para proteínas. Nesta seção serão apresentados os resultados do experimento noNorm, em que os dados obtidos não passaram por nenhum processo de normalização. Dessa forma, serão estimados primeiramente os modelos de normalização propostos neste trabalho e os resultados obtidos por eles serão comparados para que seja possível escolher aquele que melhor se ajusta aos dados. Por meio dos resíduos condicionais do modelo escolhido será estimado o modelo de significância, com o intuito de identificar proteínas com comportamento diferencial entre os efeitos de método dentro de tecido.

Figura 5.15 – DDA noNorm - Quantificação de Proteínas considerando Método(Tecido)

Figura 5.16 – DDA noNorm Proteína - Gráfico de Perfis

5.4.1 Modelo de normalização

Na Tabela 5.6 estão apresentadas as estimativas dos modelos M2, M3 e M4. Sendo possível perceber que os efeitos aleatórios são relevantes para a análise do experimento e devem ser considerados na normalização dos dados. Além disso, tem-se pelos resultados do modelo M4 que o tecido T possui a menor variabilidade entre os demais tecidos avaliados e o mesmo é observado para o método de preparação ISD.

Nota-se ainda que o método IGD possui as menores quantificações médias, assim como foi observado nos experimentos SRM e DDA noNorm. No entanto, para o experimento DDA TIC foi observado que as quantificação para esse método foram as maiores.

Comparando os modelos por meio dos teste de razão de máxima verossimilhanças e pelos valores dos critérios AIC e $\log(L)$, tem-se que o modelo M4 apresentou o melhor ajuste por meio da consideração da heterocedasticidade dos dados dada pelo efeito de método dentro do tecido e permite comparar os métodos de preparação avaliados em relação a variabilidade de suas quantificações.

Tabela 5.6 – Estimativas com desvio padrão dos modelos estimados

Estimativas	Modelo M2	Modelo M3	Modelo M4
Intercepto (IGD)	7,2744 $\pm$ 0,0605	7.2744 $\pm$ 0,0630	7,2744 $\pm$ 0,0622
ISD	0,3225 $\pm$ 0,0709	0.3225 $\pm$ 0,0686	0,3225 $\pm$ 0,0729
OFD	0,3407 $\pm$ 0,0709	0.3407 $\pm$ 0,0686	0,3407 $\pm$ 0,0729
OPD	0,3743 $\pm$ 0,0709	0.3743 $\pm$ 0,0686	0,3743 $\pm$ 0,0729
$\hat{\sigma}_1^2(u_1)$	0,0018	0,0023	0,0020
$\hat{\sigma}_2^2(u_2)$	0,0019	0,0018	0,0021
$\hat{\sigma}^2$	0,6281	-	-
$\hat{\sigma}^2(\text{NP})$	-	0,6573	-
$\hat{\sigma}^2(\text{P})$	-	0,6418	-
$\hat{\sigma}^2(\text{Pool})$	-	0,6358	-
$\hat{\sigma}^2(\text{T})$	-	0,5809	-
$\hat{\sigma}^2(\text{NP:IGD})$	-	-	0,6673
$\hat{\sigma}^2(\text{NP:ISD})$	-	-	0,6428
$\hat{\sigma}^2(\text{NP:OFD})$	-	-	0,6515
$\hat{\sigma}^2(\text{NP:OPD})$	-	-	0,6684
$\hat{\sigma}^2(\text{P:IGD})$	-	-	0,6500
$\hat{\sigma}^2(\text{P:ISD})$	-	-	0,6068
$\hat{\sigma}^2(\text{P:OFD})$	-	-	0,6652
$\hat{\sigma}^2(\text{P:OPD})$	-	-	0,6490
$\hat{\sigma}^2(\text{Pool:IGD})$	-	-	0,6259
$\hat{\sigma}^2(\text{Pool:ISD})$	-	-	0,6118
$\hat{\sigma}^2(\text{Pool:OFD})$	-	-	0,6762
$\hat{\sigma}^2(\text{Pool:OPD})$	-	-	0,6314
$\hat{\sigma}^2(\text{T:IGD})$	-	-	0,5645
$\hat{\sigma}^2(\text{T:ISD})$	-	-	0,5581
$\hat{\sigma}^2(\text{T:OFD})$	-	-	0,5945
$\hat{\sigma}^2(\text{T:OPD})$	-	-	0,6012
AIC - ML	533237	532995	532924
AIC - REML	533259	533017	532946
$\log(L)$	-266623	-266499	-266451

Avaliando a qualidade do modelo M4 ajustado, tem-se pela Figura 5.17 que os resí-

duos apresentam observações discrepantes, impactando na normalidade dos resíduos. No entanto, pode-se notar resíduos com comportamento próximo da homocedasticidade.

Portanto, para avaliação da significância do experimento serão utilizados os resíduos condicionais do modelo escolhido e os resultados obtidos serão apresentados na próxima subseção.

Figura 5.17 – M4: Modelo Linear Misto Heterocedástico devido ao efeito do Método dentro do Tecido

5.4.2 Modelo de significância

Na Figura 5.18 estão sendo comparadas as quantificações de proteínas considerando os dados pré- e pós-normalização dos dados. Nota-se que em média o comportamento das quantificações considerando o efeito de método dentro de tecido é semelhante, porém com um pequeno desvio quando à variabilidade.

Portanto, para identificação das proteínas significantes neste experimento, foi estimado o modelo de significância proposto neste trabalho e por meio dos resultados obtidos foram gerados os gráficos vulcão apresentados na Figura 5.19.

Considerando os resultados obtidos pelos gráficos, têm-se que 53 das 2289 proteínas quantificadas foram identificadas como significantes. A proteína identificada pelo

número 3126 foi considerada significativa para quase todos os contrastes com exceção dos contrastes que comparam os métodos ISD e IGD entre os tecidos avaliados.

Figura 5.18 – DDA noNorm - Quantificação de Proteínas na escala logarítmica e normalizada

(a) DDA noNorm - Quantificação de Proteínas considerando $M(T)$ na escala logarítmica

(b) DDA noNorm - Quantificação de Proteínas considerando $M(T)$ normalizada

Figura 5.19 – Gráficos vulcão para todos os contrastes entre pares de Métodos dentro de Tecido. Indicação de peptídeos significantes em vermelho (p -valor $< p$ -valor ajustado e $|\text{magnitudo de mudança}| > 2$)

5.5 Experimento DDA - TIC Proteínas

Para efeito de comparação, nesta seção serão apresentados os resultados obtidos pela análise de normalização para o experimento DDA TIC Proteínas considerando os dados normalizados pela técnica TIC utilizada na Bioinformática. Portanto, será ajustado somente o modelo de significância e serão obtidos os gráficos vulcões para identificação das proteínas significantes.

Nas Figuras 5.20 e 5.21 estão comparadas as quantificações das proteínas pré- e pós-normalização dos dados pela técnica TIC. De modo geral, o método IGD possui em média as maiores quantificações de proteínas, assim como foi observado no experimento DDA peptídeos com a técnica TIC, porém oposto ao que foi encontrado nos experimentos DDA noNorm peptídeos e proteínas e no experimento SRM.

Figura 5.20 – DDA TIC - Quantificação de Proteínas considerando Método(Tecido)

Figura 5.21 – DDA TIC Proteína - Gráfico de Perfis

5.5.1 Modelo de significância

Para identificação das proteínas com comportamento diferencial foram gerados os gráficos vulcão apresentados na Figura 5.22 para todos os contrastes existentes entre a combinação dos fatores método dentro de tecido. Foram avaliadas 2156 das 3180 proteínas que compõem o recorte total quantificado pelo experimento, pois houve necessidade de retirar proteínas que não foram quantificadas em pelo menos uma das amostras para cada contraste de interesse.

Como resultado, 50 das 2156 proteínas avaliadas foram identificadas como significantes. De modo geral, foi observado que nos contrastes que comparam os métodos OFD e ISD foram identificadas o maior número de proteínas com comportamento diferencial significativo. Assim como foi observado no experimento DDA noNorm, a proteína identificada pelo número 3126 foi considerada significativa em quase todos os contrastes avaliados, com exceção do contraste que compara os métodos IGD e ISD em todos os tecidos. No geral, têm-se que das 50 proteínas com comportamento diferencial, 15 só foram consideradas significantes em um contraste, 16 em dois e 10 em três.

O grupo de proteínas identificadas como significantes nos experimentos DDA noNorm e DDA TIC não é exatamente o mesmo, as proteínas identificadas pelos números 36, 1535, 2908, 3377 e 1339 foram consideradas com comportamento diferencial somente para o experimento DDA TIC. Sendo que para o experimento DDA noNorm apresentado na seção anterior, as proteínas 12651, 2328, 2983, 2172, 2369, 2852, 532 e 1404 são significantes somente para o experimento DDA noNorm. Dessa forma, 45 proteínas foram consideradas com comportamento diferencial em ambos os experimentos, porém não necessariamente nos mesmos contrastes.

Figura 5.22 – Gráficos vulcão para todos os contrastes entre pares de Métodos dentro de Tecido. Indicação de peptídeos significantes em vermelho (p -valor $< p$ -valor ajustado e $|\text{magnitudo de mudança}| > 2$)

5.6 Análise dos experimentos

Pelos resultados obtidos em cada experimento avaliado foi observado que o método IGD possui as menores quantificações nos experimentos SRM e DDA noNorm, porém com os dados normalizados pela técnica proposta neste trabalho, notou-se que os diferentes métodos utilizados nos experimentos tiveram suas quantificações corrigidas, de tal maneira que passaram a apresentar comportamentos semelhantes entre si. Todavia, a normalização realizada nos experimentos DDA pela técnica TIC não conseguiu retirar o efeito da estrutura do delineamento presente nos dados. Mesmo após realizar o processo de normalização, as quantificações entre os métodos não ficaram tão similares, especialmente quanto às quantificações do método IGD que, após a normalização, eram as maiores entre os demais métodos avaliados.

No demais, observou-se que parte das proteínas e peptídeos identificados com comportamento diferencial na análise de significância é comum entre os experimentos noNorm e TIC, porém não necessariamente identificadas nos mesmos contrastes. Além disso, com base na normalização proposta neste trabalho foi possível notar que as quantificações das proteínas e peptídeos foram ajustadas, retirando a variação sistemática devido ao delineamento dos experimentos.

Portanto, com base no que foi apresentado tem-se que a metodologia proposta neste trabalho, tanto para normalização quanto para análise de significância, se mostraram como boas técnicas que podem ser utilizadas para retirar variação sistemática dos dados e para identificar variáveis com comportamento diferencial entre contrastes de interesse. Além disso, notou-se que a técnica de normalização influencia bastante nos resultados obtidos na análise de significância, sinalizando a importância de se escolher uma metodologia eficaz para realização da normalização dos dados.

5.7 Análises Multivariadas

Nesta seção serão apresentados os resultados de duas técnicas bastante utilizadas para avaliar a estrutura de dados, a Análise de Componentes Principais e a Análise de Grafos Probabilísticos. Para os experimentos DDA noNorm (normalização dada pela metodologia proposta neste trabalho) e SRM foram considerados os resíduos padronizados do modelo de normalização estimado. Enquanto que para os experimentos DDA TIC só foi realizada a padronização das quantificações já normalizadas previamente pela técnica TIC. Vale mencionar que as análises foram realizadas somente sobre os dados completos, isto é, foram consideradas somente as variáveis quantificadas em todas as 80 amostras. Com base na técnica de decomposição de dados ASCA apresentada na Seção 4.4, os resíduos padronizados e não correlacionados foram decompostos segundo as componentes de variação correspondentes aos efeitos avaliados no estudo, dando foco ao efeito do método dentro do tecido. Dessa forma, considerando a matriz relacionada ao efeito de interesse foram geradas componentes principais e grafos probabilísticos para representar e melhor entender a estrutura dos dados avaliados. Os resultados obtidos estão apresentados a seguir para cada recorte avaliado.

5.7.1 Análise de Componentes Principais

As componentes principais obtidas para o experimento SRM estão apresentadas na Figura 5.23. Nota-se pela representação do efeito método dentro de tecido que o tecido Pool, que representa uma combinação de todos os tecidos avaliados, possui uma maior variabilidade, destacando-se em relação aos demais. Além disso, pela representação dos peptídeos quantificados é possível perceber que alguns peptídeos (1 - IPVGPETLGR; 14 - FGFYEVFK; 15 - AAYFGIYDTAK; 16 - AIWNVINWENVTER) possuem uma maior variabilidade e acabam se destacando no gráfico apresentado, porém grande parte dos peptídeos estão concentrados na região em que as duas componentes possuem valor nulo.

Figura 5.23 – Análise de Componentes Principais - Experimento SRM

- (a) SRM: Representação do efeito aninhado M(T) (b) SRM: Representação dos peptídeos quantificados

Nas Figuras 5.24 e 5.25 estão apresentados os resultados obtidos pela Análise de Componentes Principais para o experimento DDA - Peptídeos considerando os dados normalizados pela metodologia proposta neste trabalho e pela técnica TIC. Nota-se que os gráficos gerados são bem distintos, a representação do efeito do método dentro de tecido, para os dados baseados no modelo de normalização, destaca a discrepância existente entre os tecidos Pool e NP em relação aos demais. Enquanto que para os dados baseados na técnica TIC o destaque fica somente em torno do tecido Pool.

Em relação à representação dos peptídeos identificados tem-se que grande parte está concentrada na região próxima do zero em ambas as componentes. Porém nota-se que para os dados normalizados pelo modelo estatístico, o peptídeo AVTEQGHLS-NEER (4821) se destaca dos demais.

Figura 5.24 – Análise de Componentes Principais - Experimento DDA noNorm Peptídeos

Por fim, nas Figuras 5.26 e 5.27 estão apresentados os gráficos com as componentes principais obtidas para os experimentos DDA - Proteínas (noNorm e TIC). Para os dados normalizados pela metodologia descrita neste trabalho destaca-se que na primeira componente somente o tecido NP apresenta comportamento distinto dos demais. No entanto, para a segunda componente o tecido Pool é o que maior se destaca dos demais.

Agora para os dados normalizados pela técnica TIC, observa-se um comportamento semelhante ao que foi encontrado para o experimento DDA - Peptídeos (TIC), em que o tecido Pool se destaca dos demais tecidos avaliados.

Em relação à representação das proteínas, tem-se que (Figura 5.26) grande parte está concentrada próximo do zero na primeira componente, com exceção para a proteína 12461. No entanto para os dados obtidos pela técnica TIC (Figura 5.27) observa-se que as proteínas no geral estão concentradas próxima do zero em ambas as componentes, com pequenos desvios (proteínas 595 e 2163).

No geral, foram observadas poucas variáveis (peptídeos ou proteínas) com comportamento bem distante dos demais. Em relação à representação do efeito do método dentro de tecido, somente os tecidos Pool e NP tiveram um destaque a depender

Figura 5.25 – Análise de Componentes Principais - Experimento DDA TIC Peptídeos

(a) DDA TIC: Representação do efeito aninhado M(T)

(b) DDA TIC: Representação dos peptídeos identificados

Figura 5.26 – Análise de Componentes Principais - Experimento DDA noNorm Proteínas

(a) DDA noNorm: Representação do efeito aninhado M(T)

(b) DDA noNorm: Representação das proteínas identificadas

(a) DDA TIC: Representação do efeito aninhado M(T) (b) DDA TIC: Representação das proteínas identificadas

Vale mencionar que a descrição dos peptídeos apresentados nas análises multivariadas estão apresentados no Apêndice, podendo ser consultados quando se achar necessário.

5.7.2 Análise de Grafos Probabilísticos

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos pela Análise de Grafos Probabilísticos com o intuito de se iniciar o estudo da estrutura de causalidade entre as variáveis (peptídeos ou proteínas) quantificadas nos diferentes experimentos. Vale ressaltar que os resultados aqui expostos são de caráter descritivo, obtidos com o intuito de exemplificar a utilização da técnica em estudos proteômicos. Os resultados foram obtidos por meio dos pacotes **pcalg** e **igraph** presentes no software estatístico R. [16, 12, 5]

Nas Figuras 5.28 e 5.29 estão apresentados os dois maiores grafos conexos obtidos para o experimento SRM, compostos por 33 e 8 peptídeos respectivamente. Vale mencionar que o recorte utilizado para geração dos grafos considerou somente os peptídeos quantificados em todas as (80) amostras, avaliando assim 46 do total de 68 peptídeos quantificados pelo experimento originalmente.

Nota-se que os grafos obtidos possuem setas bi-direcionadas, que implica que o algoritmo utilizado não conseguiu prever, de forma única, a real estrutura de relação entre os peptídeos avaliados.

Além dos dois grafos apresentados nas Figuras 5.28 e 5.29, foi observado ainda que o peptídeo IIDAALR (3) é marginalmente independente dos demais e os peptídeos IVFSPEEAK (34) e ATAEQISSQTGNK (39) estão correlacionados entre si, porém não foi possível identificar a direção dessa associação. Esse mesmo fato foi observado entre os peptídeos DFTATDLSEFAAK (37) e DGPGFYTTR (45).

Vale ressaltar que a descrição dos peptídeos apresentados nas análises multivariadas estão apresentados no Apêndice, podendo ser consultados em detalhe.

Figura 5.28 – Maior grafo conexo estimado para o experimento SRM: Grafo1-SRM

Figura 5.29 – Segundo maior grafo conexo estimado para o experimento SRM:
Grafo2-SRM

Considerando agora o experimento DDA - Peptídeos, o recorte utilizado para estimação da estrutura de causalidade entre os peptídeos considerou 4824 dos 37485 peptídeos identificados em ambos os experimento noNorm e TIC, para obtenção desse recorte foram considerados somente os peptídeos quantificados em todas as amostras avaliadas.

Para os dados normalizados com base na metodologia apresentada neste trabalho (noNorm) foram identificados 137 grafos conexos compostos por pelo menos quatro peptídeos. Identificou-se ainda que 2670 dos 4824 peptídeos avaliados foram considerados marginalmente independentes. Nas Figuras 5.30 e 5.31 estão apresentados os maiores grafos conexos estimados, contendo entre 12 à 17 peptídeos.

Figura 5.30 – Maior grafo conexo estimado para o experimento DDA noNorm -
Peptídeos: Grafo 1 - DDA noNorm

Figura 5.31 – Grafos conexos estimados com o maior número de peptídeos para o experimento DDA noNorm - Peptídeos

(a) Grafo 2 - DDA noNorm Peptídeos

(b) Grafo 3 - DDA noNorm Peptídeos

(c) Grafo 4 - DDA noNorm Peptídeos

Para o experimento DDA - Peptídeos com normalização baseada na técnica TIC foram estimados 100 grafos conexos contendo pelo menos quatro peptídeos e identificou-se 2845 peptídeos como marginalmente independentes. Nas Figuras 5.32 e 5.33 estão apresentados os maiores grafos conexos estimados, contendo entre 10 à 12 peptídeos.

Comparando os resultados obtidos nos experimentos noNorm e TIC observa-se que a estrutura de causalidade estimada entre os recortes não é igual. Sendo que as dissimilaridades entre os resultados podem ser observadas desde no número de peptídeos marginalmente independentes quanto nos principais grafos estimados, enfatizando que dependendo da técnica de normalização escolhida os resultados obtidos podem ser bem distintos.

Figura 5.32 – Maior grafo conexo estimado para o experimento DDA TIC -
Peptídeos: Grafo 1 - DDA TIC

Figura 5.33 – Grafos conexos estimados com o maior número de peptídeos para o experimento DDA TIC - Peptídeos

(a) Grafo 2 - DDA TIC Peptídeos

(b) Grafo 3 - DDA TIC Peptídeos

Agora, com base nos dados obtidos pelo experimento DDA Proteínas, foram estimados grafos probabilísticos para avaliar a estrutura de causalidade entre as variáveis (proteínas) quantificadas nos experimentos DDA noNorm e TIC. Em ambos os experimentos foram avaliadas somente as proteínas quantificadas em todas as amostras, resultando em um recorte com 1259 proteínas das 3306 quantificadas para o experimento DDA noNorm. As quantificações dessas proteínas foram normalizadas considerando o modelo proposto neste trabalho e por meio da estimação da estrutura de causalidade dessas proteínas foram obtidos 64 grafos conexos contendo pelo menos quatro proteínas. Além disso, observou-se que das 1259 proteínas avaliadas 454 foram identificadas como marginalmente independentes.

Nas Figuras 5.34 e 5.35 estão apresentados os grafos conexos com maior número de proteínas, contendo entre 19 à 29 proteínas.

Figura 5.34 – Maior grafo conexo estimado para o experimento DDA noNorm -
Proteínas: Grafo 1 - DDA noNorm

Figura 5.35 – Grafos conexos estimados com o maior número de proteínas para o experimento DDA noNorm - Proteínas

(a) Grafo 2 - DDA noNorm Proteínas

(b) Grafo 3 - DDA noNorm Proteínas

Por fim, considerando os dados referentes ao experimento DDA - Proteínas com normalização dada pela técnica TIC foram estimados 56 grafos conexos contendo pelo menos quatro proteínas. Neste experimento, foram avaliadas 1160 proteínas quantificadas em todas as amostras avaliadas, das quais 462 foram identificadas como marginalmente independentes. Nas Figuras 5.36, 5.37 e 5.38 estão apresentados os maiores grafos conexos estimados para o experimento, contendo entre 26 à 31 proteínas.

Figura 5.36 – Maiores grafos conexos estimados para o experimento DDA TIC - Proteínas - Grafo 1 - DDA TIC Proteínas

No geral, grande parte dos grafos conexos obtidos nos experimentos são compostos por uma baixa quantidade de peptídeos e ou proteínas. Todavia, com base nos resultados obtidos é possível ter um melhor entendimento a respeito da estrutura causal existente entre as variáveis avaliadas. Vale mencionar que não foi possível estimar de forma única a verdadeira estrutura de causalidade entre todos os peptídeos e ou proteínas avaliadas.

Além disso, foi possível perceber que o modelo de normalização escolhido in-

Figura 5.37 – Maiores grafos conexos estimados para o experimento DDA TIC - Proteínas - Grafo 2 - DDA TIC Proteínas

Figura 5.38 – Maiores grafos conexos estimados para o experimento DDA TIC -
Proteínas - Grafo 3 - DDA TIC Proteínas

fluencia nos resultados obtidos. Portanto, a depender da metodologia utilizada as conclusões obtidas podem ser bastante diferentes, como foi observado neste trabalho.

Capítulo 6

Considerações Finais

Com base nos resultados obtidos pela metodologia de normalização proposta neste trabalho foi possível identificar que no geral o método de preparação em gel (IGD) apresentou as menores quantificações entre os métodos avaliados e o método em solução (ISD) foi considerado o mais preciso dentro dos tecidos estudados nos experimentos. Além disso, foi possível identificar as diferentes fontes de variação impostas pelo experimento e considerá-las nos modelos de normalização e significância.

Notou-se ainda que, por meio da utilização dos resíduos condicionais do modelo de normalização foi possível retirar variações sistemáticas devido ao delineamento do experimento, possibilitando avaliar a significância, estrutura dos dados e causalidade entre os peptídeos e proteínas quantificadas nos experimentos com base principalmente na variação biológica presente nos dados.

A análise de significância proposta neste trabalho possibilitou identificar os peptídeos e proteínas com comportamento significantes entre diferentes condições de interesse. Como apoio visual, o gráfico vulcão se mostrou uma boa ferramenta para visualização e identificação de variáveis com comportamento diferencial.

Com base nos resíduos não correlacionados e padronizados do modelo de normalização foi possível ainda avaliar a estrutura dos dados em cada um dos experimentos por meio da análise de técnicas multivariadas, em que foi possível identificar os efeitos e variáveis com comportamento distinto entre as observações avaliadas, dando destaque para o tecido Pool e NP. Além disso, foi avaliada de forma descritiva a estrutura de causalidade presente entre os peptídeos e proteínas quantificadas nos diferentes experimentos. Nota-se que para os experimentos DDA (peptídeos e proteínas) grande parte das variáveis avaliadas não estão relacionadas entre si.

Comparando os resultados obtidos pelos experimentos noNorm e TIC foi possível perceber o quanto a técnica de normalização utilizada influencia os resultados obtidos na análise de significância, de componentes principais e grafos probabilísticos, enfatizando a importância de se utilizar técnicas eficazes e bem justificadas para obtenção de dados normalizados.

Para estudos futuros pode-se pensar em avaliar uma possível relação entre os peptídeos e proteínas quantificadas nos experimentos podendo dar maior suporte na validação dos resultados de significância bem como melhor entendimento de relações de causalidade encontradas entre as variáveis avaliadas. Além disso, pode ser de interesse ainda utilizar algum método de imputação flexível o bastante para atender

o padrão de observações faltantes, para que sejam consideradas todas as amostras do experimento nas análises avaliadas neste trabalho, pois como foi possível perceber nas análises de significância e nas análises multivariadas teve-se necessidade de se retirar uma grande quantidade de variáveis que apresentaram dados incompletos. Por fim, pode-se pensar em aplicar técnicas esparsas para avaliar a estrutura dos dados, principalmente nos casos com grande quantidade de variáveis, como foi observado nos experimento DDA.

Em adição aos resultados os códigos utilizados para análise foram disponibilizados na URL github.com/acarolcruz/proteomics.

Referências Bibliográficas

- [1] BARBIERI, R., GURYEV, V., BRANDSMA, C.-A., SUITS, F., BISCHOFF, R., AND HORVATOVICH, P. *Proteogenomics: Key Driver for Clinical Discovery and Personalized Medicine*. Springer, 2016.
- [2] BARBOSA, E. B., VIDOTTO, A., POLACHINI, G. M., HENRIQUE, T., DE MARQUI, A. B. T., AND TAJARA, E. H. Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. *Revista da Associação Médica Brasileira (English Edition)* (2012).
- [3] BATES, D., MÄCHLER, M., BOLKER, B., AND WALKER, S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software* (2015).
- [4] CALLISTER, S. J., BARRY, R. C., ADKINS, J. N., JOHNSON, E. T., QIAN, W. J., WEBB-ROBERTSON, B. J., SMITH, R. D., AND LIPTON, M. S. Normalization approaches for removing systematic biases associated with mass spectrometry and label-free proteomics. *Journal of proteome research* (2006).
- [5] CSARDI, G., AND NEPUSZ, T. The igraph software package for complex network research. *InterJournal Complex Systems*, 1695 (2006).
- [6] DEMIDENKO, E. *Mixed Models: Theory and Applications with R*. Wiley, 2013.
- [7] DRYDEN, I. L., AND MARDIA, K. V. *Statistical shape analysis: with applications in R*. John Wiley & Sons, 2016.
- [8] ERIKSSON, J., AND FENYÖ, D. Improving the success rate of proteome analysis by modeling protein-abundance distributions and experimental designs. *Nature Biotechnology* (2007).
- [9] GOOS, P., AND GILMOUR, G. S. A general strategy for analyzing data from split-plot and multistratum experimental designs. *Technometrics* (2012).
- [10] HARVILLE, D. A. Optimal procedures for some constrained selection problems. *Journal of the American Statistical Association* 69, 346 (1974), 446–452.
- [11] HARVILLE, D. A. Maximum likelihood approaches to variance component estimation and to related problems. *Journal of the American statistical association* 72, 358 (1977), 320–338.

- [12] HAUSER, A., AND BUEHLMANN, P. Characterization and greedy learning of interventional markov equivalence classes of directed acyclic graphs. *Journal of Machine Learning Research* 13 (2012), 2409–2464.
- [13] HENDERSON, C. R. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics* (1975).
- [14] HONGZHAN, H., SHUKLA, H. D., CATHY, W., AND SATYA, S. Challenges and solutions in proteomics. *Current genomics* (2007).
- [15] JOHNSON, R., AND WICHERN, D. *Applied multivariate statistical analysis*. Prentice Hall, 2002.
- [16] KALISCH, M., MAECHLER, M., COLOMBO, D., MAATHUIS, M. H., AND BUEHLMANN, P. Causal inference using graphical models with the R package pcalg. *Journal of Statistical Software* 47, 11 (2012), 1–26.
- [17] KENDZIORSKI, C., IRIZARRY, R. A., CHEN, K.-S., HAAG, J. D., AND GOULD, M. N. On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2005).
- [18] KLONT, F., BRAS, L., WOLTERS, J. C., ONGAY, S., BISCHOFF, R., HALMOS, G. B., AND HORVATOVICH, P. Assessment of sample preparation bias in mass spectrometry-based proteomics. *Analytical Chemistry* (2018).
- [19] LAIRD, N., AND WARE, J. Random-effects models for longitudinal data. *Biometrics* (1982).
- [20] LI, W. Volcano plots in analyzing differential expressions with mrna microarrays. *Journal of bioinformatics and computational biology* (2012).
- [21] LOVRÍĆ, J. *Introducing Proteomics: From concepts to sample separation, mass spectrometry and data analysis*. Wiley, 2011.
- [22] MORRIS, J. S., BAGGERLY, K. A., GUTSTEIN, H. B., AND COOMBES, K. R. Statistical contributions to proteomic research. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (2010).
- [23] NESS, R. O., SACHS, K., AND VITEK, O. From correlation to causality: Statistical approaches to learning regulatory relationships in large-scale biomolecular investigations. *Journal of Proteome Research* (2016).
- [24] O’ROURKE, M. B., TOWN, S., DALLA, P. V., BICKNELL, F., KOH BELIC, N., VIOLI, J. P., STEELE, J. R., AND PADULA, M. P. What is normalization? the strategies employed in top-down and bottom-up proteome analysis workflows. *Proteomes* (2019).
- [25] PATTERSON, H. D., AND THOMPSON, R. Recovery of inter-block information when block sizes are unequal. *Biometrika* 58, 3 (1971), 545–554.

- [26] PEARL, J. *Causality: Models, Reasoning and Inference*. Cambridge University Press, 2000.
- [27] PEARL, J., AND VERMA, T. A theory of inferred causation. In *Studies in Logic and the Foundations of Mathematics*, vol. 134. Elsevier, 1995, pp. 789–811.
- [28] PICOTTI, P., AND AEBERSOLD, R. Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat Methods* (2012).
- [29] PINHEIRO, J., BATES, D., DEBROY, S., SARKAR, D., AND R CORE TEAM. *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*, 2021. R package version 3.1-152.
- [30] PINHEIRO, J. C., AND BATES, D. M. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer, 2000.
- [31] SEARLE, S. R., CASELLA, G., AND MCCULLOCH, C. E. *Variance Components*. Wiley, 1992.
- [32] SMILDE, A. K., JANSEN, J. J., HOEFSLOOT, H. C. J., LAMERS, R.-J. A. N., VAN DER GREEF, J., AND TIMMERMAN, M. E. Anova-simultaneous component analysis (asca): a new tool for analyzing designed metabolomics data. *Bioinformatics* (2005).
- [33] SPIRITES, P., GLYMOUR, C., AND SCHEINES, R. *Causation, Prediction and Search*. MIT press, 2000.
- [34] STOREY, J. D. A direct approach to false discovery rates. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)* (2002).
- [35] THISTED, R. A. Elements of statistical computing. *Journal of the American Statistical Association* (1988).
- [36] VIDOVA, V., AND SPACIL, Z. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. *Analytica Chimica Acta* 964 (2017).
- [37] WERMUTH, N., AND COX, D. Graphical models: Overview. In *International Encyclopedia of the Social and Behavioral Sciences*. Pergamon, 2001.
- [38] WOLFINGER, R., GIBSON, G., WOLFINGER, E., BENNETT, L., HAMADEH, H., BUSHEL, P., AFSHARI, C., AND PAULES, R. Assessing gene significance from cdna microarray expression data via mixed models. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* (2001).
- [39] YU, H., MOHARIL, J., AND BLAIR, R. H. Bayesnetbp: an r package for probabilistic reasoning in bayesian networks. *Journal of Statistical Software* (2020).

- [40] ZOU, H., HASTIE, T., AND TIBSHIRANI, R. Sparse principal component analysis. *Journal of computational and graphical statistics* (2006).

APÊNDICE A

Tabelas suplementares

A.1 Experimento SRM

Os resultados apresentados na Seção 5.7 foram baseados nos dados completos, isto é, foram considerados somente os peptídeos presentes em todas as amostras avaliadas. Sendo que, foram avaliados 46 dos 68 peptídeos quantificados pelo experimentos SRM.

Na Tabela A.6 estão apresentados os códigos e a descrição dos 46 peptídeos avaliados as análises multivariadas.

Tabela A.1 – Contrastes na escala logaritmica - Modelo M2 - SRM

Contraste	Estimativa	DP	g.l.	t	p -valor
IGD - ISD	-0,4369	0,0468	9	-9,331	<0,0001
IGD - OFD	-0,4933	0,0468	9	-10,535	<0,0001
IGD - OPD	-0,4263	0,0468	9	-9,105	<0,0001
ISD - OFD	-0,0564	0,0468	9	-1,204	0,6396
ISD - OPD	0,0106	0,0468	9	0,226	0,9956
OFD - OPD	0,0670	0,0468	9	1,430	0,5131

Tabela A.2 – Contrastes na escala logaritmica - Modelo M3 - SRM

Contraste	Estimativa	DP	g.l.	t	p -valor
IGD - ISD	-0,4372	0,0467	9	-9,369	<0,0001
IGD - OFD	-0,4930	0,0467	9	-10,565	<0,0001
IGD - OPD	-0,4259	0,0467	9	-9,125	<0,0001
ISD - OFD	-0,0558	0,0467	9	-1,196	0,6441
ISD - OPD	0,0114	0,0467	9	0,244	0,9946
OFD - OPD	0,0672	0,0467	9	1,440	0,5080

Figura A.1 – M2: Modelo Linear Misto Homocedástico - SRM

Figura A.2 – M3: Modelo Linear Misto Heterocedástico devido ao efeito de Tecido - SRM

Tabela A.3 – Contrastes na escala logaritmica - Modelo M4 - SRM

Contraste	Estimativa	DP	g.l.	t	p -valor
IGD - ISD	-0,4386	0,0456	9	-9,608	<0,0001
IGD - OFD	-0,4932	0,0459	9	-10,738	<0,0001
IGD - OPD	-0,4264	0,0455	9	-9,373	<0,0001
ISD - OFD	-0,0547	0,0465	9	-1,175	0,6560
ISD - OPD	0,0122	0,0461	9	0,264	0,9931
OFD - OPD	0,0668	0,0464	9	1,441	0,5071

Tabela A.4 – M3 versus M2 - SRM

Modelo	g.l.	AIC ML	BIC ML	$\log(L)$	Razão L	p -valor
M2	7	4915,038	4960,013	-2450,519		
M3	10	4905,378	4969,629	-2442,689	15,6599	0,0013

Tabela A.5 – M4 versus M3 - SRM

Modelo	g.l.	AIC ML	BIC ML	$\log(L)$	Razão L	p -valor
M3	10	4905,378	4969,629	-2442,689		
M4	22	4810,408	4951,760	-2383,204	118,9695	<0,0001

Tabela A.6 – Lista de Peptídeos - SRM

Código	Peptídeo	Grafo
1	IPVGPETLGR	Grafo 2 - SRM
2	VVDLLAPYAK	Grafo 1 - SRM
3	IIDAALR	
4	ADLIAYLK	Grafo 1 - SRM
5	TGPNLHGLFGR	Grafo 1 - SRM
6	EFAAGYNVK	Grafo 1 - SRM
7	TISQHQISTSIITSTQK	Grafo 1 - SRM
8	FASEIAGVDDL GTTGR	Grafo 1 - SRM
9	GLTYT SWEDALSR	Grafo 1 - SRM
10	DFTPVCTTELGR	Grafo 1 - SRM
11	GEGGILINSQGER	Grafo 1 - SRM
12	LGANSLDLVVFGR	Grafo 1 - SRM
13	DLVPDLSNFYAQYK	Grafo 1 - SRM
14	FGFYEVFK	Grafo 2 - SRM
15	AAYFGIYDTAK	Grafo 1 - SRM
16	AIWNVINWENVTER	Grafo 2 - SRM
17	NALANPLYCPDYR	Grafo 2 - SRM
18	NAVTQEFGPVPDTAR	Grafo 2 - SRM
19	VAGILTVK	Grafo 2 - SRM
20	LVAQLYK	Grafo 1 - SRM
21	ILVPEGTR	Grafo 1 - SRM
22	VPEANSSWMDTVIR	Grafo 1 - SRM
23	GLVVPVIR	Grafo 1 - SRM
24	IYELAAGGTAVGTGLNTR	Grafo 2 - SRM
25	LNEHFLNTTDFLDTIK	Grafo 1 - SRM
26	TPYTDVNIVTIR	Grafo 1 - SRM
27	VAVLGASGGIGQPLSLLK	Grafo 1 - SRM
28	VNVPVIGGHAGK	Grafo 1 - SRM
29	GLSSLLYGSIPK	Grafo 1 - SRM
30	GTYQGLTATVLK	Grafo 1 - SRM
31	AVVVNAAQLASYSQSK	Grafo 1 - SRM
32	GIYTGLSAGLLR	Grafo 1 - SRM
33	ALIADSGLK	Grafo 1 - SRM
34	IVFSPEEAK	
35	LIGPNCPGVINPGECK	Grafo 2 - SRM
36	IDATQVEVNPFGETPEGQVVCFDAK	Grafo 1 - SRM
37	DFTATDLSEFAAK	
38	FFEEVNDPAK	Grafo 1 - SRM
39	ATAEQISSQTGNK	
40	VAFITGGGTGLGK	Grafo 1 - SRM
41	LLYDLADQLHAAVGASR	Grafo 1 - SRM
42	TIYAGNALCTVK	Grafo 1 - SRM
43	LGPLQVAR	Grafo 1 - SRM
44	LSVISVEDPPQR	Grafo 1 - SRM
45	DGPGFYTTR	
46	DQLLLGPTYATPK	Grafo 1 - SRM

A.2 Experimento DDA - noNorm Peptídeos

Na Tabela A.13 estão apresentados os códigos e a descrição dos peptídeos apresentados nos grafos probabilísticos apresentados na Seção 5.7, em que contém 54 peptídeos.

Tabela A.7 – Contrastes na escala logarítmica do modelo M2 - DDA noNorm Peptídeos

Contraste	Estimativa	DP	g.l.	t	p -valor
IGD - ISD	-0,23119	0,0274	9	-8,440	0,0001
IGD - OFD	-0,22331	0,0274	9	-8,152	0,0001
IGD - OPD	-0,28645	0,0274	9	-10,457	<0,0001
ISD - OFD	0,00788	0,0274	9	0,288	0,9911
ISD - OPD	-0,05526	0,0274	9	-2,017	0,2507
OFD - OPD	-0,06314	0,0274	9	-2,305	0,1679

Tabela A.8 – Contrastes na escala logarítmica do modelo M3 - DDA noNorm Peptídeos

Contraste	Estimativa	DP	g.l.	t	p -valor
IGD - ISD	-0,23119	0,0284	9	-8,150	0,0001
IGD - OFD	-0,22332	0,0284	9	-7,872	0,0001
IGD - OPD	-0,28645	0,0284	9	-10,097	<0,0001
ISD - OFD	0,00788	0,0284	9	0,278	0,9920
ISD - OPD	-0,05526	0,0284	9	-1,948	0,2752
OFD - OPD	-0,06314	0,0284	9	-2,225	0,1880

Tabela A.9 – Contrastes na escala logarítmica do modelo M4 - DDA noNorm Peptídeos

Contraste	Estimativa	DP	g.l.	t	p -valor
IGD - ISD	-0,23119	0,0281	9	-8,231	0,0001
IGD - OFD	-0,22332	0,0281	9	-7,950	0,0001
IGD - OPD	-0,28645	0,0281	9	-10,199	<0,0001
ISD - OFD	0,00788	0,0281	9	0,280	0,9918
ISD - OPD	-0,05526	0,0281	9	-1,967	0,2681
OFD - OPD	-0,06314	0,0281	9	-2,247	0,1823

Tabela A.10 – M3 versus M2 - DDA noNorm Peptídeos

Modelo	g.l.	AIC ML	BIC ML	$\log(L)$	Razão L	p -valor
M2	7	3733147	3733233	-1866566		
M3	10	3731624	3731748	-1865802	1528,454	<0,0001

Tabela A.11 – M4 versus M3 - DDA noNorm Peptídeos

Modelo	g.l.	AIC ML	BIC ML	$\log(L)$	Razão L	p -valor
M3	10	3731624	3731748	-1865802		
M4	22	3727615	3727887	-1863785	4033,522	<0,0001

Figura A.3 – M2: Modelo Linear Misto Homocedástico - DDA noNorm Peptídeos

Figura A.4 – M3: Modelo Linear Misto Heterocedástico devido ao efeito de Tecido - DDA noNorm Peptídeos

Tabela A.12 – Número de peptídeos significantes por contraste avaliado - DDA
noNorm Peptídeos

Contraste	Número de peptídeos
NP: ISD - IGD	37
NP: OFD - IGD	30
NP: OFD - ISD	23
NP: OPD - IGD	16
NP: OPD - ISD	14
NP: OPD - OFD	21
P: ISD - IGD	19
P: OFD - IGD	23
P: OFD - ISD	25
P: OPD - IGD	9
P: OPD - ISD	14
P: OPD - OFD	11
pool: ISD - IGD	16
pool: OFD - IGD	11
pool: OFD - ISD	21
pool: OPD - IGD	6
pool: OPD - ISD	15
pool: OPD - OFD	12
T: ISD - IGD	16
T: OFD - IGD	19
T: OFD - ISD	19
T: OPD - IGD	4
T: OPD - ISD	12
T: OPD - OFD	16

Tabela A.13 – Lista de Peptídeos - DDA noNorm

Código	Peptídeo	Grafo
356	SLLQALNEVK	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
799	VVYLR	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
1105	DAIAQAVR	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
1142	NNASTDYDLSDK	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
1782	GLVYETSVLDPDEGIR	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
1817	YTIENPR	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
2117	GEDEEENNLEVR	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
2765	DPAEGDGAQPEETPR	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
2956	AYEKPPK	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
3219	AGDFLEANYMNLQR	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
3655	RPDQQLQGEGK	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
3659	IIDVVYNASNNELVR	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
3715	DLTGVQNL	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
4080	VGEQAQVVIIDMNDPSNPIR	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
4187	HSQDLAFLSMLNDIAAVPATAMPFR	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
4402	LLDAVDITYIPVPAR	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
4696	IEPGVDPDDTYNETPYEK	Grafo 1 - DDA noNorm Peptídeos
133	LLLQVQHASK	Grafo 2 - DDA noNorm Peptídeos
144	KFDQLLAEEK	Grafo 2 - DDA noNorm Peptídeos
160	AHSSMVGVNLPQK	Grafo 2 - DDA noNorm Peptídeos
286	LFKPGQEAVK	Grafo 2 - DDA noNorm Peptídeos
421	AVTEQGHELSNEER	Grafo 2 - DDA noNorm Peptídeos
435	KLNVTEQEK	Grafo 2 - DDA noNorm Peptídeos
607	HLIPAANTGESK	Grafo 2 - DDA noNorm Peptídeos
682	IFAPNHVVAK	Grafo 2 - DDA noNorm Peptídeos
737	GHLENNPALEK	Grafo 2 - DDA noNorm Peptídeos
1715	AWDDFFPGSDR	Grafo 2 - DDA noNorm Peptídeos
2034	STTTGHLIYK	Grafo 2 - DDA noNorm Peptídeos
2862	NLQPASEYTVSLVAIK	Grafo 2 - DDA noNorm Peptídeos
3722	FGYVDFESAEDLEK	Grafo 2 - DDA noNorm Peptídeos
657	SSLVLR	Grafo 3 - DDA noNorm Peptídeos
1106	ESSSHHPGIAEFPSR	Grafo 3 - DDA noNorm Peptídeos
1113	EGIVALR	Grafo 3 - DDA noNorm Peptídeos
1257	EPPLELK	Grafo 3 - DDA noNorm Peptídeos
1294	AQEGLRPGTLC(+57.02)TVAGWGR	Grafo 3 - DDA noNorm Peptídeos
1574	ASIHEAWTDGK	Grafo 3 - DDA noNorm Peptídeos
2236	LLLIQAFRPDR	Grafo 3 - DDA noNorm Peptídeos
2441	GDVDISLPK	Grafo 3 - DDA noNorm Peptídeos
2897	HITIFSPEGR	Grafo 3 - DDA noNorm Peptídeos
3181	LC(+7.02)DNLSTK	Grafo 3 - DDA noNorm Peptídeos
3716	LVNTEQEK	Grafo 3 - DDA noNorm Peptídeos
3741	TILMMGR	Grafo 3 - DDA noNorm Peptídeos
773	VPGLAEHK	Grafo 4 - DDA noNorm Peptídeos
776	EQEITAVQAR	Grafo 4 - DDA noNorm Peptídeos
840	VHSPSGALEEC(+57.02)YVTEIDQDK	Grafo 4 - DDA noNorm Peptídeos
1004	VNVSSIMSVR	Grafo 4 - DDA noNorm Peptídeos
1087	SVPTWLK	Grafo 4 - DDA noNorm Peptídeos
1176	LGEQNFHK	Grafo 4 - DDA noNorm Peptídeos
1245	SETITEEELVGLMNK	Grafo 4 - DDA noNorm Peptídeos
2775	VGLEHLR	Grafo 4 - DDA noNorm Peptídeos
2985	DQNVFVAQK	Grafo 4 - DDA noNorm Peptídeos
3369	GGVADALLYR	Grafo 4 - DDA noNorm Peptídeos
3464	FATTFYQHLADSK	Grafo 4 - DDA noNorm Peptídeos
4423	VAVVTYNNEVTTEIR	Grafo 4 - DDA noNorm Peptídeos

A.3 Experimento DDA - TIC Peptídeos

Na Tabela A.15 estão apresentados os códigos e a descrição dos peptídeos apresentados nos grafos probabilísticos apresentados na Seção 5.7, contendo 33 peptídeos.

Tabela A.14 – Número de peptídeos significantes por contraste avaliado - DDA TIC Peptídeos

Contraste	Número de peptídeos
NP: ISD - IGD	38
NP: OFD - IGD	28
NP: OFD - ISD	23
NP: OPD - IGD	17
NP: OPD - ISD	15
NP: OPD - OFD	21
P: ISD - IGD	25
P: OFD - IGD	24
P: OFD - ISD	26
P: OPD - IGD	10
P: OPD - ISD	16
P: OPD - OFD	11
pool: ISD - IGD	24
pool: OFD - IGD	14
pool: OFD - ISD	22
pool: OPD - IGD	6
pool: OPD - ISD	14
pool: OPD - OFD	14
T: ISD - IGD	19
T: OFD - IGD	23
T: OFD - ISD	21
T: OPD - IGD	6
T: OPD - ISD	11
T: OPD - OFD	14

Tabela A.15 – Lista de Peptídeos - DDA TIC

Código	Peptídeo	Grafo
976	ANLQIDQINTDLNLER	Grafo 1 - DDA TIC Peptídeos
1265	GIQEEMEALVK	Grafo 1 - DDA TIC Peptídeos
2018	GPSGLLLYNGQK	Grafo 1 - DDA TIC Peptídeos
2704	MIPC(+57.02)DFLIPVQTQHPIR	Grafo 1 - DDA TIC Peptídeos
2850	YLALESMC(+57.02)TLASSEFSHEAVK	Grafo 1 - DDA TIC Peptídeos
2953	GEGPEVDVNLPK	Grafo 1 - DDA TIC Peptídeos
3358	DDLYVSDAFHK	Grafo 1 - DDA TIC Peptídeos
3576	YQEEFEHFQQELDK	Grafo 1 - DDA TIC Peptídeos
3997	EFTRPEEIIFLR	Grafo 1 - DDA TIC Peptídeos
4083	IDSEGGVSANHTSR	Grafo 1 - DDA TIC Peptídeos
4094	EELGLIEQAYDNPHEALSR	Grafo 1 - DDA TIC Peptídeos
4587	LVVDLTIDPDVAYSSVPYEK	Grafo 1 - DDA TIC Peptídeos
84	VVDLLAPYAK	Grafo 2 - DDA TIC Peptídeos
147	DSGFQMNQLR	Grafo 2 - DDA TIC Peptídeos
618	GDLGIEIPA EK	Grafo 2 - DDA TIC Peptídeos
1447	DNLAEDIMR	Grafo 2 - DDA TIC Peptídeos
2626	EYHPDKNP NAGDK	Grafo 2 - DDA TIC Peptídeos
3378	KDSGFQMNQLR	Grafo 2 - DDA TIC Peptídeos
3671	SLDMDSIIAEVK	Grafo 2 - DDA TIC Peptídeos
4144	ASEEHLK	Grafo 2 - DDA TIC Peptídeos
4249	VINQILTEMDGMSTK	Grafo 2 - DDA TIC Peptídeos
4385	ILLAELEQLK	Grafo 2 - DDA TIC Peptídeos
4540	ESTGAQVQVAGDMLPNSTER	Grafo 2 - DDA TIC Peptídeos
281	WQEEMELYR	Grafo 3 - DDA TIC Peptídeos
571	DFPIAK	Grafo 3 - DDA TIC Peptídeos
940	SNYFLK	Grafo 3 - DDA TIC Peptídeos
2015	TYALNAAGVSK	Grafo 3 - DDA TIC Peptídeos
2348	ETDSSSASAATPSK	Grafo 3 - DDA TIC Peptídeos
2511	QMVIDVLHPGK	Grafo 3 - DDA TIC Peptídeos
2771	GQSSWGTGESFR	Grafo 3 - DDA TIC Peptídeos
3139	FSGVPDR	Grafo 3 - DDA TIC Peptídeos
3587	IWDVVEK	Grafo 3 - DDA TIC Peptídeos
4152	LHVDPENFR	Grafo 3 - DDA TIC Peptídeos

A.4 Experimento DDA noNorm Proteínas

Na Tabela A.22 estão apresentados os códigos das proteínas apresentados nos grafos probabilísticos na Seção 5.7, contendo 70 proteínas.

Tabela A.16 – Contrastes na escala logarítmica M2 - DDA noNorm Proteínas

Contraste	Estimativa	DP	g.l.	t	p -valor
IGD - ISD	-0,3225	0,0313	9	-10,294	<0,0001
IGD - OFD	-0,3407	0,0313	9	-10,874	<0,0001
IGD - OPD	-0,3743	0,0313	9	-11,949	<0,0001
ISD - OFD	-0,0182	0,0313	9	-0,580	0,9356
ISD - OPD	-0,0518	0,0313	9	-1,654	0,3987
OFD - OPD	-0,0336	0,0313	9	-1,074	0,7129

Tabela A.17 – Contrastes na escala logarítmica M3 - DDA noNorm Proteínas

Contraste	Estimativa	DP	g.l.	t	p -valor
IGD - ISD	-0,3225	0,0303	9	-10,636	<0,0001
IGD - OFD	-0,3407	0,0303	9	-11,233	<0,0001
IGD - OPD	-0,3743	0,0303	9	-12,343	<0,0001
ISD - OFD	-0,0181	0,0303	9	-0,599	0,9300
ISD - OPD	-0,0518	0,0303	9	-1,707	0,3741
OFD - OPD	-0,0336	0,0303	9	-1,108	0,6937

Tabela A.18 – Contrastes na escala logarítmica M4 - DDA noNorm Proteínas

Contraste	Estimativa	DP	g.l.	t	p -valor
IGD - ISD	-0,3225	0,0322	9	-10,016	<0,0001
IGD - OFD	-0,3407	0,0322	9	-10,576	<0,0001
IGD - OPD	-0,3743	0,0322	9	-11,621	<0,0001
ISD - OFD	-0,0182	0,0322	9	-0,564	0,9403
ISD - OPD	-0,0518	0,0322	9	-1,608	0,4209
OFD - OPD	-0,0336	0,0322	9	-1,044	0,7296

Tabela A.19 – M3 versus M2 - DDA noNorm Proteínas

Modelo	g.l.	AIC ML	BIC ML	$\log(L)$	Razão L	p -valor
M2	7	3733147	3733233	-1866566		
M3	10	3731624	3731748	-1865802	1528,454	<0,0001

Tabela A.20 – M4 versus M3 - DDA noNorm Proteínas

Modelo	g.l.	AIC ML	BIC ML	$\log(L)$	Razão L	p -valor
M3	10	3731624	3731748	-1865802		
M4	22	3727615	3727887	-1863785	4033,522	<0,0001

Figura A.5 – M2: Modelo Linear Misto Homocedástico - DDA noNorm Proteínas

Figura A.6 – M3: Modelo Linear Misto Heterocedástico devido ao efeito de Tecido - DDA noNorm Proteínas

Tabela A.21 – Número de proteínas significantes por contraste - DDA noNorm
Proteínas

Contraste	Número de proteínas
NP: ISD - IGD	7
NP: OFD - IGD	8
NP: OFD - ISD	11
NP: OPD - IGD	5
NP: OPD - ISD	2
NP: OPD - OFD	5
P: ISD - IGD	7
P: OFD - IGD	9
P: OFD - ISD	9
P: OPD - IGD	6
P: OPD - ISD	5
P: OPD - OFD	7
pool: ISD - IGD	10
pool: OFD - IGD	7
pool: OFD - ISD	8
pool: OPD - IGD	1
pool: OPD - ISD	2
pool: OPD - OFD	6
T: ISD - IGD	6
T: OFD - IGD	4
T: OFD - ISD	8
T: OPD - IGD	2
T: OPD - ISD	3
T: OPD - OFD	5

Tabela A.22 – Lista de Proteínas - DDA noNorm

Proteína	Grafo	Proteína	Grafo
181	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	521	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas
645	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	42	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas
223	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	421	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas
502	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	1104	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas
1016	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	249	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas
1275	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	263	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas
2257	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	326	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas
53	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	689	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas
1589	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	921	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas
2017	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	1724	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas
535	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	1053	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas
1886	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	1541	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas
154	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	1669	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas
1427	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	137	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas
1234	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	85	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas
63	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	1536	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas
866	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	859	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
594	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	840	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
1493	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	2792	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
98	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	2518	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
232	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	1620	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
1790	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	641	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
2280	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	711	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
2423	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	1357	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
261	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	1326	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
1997	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	1623	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
1688	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	2687	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
1285	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	2428	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
2772	Grafo 1 - DDA noNorm Proteinas	1632	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
2512	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas	944	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
782	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas	1539	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
258	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas	1156	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
12461	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas	133	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
1194	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas	568	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas
884	Grafo 2 - DDA noNorm Proteinas	1368	Grafo 3 - DDA noNorm Proteinas

A.5 Experimento DDA - TIC Proteínas

Na Tabela A.24 estão apresentados os códigos das proteínas apresentados nos grafos probabilísticos na Seção 5.7, contendo 88 proteínas.

Tabela A.23 – Número de proteínas significantes por contraste - DDA TIC Proteínas

Contraste	Número de proteínas
NP: ISD - IGD	7
NP: OFD - IGD	7
NP: OFD - ISD	10
NP: OPD - IGD	5
NP: OPD - ISD	2
NP: OPD - OFD	8
P: ISD - IGD	6
P: OFD - IGD	8
P: OFD - ISD	9
P: OPD - IGD	6
P: OPD - ISD	5
P: OPD - OFD	8
pool: ISD - IGD	4
pool: OFD - IGD	6
pool: OFD - ISD	10
pool: OPD - IGD	1
pool: OPD - ISD	2
pool: OPD - OFD	6
T: ISD - IGD	3
T: OFD - IGD	2
T: OFD - ISD	8
T: OPD - IGD	2
T: OPD - ISD	3
T: OPD - OFD	5

Tabela A.24 – Lista de Proteínas - DDA TIC

Proteína	Grafo	Proteína	Grafo
142	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	1711	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
332	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	239	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
228	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	739	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
629	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	1666	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
1466	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	555	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
58	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	526	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
1236	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	2487	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
295	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	1158	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
531	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	1326	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
1162	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	3166	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
901	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	3086	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
374	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	1847	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
2105	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	209	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
2695	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	2914	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
884	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	1965	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
2847	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	924	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
1053	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	899	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
2740	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	1490	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas
1942	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	5	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
879	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	233	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
2733	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	439	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
2816	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	1331	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
2465	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	831	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
3	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	495	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
113	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	689	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
2130	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	292	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
1414	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	591	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
1245	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	1961	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
1194	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	900	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
1765	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	776	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
991	Grafo 1 - DDA TIC Proteínas	1172	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
40	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas	1867	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
125	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas	822	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
48	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas	803	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
1234	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas	1511	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
732	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas	1974	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
52	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas	778	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
272	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas	1468	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
1480	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas	671	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
422	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas	492	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
445	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas	4881	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
869	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas	802	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
830	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas	251	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas
1381	Grafo 2 - DDA TIC Proteínas	2134	Grafo 3 - DDA TIC Proteínas

Tabela A.25 – Estimativas das componentes de variância entre os experimentos avaliados

Experimento	u_1	u_2	u_3	Erro
SRM	0,0894	0,0615	0,0009	0,4125
DDA noNorm Peptídeos	0,0366	0,0333	0,0440	0,7177
DDA noNorm Proteínas	0,0430	0,0391	0,0440	0,7916
DDA TIC Peptídeos	0,0285	0,0261	0,0092	0,7177
DDA TIC Proteínas	0,0440	0,0223	0,0003	0,7924