



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Programa de Pós-Graduação em Biociências

Juliana Alves Rodrigues

**Investigação do papel de APE1 em modelos de câncer de mama: em busca
de novas funções moleculares**

Rio de Janeiro

2021

Juliana Alves Rodrigues

**Investigação do papel de APE1 em modelos de câncer de mama: em busca de novas
funções moleculares**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-
Graduação em Biociências, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha

Coorientador: Prof. Dra. Carolina Panis

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R696 Rodrigues, Juliana Alves.
Investigação do papel de APE1 em modelos de câncer de mama: em busca de novas funções moleculares / Juliana Alves Rodrigues. - 2021.
90 f.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Mencialha
Coorientador: Prof.^a Dra. Carolina Panis

Doutorado (Tese) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Mamas – Câncer– Teses. 2. Citoesqueleto – Teses. 3. Reparo do DNA - Teses. 4. Fator de Transcrição AP-1. I. Mencialha, André Luiz. II. Panis, Carolina. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 618.19-006.6

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Juliana Alves Rodrigues

**Investigação do papel de APE1 em modelos de câncer de mama: em busca de novas
funções moleculares**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-
Graduação em Biociências, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 16 de agosto de 2021.

Orientador: Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientador: Prof.^a Dra. Carolina Panis
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz
Instituto Nacional do Câncer

Prof. Dr. Pedro Nicolau Neto
Instituto Nacional do Câncer

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

À minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo presente da vida e as oportunidades diárias concedidas.

À minha família, as pessoas mais importantes da minha vida, a minha mãe e meu pai, Edna e Italo, pelo suporte incondicional, ao meu irmão Italo Júnior pelo apoio, a minha madrinha Carla e sua família, pelo incentivo e carinho.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Andre Mencialha, pelo suporte, ensinamento, paciência, dedicação e por compartilhar comigo todo conhecimento que tem e me ajudar a crescer durante todos esses anos de orientação, você foi o melhor mentor que poderia ter entrado no meu caminho durante esse, que foi um dos processos mais desafiadores que enfrentei.

Agradeço aos colegas do laboratório, Isis, Priscyane, Adilson, Keila, Diego, Matheus ao professor Adenilson Fonseca, por todo apoio, dias agradáveis de trabalho, pelas trocas de sempre, o suporte durante os momentos não tão fáceis, especialmente esse último um ano e meio, em que enfrentamos esse cenário tão caótico.

Agradeço aos meus amigos, especialmente os que resistiram às minhas mudanças durante o processo de amadurecimento, Carol Oliveira, Alessandra Filgueiras, Paula Mello, Mariana Bottany, Marina Coutinho, Alessandro Sales, Bruno Lamy, Mariana Braz, Thalita Scandolara, Alessandra Sá por todos os conselhos, paciência, escuta, ajuda durante esse período e por toda a vida.

Agradeço a minha co-orientadora Carolina Panis pela ajuda na realização das análises e pelos ensinamentos.

A metamorfose é irreversível.

Depois que voa, a borboleta
jamais volta a rastejar.

Wandy Luz

RESUMO

RODRIGUES, Juliana Alves. **Investigação do papel de APE1 em modelos de câncer de mama:** em busca de novas funções moleculares. 2021. 90f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

O câncer de mama é a segunda neoplasia que mais mata mulheres em países desenvolvidos e a primeira causa de morte em países em desenvolvimento. A via de reparo por excisão de base (BER) é responsável por reparar os danos causados por radicais livres no DNA, entretanto, o mau funcionamento contribui para a formação e progressão de tumores. A endonuclease APE1, principal enzima de BER, é responsável por preparar os sítios abásicos para continuidade do reparo e a expressão aumentada tem sido relacionada com agressividade e um prognóstico ruim. Desta forma, neste trabalho foi avaliada a função da endonuclease APE1 na proliferação, agressividade, e regulação gênica de modelos celulares de câncer de mama. O ensaio de WST-1 foi realizado para avaliar a viabilidade das culturas celulares após inibição da APE1 com o CRT0044876. O ensaio de Anexina V/7-AAD foi realizado para investigar o mecanismo de morte ativado pelo CRT0044876. Em seguida, foi realizado o ensaio de imunofluorescência com faloidina para avaliação do citoesqueleto de actina. Ademais, foi realizado o ensaio de microarranjo a fim de investigar as possíveis alterações de expressão gênica causadas pela inibição de APE1 e a validação por PCR em tempo real da expressão de genes relacionados a regulação da via de citoesqueleto. Foram realizados os ensaios de migração celular por *Wound-healing* e invasão celular em *Transwell*® com matrigel, para investigar o potencial metastático dos modelos celulares. Por fim, a análise de TCGA foi utilizada para investigar possíveis correlações da assinatura gênica da atividade de APE1 e expressão de genes de vias alteradas do microarranjo. O ensaio de viabilidade celular mostrou que a inibição da função endonuclease da APE1 é importante para viabilidade de células MDA-MB-231 e MCF-7, reduzindo em aproximadamente 50 % a viabilidade em culturas de células MDA-MB-231 e em 25 % a viabilidade em culturas de células MCF-7 incubadas com CRT0044876 em concentrações maiores que 1000 µM, após 6 h de tratamento. O ensaio de apoptose/necrose mostrou que ambos os mecanismos são acionados simultaneamente em células MDA-MB-231, onde as taxas de apoptose e necrose foram de aproximadamente 57% e 59%, respectivamente. A imunofluorescência em células MDA-MB-231 mostrou formação de lamelipódios e fibras de estresse. O microarranjo mostrou alteração de 2399 genes regulados positivamente e 496 genes regulados negativamente em células MDA-MB-231, sendo que a principal via alterada foi a relacionada à regulação do citoesqueleto. Em adição, o ensaio de migração celular mostrou variação significativa, aproximadamente 10%, após tratamento com CRT0044876 em células MDA-MB-231. Por fim, através da PCR pôde-se observar aumento de aproximadamente 11 vezes nos transcritos de *MMP1*, aumentado 8,25 vezes no microarranjo, em células MDA-MB-231. Em células MCF-7 houve redução de aproximadamente 4 vezes nos transcritos de *PAK2*, que aparece no microarranjo aumentado 2,92 vezes. Análises do TCGA, indicaram que há uma correlação média entre atividade da APE1 e a expressão de *MMP1*. No subtipo *basal-like* há maior expressão de *ENAH*, *NRAS*, *NCKAP1*, *DIAPH3* e *MMP1*. Desta forma, os resultados indicam que a inibição da função endonuclease da APE1 é importante para viabilidade em culturas de células MDA-MB-231 e MCF-7, porém só induz alteração morfológica em células MDA-MB-231. Tal inibição sugere ainda uma regulação gênica de APE1, principalmente em relação ao citoesqueleto e processo de migração de células MDA-MB-231.

Palavras-chave: APE1. BER. Microarranjo. Citoesqueleto.

ABSTRACT

RODRIGUES, Juliana Alves. **Investigation of the role of APE1 in breast cancer models: in search of new molecular functions.** 2021. 90f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Breast cancer is the second cancer that kills more women in developed countries and the first cause of death in developing countries. The basic excision (BER) repair pathway is responsible for repairing the free radical damage to DNA; however, the malfunction contributes to the formation and progression of tumors. APE1 endonuclease, the main BER enzyme, is responsible for preparing the abasic sites for repair continuity and increased expression has been related to aggressiveness and a poor prognosis. Thus, in the present study, the function of APE1 endonuclease in proliferation, aggressiveness, and gene regulation of cellular models of breast cancer was evaluated. WST-1 assay was performed to evaluate the viability of cell lines after APE1 inhibition with CRT0044876. Annexin V/7-AAD assay was performed to investigate the mechanism of death activated by CRT0044876. Immunofluorescence assay with Phalloidin was then performed to evaluate the actin cytoskeleton. In addition, microarray assay was performed to investigate possible gene expression changes caused by APE1 inhibition and real-time PCR validation of gene expression related to cytoskeleton pathway regulation. Wound-healing and cellular invasion cell migration trials were performed in Transwell® with matrigel to investigate the metastatic potential of cell models. Finally, TCGA analysis was used to investigate possible correlations of gene signature of APE1 activity and expression of altered microarray pathway genes. Cell viability assay showed that inhibition of APE1 endonuclease function is important for viability of MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines, reducing viability in MDA-MB-231 cell line by approximately 50 %, and viability in MCF-7 cell line by 25 %7 incubated with CRT0044876 at concentrations greater than 1000 µM after 6 h of treatment. Apoptosis/necrosis assay showed that both mechanisms are triggered simultaneously in MDA-MB-231 cells, where apoptosis and necrosis rates were approximately 57% and 59%, respectively. Immunofluorescence in MDA-MB-231 cell line showed formation of lamellipodia and stress fibers. Microarray assay showed alteration of 2399 positively regulated genes and 496 negatively regulated genes in MDA-MB-231 cells, with the main altered pathway being related to cytoskeleton regulation. In addition, cell migration assay showed significant variation, approximately 10%, after treatment with CRT0044876 in MDA-MB-231 cells. Finally, through PCR, it was possible to observe an increase of approximately 11 times in MMP1 transcripts, increased 8.25 times in microarray, in MDA-MB-231 cells. In MCF-7 cells there was a reduction of approximately 4 times in PAK2 transcripts, which appears in the increased microarray 2.92 times. GA analyses indicated that there is a mean correlation between APE1 activity and MMP1 expression. In the basal-like subtype there is more expression of ENAH, NRAS, NCKAP1, DIAPH3, and MMP1. Thus, the results indicate that inhibition of APE1 endonuclease function is important for viability in MDA-MB-231 and MCF-7 cell cultures, but only induces morphological alteration in MDA-MB-231 cells. Such inhibition also suggests a gene regulation of APE1, mainly in relation to the cytoskeleton and MDA-MB-231 cell migration process.

Keywords: APE1. BER. Microarray. Cytoskeleton.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da via de reparo por excisão de base (BER)..	20
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura do gene <i>APEX1</i>	22
Figura 3 - Representação esquemática da proteína e funções da APE1.....	23
Figura 4 - Representação dos processos biológicos regulados pela APE1 em células tumorais.....	25
Figura 5 - Viabilidade celular em culturas de células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....	42
Figura 6 - Viabilidade celular em culturas de células MCF-7 incubadas com CRT0044876.....	43
Figura 7 - Taxa de morte celular por apoptose e necrose em culturas de células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....	44
Figura 8 - Representação da expressão dos genes alterados da célula MDA-MB-231 após incubação com CRT0044876.....	45
Figura 9 - Agrupamento do KEGG dos genes diferencialmente expressos em vias de sinalização em células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876...	48
Figura 10 - Agrupamento do <i>Reactome</i> dos genes diferencialmente expressos em vias de sinalização em células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....	50
Figura 11 - Agrupamento do <i>geneontology Cellular component</i> dos genes diferencialmente expressos em vias de sinalização em células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....	52
Figura 12 - Fotografias representativas de células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....	53
Figura 13 - Fotografias representativas de células MCF-7 incubadas com CRT0044876.....	54
Figura 14 - Fotografia da imunofluorescência do citoesqueleto de actina da célula MDA-MB-231 após incubação com CRT0044876.....	55
Figura 15 - Taxa de migração de células MDA-MB-231 e MCF-7 incubadas com CRT0044876.....	57

Figura 16 - Taxa de invasão de células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....	59
Figura 17 - Nível de transcritos <i>APEX1</i> em células MDA-MB-231 e MCF-7 incubadas com CRT0044876.....	60
Figura 18 - Nível de transcritos <i>MMP1</i> , <i>PAK2</i> e <i>ARHGEF12</i> em células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....	62
Figura 19 - Níveis de transcritos <i>MMP1</i> , <i>PAK2</i> e <i>ARHGEF12</i> em células MCF-7 incubadas com CRT0044876.....	63
Figura 20 - <i>Heatmap</i> da correlação entre a assinatura gênica de atividade de APE1 e a expressão dos genes alterados da via de regulação de citoesqueleto de actina.....	65
Figura 21 - Níveis de expressão dos genes da via de regulação de citoesqueleto de actina alterados no microarranjo de acordo com subtipos tumorais.....	68
Figura 22 - <i>Heatmap</i> da correlação entre a assinatura gênica da atividade da APE1 e a expressão de <i>MMP1</i>	70
Figura 23 - Níveis de expressão de <i>MMP1 in silico</i> de acordo com subtipos tumorais.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Tabela da sequência e ciclagem dos <i>primers</i> utilizados na RT-qPCR.....	38
Tabela 2 –	Tabela dos 20 genes com maior alteração na expressão do microarranjo após tratamento com CRT0044876 da célula MDA-MB-231.....	46
Tabela 3 –	Coefficientes de correlação entre a expressão dos genes da via de regulação de citoesqueleto e assinatura gênica da atividade de APE1.....	66
Tabela 4 –	Coefficientes de correlação entre <i>MMP1</i> e assinatura gênica da atividade da APE1.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	<i>7-aminoactinomycin D</i>
8 - oxoG	<i>8-Oxoguanine</i>
<i>ACTNβ</i>	<i>Beta-actin</i>
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
APE1	<i>Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1</i>
<i>APEX1</i>	<i>Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1</i>
BER	<i>Base Excision Repair</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
Cdc42	<i>Cell division cycle 42</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ER/PR	<i>Estrogen Receptor/ Progesterone Receptor</i>
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha</i>
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	micro RNA
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NF κ -B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Rac1	<i>Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1 (Rho Family, Small GTP Binding Protein Rac1)</i>
Rho-GTPase	<i>Small G proteins Ras-like GTPases</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT-qPCR	<i>quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
STAT3	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription 3</i>
TM	Temperatura de Melt

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	micrômetro
nm	nanômetro
mmHg	milímetro de mercúrio
α	alfa
β	beta
Kb	quilobase
<	menor que
>	maior que
CO ₂	gás carbônico
O ₂	oxigênio
mg/mL	miligrama por mililitro
%	por cento
U/mL	unidade por mililitro
h	hora
±	mais ou menos
°C	graus Celsius
cm ²	centímetro ao quadrado
bp	<i>base pair</i>
min	minuto
μM	micromolar
mM	milimolar
μg	micrograma
mA	miliAmpère
rpm	rotação por minuto
μL	microlitro
mL	mililitro
ΔG	delta G (variação de energia livre de Gibbs)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	16
1	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1.1	Danos no DNA e Via de Reparo por Excisão de Base.....	17
1.2	AP-endonuclease 1 (APE1)	21
1.3	AP-endonuclease 1 e câncer.....	24
1.3.1	<u>AP-endonuclease 1 e câncer de mama.....</u>	26
1.3.2	<u>AP-endonuclease 1 como possível alvo terapêutico.....</u>	27
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Objetivos gerais.....	29
2.2	Objetivos específicos.....	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1	Cultura de células.....	30
3.2	Viabilidade Celular.....	31
3.3	Avaliação de indução de apoptose e necrose.....	32
3.4	Ensaio de fluorescência.....	32
3.5	Extração de RNA.....	33
3.6	Tratamento com DNase.....	34
3.7	Síntese de cDNA.....	34
3.8	Microarranjo de DNA.....	35
3.9	Ensaio de migração – <i>Wound Healing</i>.....	36
3.10	Ensaio de invasão em <i>transwell</i>.....	36
3.11	Elaboração de <i>primers</i>	37
3.12	PCR em tempo real (RT-qPCR).....	38
3.13	<i>The Cancer Genome Atlas</i> (TCGA)	39
3.14	Análise estatística.....	40
4	RESULTADOS.....	41
4.1	Avaliação da viabilidade celular em culturas de células MDA-MB-231 e MCF-7 incubadas com CRT0044876.....	41
4.2	Avaliação do tipo de morte celular em culturas de MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....	43
4.3	Avaliação da expressão gênica por microarranjo em células MDA-MB-231	

	incubadas com CRT0044876.....	
4.4	Avaliação da morfologia de células MDA-MB-231 e CRF-7 incubadas com CRT0044876.....	44
4.5	Avaliação da migração celular de células MDA-MB-231 e MCF-7 incubadas com CRT0044876.....	53
4.6	Avaliação da invasão de células MDA-MB-231 incubadas com CRT0044876.....	56
4.7	Avaliação dos níveis de transcrito de APEX1 em células MDA-MB-231 e MCF-7 incubadas com CRT0044876.....	58
4.8	Validação do microarranjo de células MDA-MB-231 por RT-qPCR.....	60
4.9	Análise in silico da correlação da assinatura de atividade de APE1 com a expressão dos genes de regulação de citoesqueleto de actina.....	61
4.10	Análise in silico dos subtipos tumorais e expressão dos genes da via de regulação de citoesqueleto de actina alterados no microarranjo.....	64
4.11	Análise in silico da correlação da expressão de MMP1 com assinatura de APE1.....	66
4.12	Análise in silico dos subtipos tumorais e expressão de MMP1.....	69
5	DISCUSSÃO.....	71
	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS.....	79
	APÊNDICE A- Expressão dos genes da via de regulação de citoesqueleto de actina alterados no microarranjo de acordo com subtipos tumorais.....	80
		91

INTRODUÇÃO

A via de reparo por excisão de base (BER) é responsável por restaurar danos no DNA causados por oxidação, alquilação e quebras de fita simples. O mau funcionamento da via de BER está diretamente associado ao surgimento e progressão de alguns tumores, sobretudo o câncer de mama (MADHUSUDAN *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2012; ALI *et al.*, 2016). A via de BER é composta por pelo menos 11 glicosilases, responsáveis pelo reconhecimento dos danos, e aproximadamente, 20 outras enzimas responsáveis pela remoção da base danificada e reposição de uma base sem danos (WU *et al.*, 2012; KROKAN e BJORAS, 2013). A compreensão dos componentes da via de BER e sua relação com o câncer de mama pode desvendar novas características da doença, assim contribuir para descoberta de tratamentos mais eficazes.

AP-endonuclease 1 (APE1, do inglês: *apurinic/aprimidinic endonuclease 1*), uma das enzimas cruciais para o perfeito funcionamento da via de BER, é responsável pela remoção da base danificada, gerando um sítio abásico. Além disso, APE1 também é requerida para ativar, em resposta ao metabolismo redox, múltiplos fatores transcricionais como NF- κ B, HIF-1 α , p53, AP-1. APE1 também atua como co-reguladora transcricional de diversos genes (WOO *et al.*, 2014; GUERREIRO *et al.*, 2016; ROYCHOUDHURY *et al.*, 2016). Woo e colaboradores (2014) demonstraram que o aumento nos níveis de expressão da APE1 no núcleo de células de câncer de mama está relacionado à maior atividade no reparo do DNA. Porém, ainda não são conhecidos os efeitos da inibição do domínio C-terminal, relacionado à função endonuclease da APE1, para a função biológica da célula tumoral. Tão menos ainda se sabe sobre outras alterações moleculares decorrentes da inibição do domínio de reparo da APE1 em células de câncer de mama.

O desenvolvimento do câncer de mama está relacionado a diversos fatores, dentre os quais destacam-se os relacionados a hábitos alimentares, fatores ambientais, reprodutivos e genéticos (KUMAR *et al.*, 2016). Alguns estudos demonstram que o funcionamento incorreto dos mecanismos de reparo também está associado ao surgimento e desenvolvimento do câncer de mama (WU *et al.*, 2012; ALI *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2016; LIRUSSI *et al.*, 2016). Além disso, as vias de reparo de DNA também estão associadas aos mecanismos de resistência aos tratamentos contra o câncer (WU *et al.*, 2012; ALI *et al.*, 2016; CREE e

CHARLTON, 2017). É, portanto, de suma importância a compreensão das atividades dos componentes responsáveis pelo funcionamento das vias de reparo, principalmente quando este apresenta funções diretamente relacionadas às atividades celulares, como é o caso da proteína APE1, que atua em diversos mecanismos que contribuem para promoção e progressão tumoral (ABBOTTS e MADHUSUDAN, 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

Para esse trabalho, foram utilizadas como modelos experimentais, culturas de células de linhagens de células de câncer de mama humana, MDA-MB-231 (HTB-26, ATCC) e MCF-7 (HTB22, ATCC). Células da linhagem MDA-MB-231 apresentam o perfil de um subtipo de câncer de mama que exibe ausência de marcadores moleculares, ER, PR e HER2, ou seja, triplo negativa, tem um elevado potencial de metástase e é pouco diferenciada, assemelhando-se a um dos subtipos de câncer de mama mais agressivo e de pior prognóstico (DIAS *et al.*, 2017). Enquanto as células da linhagem MCF-7 são ER+ e PR+, com fenótipo bem diferenciado e se assemelha ao subtipo de câncer de mama luminal A, que possui melhor prognóstico (SUBIK *et al.*, 2010).

As células foram cultivadas em atmosfera de 37 °C e 5% de CO₂, em presença de meio de cultura RPMI 1640 (Life Technologies, Thermo Fisher, USA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen, USA), 2 mM de Glutamina, 100 mg/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina (Invitrogen, USA).

A semeadura de novas culturas celulares foi realizada quando as culturas anteriores atingiram a confluência de 80%, aproximadamente, e foi utilizada a proporção de 1:4 com auxílio de tripsina EDTA 1× (Invitrogen, USA), sendo semeadas em outras garrafas para manutenção das culturas. Para os experimentos, as células foram semeadas em uma densidade de 10.000 células/cm² e, após 24 h, os ensaios experimentais foram realizados. Neste caso, antes da semeadura das células, o número de células foi estimado por contagem das células viáveis em câmara de Neubauer com auxílio do azul de tripan a 0,4%. Este corante penetra e não é expelido pelas células não viáveis, deixando-as azuis, permitindo identificar e diferenciar das células viáveis que são proficientes na extrusão do corante. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas garrafas de cultura e placas de 96 poços.

Para armazenamento das células, foram realizados protocolos de congelamento para manutenção de estoques em 90% SFB/10% Dimetilsulfóxido (DMSO). As preparações foram resfriadas gradativamente, seguindo protocolo de 16 h a -20 °C, em seguida para -70 °C pelo período mínimo de 24 h até o máximo de 1 mês e, por fim, as células foram armazenadas a -

196 °C em nitrogênio líquido. Para o descongelamento e reposição da cultura, as células foram retiradas do freezer -70 °C e incubadas a 37 °C. Após total descongelamento, as células foram lavadas com 5 mL de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS, em português, Tampão Fosfato-Salino; NaCl; 80 g/L, KCl; 2 g/L, Na₂HPO₄; 11,4 g/L e KH₂PO₄; 2,7 g/L) 1× e cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 20 % de SFB até a primeira semeadura. Após esse período, as células foram mantidas em meio RPMI 1640 como descrito acima.

3.2 Viabilidade Celular

O ensaio de WST-1 consiste em um método colorimétrico baseado na capacidade de células converterem o sal Tetrazolium (4-[3-(4-Iodophenyl) -2-(4-nitrophenyl) -2H-5-tetrazolio] -1,3-benzene disulphonate) em corante Formazan. Essa conversão é realizada pela enzima mitocondrial succinato-tetrazolium redutase e somente ocorre em células viáveis. Com isso, através de variações na coloração do meio contendo WST-1, é possível inferir a proporção de células viáveis comparando as diferentes condições de tratamento. Para os ensaios de WST-1, as células foram semeadas em 150 µL de meio de cultivo, em placas de 96 poços a uma densidade de 7×10^3 células/cm² e tratadas com diversas concentrações de CRT0044876, citadas adiante. Após o período do tratamento, foram adicionados 3 µL de WST-1 em cada poço e, em seguida, as placas foram mantidas durante 2 h a 37 °C em estufa umidificada contendo 5 % CO₂. A quantificação das variações colorimétricas foi realizada em um leitor de Elisa (Polaris EE, Celler, Brasil) utilizando o comprimento de onda de 450 nm com a referência de 630 nm. Neste ensaio 150 µL de meio de cultivo com células e 3 µL de WST-1 foram utilizados como controle negativo para os tratamentos. Como padronização de “branco de reação” para leitura no leitor de Elisa foram utilizados 150 µL de meio de cultivo sem células e 3 µL de WST-1. A porcentagem de células viáveis, após os períodos de tratamentos, foi determinada pela razão entre a absorbância obtida das culturas tratadas e a absorbância das culturas não tratadas.

Para analisar o potencial citotóxico do CRT0044876, as células foram incubadas na presença deste agente químico nas concentrações de 100 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM e 1500 µM até a avaliação da viabilidade no tempo total de 6 h. As concentrações e período de incubação foram definidos de acordo com resultados obtidos previamente, durante o período

do mestrado, através da adaptação dos efeitos descritos por Madhusudan e colaboradores (2005). A porcentagem máxima de DMSO em cultura não ultrapassou 1%.

3.3 Avaliação de indução de apoptose e necrose

A externalização de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática é um dos primeiros eventos que ocorre na superfície de uma célula em processo de apoptose ou de necrose, sendo que esta perda de assimetria do fosfolípido de membrana contribui para facilitar o reconhecimento por proteínas dependente de íons cálcio, como a Anexina V (BOERSMA *et al.*, 2005; GALLUZI *et al.*, 2012).

Para detecção de apoptose e necrose foi utilizado o Kit de detecção de apoptose FITC Anexina V/7-AAD (BioLegend, USA). Para este ensaio, as células previamente cultivadas e tratadas, conforme descrito previamente, em garrafas de 25 cm² foram tripsinizadas e lavadas em PBS 1×. Após lavagem, as células foram passadas numa peneira e contadas. Foram transferidas 10⁵ células para tubo FACS (acrônimo em inglês para *Fluorescence-activated cell sorting*) e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado celular foi adicionado 100 µL de tampão de ligação e em seguida acrescentados 2 µL de FITC Anexina V e 2 µL de 7-AAD. As células foram então incubadas em temperatura ambiente por 15 min protegidas da luz, e posteriormente foi adicionado mais 400 µL de tampão de ligação e realizado a aquisição de cerca de 10000 eventos em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences, USA). Para análise dos dados foi utilizado o software CellQuest (BD Biosciences, USA).

3.4 Ensaio de fluorescência

As modificações no citoesqueleto celular em resposta a tratamento com CRT0044876 foram avaliadas através da análise, por fluorescência, dos filamentos de actina polimerizada. A estratégia empregada para coloração da actina-F foi o uso da toxina faloidina-TRITC, uma falotoxina presente em cogumelos da espécie *Amanita phalloides* que se liga especificamente às actinas-F.

As células foram semeadas em lamínulas de vidro, sob condições estéreis em placas de 24 poços (uma lamínula por poço). As células foram semeadas numa quantidade de 10^4 células 1 mL de meio específico visando obter uma densidade média de 40 a 60% de células ao término do experimento. As células foram tratadas com CRT 0044876 e, após 6 h de incubação, o meio com CRT foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1× a 37 °C para remoção de resíduos de SFB e células mortas. Em seguida foram adicionados 500 µL de paraformaldeído (PFA) 4% (Sigma-Aldrich, USA) por poço para a fixação das células. Após 30 min, o PFA foi removido, os poços foram preenchidos com PBS 1× e a placa foi mantida a 4-8 °C por 18 h, aproximadamente. As lamínulas foram retiradas dos poços com o auxílio de pinças, lavadas duas vezes com PBS 1× e incubadas por 5 min em Triton 0,1% em PBS 1×, em seguida, lavadas duas vezes com PBS 1× e incubadas por 1 h em câmara úmida na presença de 20 µL de faloidina-TRITC (50 ng/ml), e reconstituída em Metanol P.A. Após esse procedimento, a lamínula foi lavada três vezes com PBS 1× e foi acrescentado o fluoróforo marcador de ácidos nucleicos DAPI (cloridrato de 4',6- diamindino-2-fenilindol; 10 µM, Vector Laboratories, USA).

Após a incubação, as lamínulas foram novamente lavadas duas vezes com PBS 1×, montadas sobre 30 µL de glicerol-PPD (p- fenilenodiamina, Sigma-Aldrich, USA) sobre lâminas de vidro e seladas com esmalte transparente. As análises microscópicas das lâminas foram realizadas no Departamento de Histologia e Embriologia da UERJ, no microscópio de fluorescência (Microscope Axio Observer.A1, Zeiss-Vision, Alemanha).

3.5 Extração de RNA

Para realização de PCR em tempo real, após o período de tratamento, foi realizada a extração de RNA total com auxílio do reagente TRIzol (Invitrogen, USA). Para extração de RNA, as células foram centrifugadas (1500 rpm, 5 min, 25 °C), o precipitado celular foi homogeneizado em 1 mL de TRIzol, seguindo com adição de 200 µL de clorofórmio. Os lisados celulares foram centrifugados (12000 g por 15 min a 4 °C), a fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo de 1,5 mL e os RNAs foram precipitados com a adição de 500 µL de isopropanol 100%. Após 24 h a -20 °C, as preparações foram

submetidas à centrifugação (12000 g, 30 min, 4 °C), sobrenadante foi descartado, os precipitados foram reconstituídos em etanol a 80 % e centrifugados (5 min, 12000 g, 4 °C). O sobrenadante foi descartado, as preparações foram mantidas à temperatura ambiente por 5 min para total evaporação do etanol e, posteriormente, reconstituídas em solução aquosa de dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma-Aldrich, USA) a 0,1%. A quantificação de RNA nas preparações foi realizada através de espectrofotometria com auxílio do equipamento Nanodrop 1000 (NanoDrop, USA). As soluções de RNA total foram armazenadas a -70 °C até a sua utilização.

3.6 Tratamento com DNase

Após a extração do RNA total, as preparações foram incubadas com DNase para remoção de resquícios de moléculas de DNA indevidamente obtidas da extração de RNA. Para tal, foi utilizada a DNase amplification grade I (Invitrogen, USA). Para tal, cerca de 2 µg de RNA total foram incubados com 1 U de DNase e 1× de Tampão DNase 10× em um volume total de 9 µL, por 15 min a 25 °C. A reação foi inativada adicionando 1 µL de EDTA a 25 mM e incubado a 65 °C por 10 min.

3.7 Síntese de cDNA

Para avaliação dos níveis de mRNA, RNA total foi convertido em *Complementary DNA* (cDNA, em português, DNA complementar) com auxílio do SCRIPT cDNA synthesis kit (Promega, USA). Brevemente, à reação do RNA tratado com DNase foram adicionados 4 µL de tampão 5× First-Strand, 1 µL de OligodT (500 µg/mL), 1 µL *Deoxynucleotide Triphosphates* (dNTP, em português, Desoxirribonucleotídeos Trifosfato) Mix (10 mM), 1 µL de Script Enzima RT. A síntese de cDNA foi realizada através de incubação das preparações por 50 min a 42 °C e posterior inativação da enzima a 70 °C por 15 min. As reações de síntese de cDNA foram realizadas em termociclador.

3.8 Microarranjo de DNA

Para síntese de cDNA foi utilizado o kit *WT Expression Kit* (Ambion®, Life Technologies™, USA), conforme recomendação do fabricante (Affymetrix, Gene Chip Expression Analysis Technical Manual - Affymetrix Inc., USA). Cerca de 200 ng de RNA total de 3 experimentos independentes foram convertidos em cDNA dupla-fita utilizando o oligonucleotídeo iniciador T7-Oligo (dT). Seguindo para a síntese do cRNA (RNA complementar) biotinizado, o volume total do cDNA sintetizado através reação para a transcrição *in vitro*, incubando a preparação por 16 h a 40 °C no termociclador *Veriti* (Applied Biosystems, USA). Em seguida, o cRNA foi purificado utilizando *beads* magnéticas (Nucleic Acid Binding Beads, Ambion®, Life Technologies™, USA). Após síntese do cRNA, estes foram hibridizados contra o chip de microarranjo *Human Exon 1.0 ST* (Affymetrix Inc., USA). Todo o processo de lavagem e coloração foi feito na estação fluídica GeneChip® Fluidics Station 450 de acordo com a recomendação do fabricante. Para a leitura óptica dos chips *Human Exon 1.0 ST*, os arranjos de sonda foram lidos em scanner GeneArray® Scanner 7G (Affymetrix Inc., USA), e a captura das imagens e análise inicial das hibridações foram feitas com o software Affymetrix® Expression Console™ e os arquivos gerados foram salvos em formato *.cel. Os dados obtidos na aquisição dos sinais de fluorescência presentes nos arquivos *.cel foram normalizados e sumarizados utilizando o software *Expression Console* (Affymetrix Inc., USA).

Foram comparadas células tratadas com inibidor CRT0044876 na concentração 1000 µM pelo período de 6 h e não tratadas. Após a seleção dos genes diferencialmente expressos, usando como ponto de corte $\pm 1,5$ vezes, eles foram agrupados em vias de sinalização, utilizando a ferramenta WebGestalt 2019 (WEB-based Gene Set AnaLysis Toolkit) (WANG *et al.*, 2017; LIAO *et al.*, 2019) e o método GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). Os bancos de dados *geneontology Cellular componente*, Reactome (ASHBURNER *et al.*, 2000; CARBON *et al.*, 2009; CARBON *et al.*, 2019) e KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (OGATA *et al.*, 1999) foram usados na análise de agrupamento dos genes alterados em processos biológicos ou vias de sinalização.

3.9 Ensaio de migração celular – *Wound Healing*

A fim de avaliar o efeito da inibição de APE1 na capacidade de migração das células, foi realizado o ensaio de *Wound Healing*. Esse ensaio consiste na remoção de parte da monocamada de células através de um risco realizado com o auxílio de uma ponteira de micropipeta. Para tal, 4×10^4 cel/cm² foram cultivadas em placas de 6 poços com 2 mL de RPMI 1640 suplementado, em atmosfera 37 °C, CO₂ a 5 %, por 24 h. O SFB dessas culturas celulares foi reduzido a 1 %, para diminuir a proliferação. Após 18 h, aproximadamente, foi feita a remoção longitudinal de parte das células com a ponteira de 200 µL. Em seguida, as células foram lavadas com 2 mL PBS 1× e incubadas em meio de cultivo suplementado com 1% de SFB e foi realizado o tratamento com CRT0044876 na concentração de 250 µM. O espaço aberto foi fotografado, usando uma câmera digital (MOTO G6 Plus, Motorola Mobility, USA) e microscópio óptico invertido INV-100 utilizando ampliação de 100 × (Bel Engineering, Itália), em intervalos de 0 h e 24 h, para os grupos tratados e não tratados. A quantificação da migração celular foi obtida através da redução do espaço aberto em comparação com os seus respectivos controles, por meio do software imageJ, MRI *wound healing toll* (http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Wound_Healing_Tool). Foram realizados pelo menos três experimentos independentes.

3.10 Ensaio de invasão em *transwell*

Para avaliar o efeito da inibição de APE1 na capacidade de invasão das células MDA-MB-231, foi utilizado o ensaio de invasão celular em *transwell* com matrigel. Para tal, culturas destas células foram realizadas até que atingissem a densidade de 4×10^4 cel/cm² em placas de 6 poços com 2 mL de RPMI 1640 suplementado, em atmosfera CO₂ a 5 %, a 37 °C, por 24 h. O SFB dessas culturas celulares foi reduzido a 1%, para não influenciar a proliferação e não promover morte. A câmara de *transwell* (Corning, USA), poro de 8.0 µm, foi umedecida com meio RPMI 1640 sem SFB por 1 min, seguido de aplicação de 30 µL de matrigel (Sigma-Aldrich, USA) a 1 mg/mL e incubação a 37 °C por 45 min. Após período de

2 h para gelificação da matrigel, uma suspensão de 3×10^4 cel/poço em 200 μ L de meio RPMI 1640 com 1% de SFB foi adicionada à parte superior da câmara. O fundo do poço foi preenchido com 500 μ L de RPMI 1640 com 10% de SFB, seguindo com tratamento das células com CRT0044876 na concentração de 250 μ M. Em seguida, a placa foi incubada a 37 °C por 24 h. O meio de cultura foi removido, as células foram fixadas com etanol absoluto e coradas com cristal violeta a 0,005 %, ambos por 10 min, seguido de lavagem com água destilada até completa remoção do excesso de corante. As células que não atravessaram o matrigel foram removidas da área superior com uma haste flexível. Após secagem da câmara em temperatura ambiente, as imagens foram adquiridas com o microscópio óptico invertido Olympus IX71 (Tóquio, Japão) utilizando ampliação de 20 \times equipado com fluorescência, e a contagem do número de células que atravessaram para região inferior foi realizada com o uso do software ImageJ (v.1.8.0_112).

3.11 Elaboração de *primers*

As sequências dos genes alvos avaliados foram obtidas por meio da base de dados de genes do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e do Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Todas as variantes de transcrito do mesmo gene foram alinhadas a fim de se encontrar regiões comuns entre elas, a partir das quais foram selecionadas as sequências dos *primers*, cuidando para que a região escolhida, quando possível, se localizasse em dois éxons adjacentes diferentes. As sequências selecionadas foram verificadas quanto a determinados parâmetros através da ferramenta OligoAnalyzer 3.1, da seção SciTools, pertencente à plataforma IDT DNA (acrônimo em inglês para *Integrated DNA Technologies*), tais como: tamanho do *primer* (18-24 pares de bases), produto da PCR de 70-150 pares de bases, temperatura do *primer* ou T_M (temperatura de melt) entre 55 °C-60 °C, temperatura para formação de hairpin inferior a 35 °C e o $\Delta G > -10$ para a formação de homodímero e heterodímero (BUSTIN, 2000).

Os *primers* também foram analisados quanto à especificidade de ligação à sequência de interesse por meio do algoritmo BLAST (acrônimo em inglês para *Basic Local Alignment Search Tool*) disponível on-line através do endereço eletrônico

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>. Os seguintes *primers* foram utilizados:

Tabela 1 – Sequência e condições de ciclagem dos *primers* utilizados na RT-qPCR

Gene	<i>primer forward</i>	<i>primer reverse</i>	Ciclagem
<i>APEXI</i>	5'- ATACTGGTCAGCTCCTTCGG -3'	5'- GCATAGGCGATGAGGAGCAT -3'	95 °C 15 s - 56 °C 20 s - 72 °C 20 s
<i>MMP1</i>	5'-AATAGTGGCCCAGTGGTTGAA-3'	5' GTCAGATGTGTTTGTCTCCAG-3'	95 °C 20 s - 60 °C 45 s
<i>PAK2</i>	5'-CCAGAAAGTGGGCTCGATT-3'	5'-TCTGTTCCTTGGCATTGAGTG-3'	95 °C 20 s - 60 °C 45 s
<i>ARHGEF12</i>	5'-GGTGAATGGAACCTGGTGACT-3'	5'-CCAGATGCTCCAGGTGAATGA-3'	95 °C 20 s - 60 °C 45 s
<i>ACTNβ</i>	5'-GAGCGCGGCTACAGCTT-3'	5'-TCCTTAATGTCACGCACGATT-3'	95 °C 20 s - 65 °C 45 s

Legenda: Tabela dos genes selecionados para elaboração dos primers e validação do microarranjo, com as respectivas sequências e ciclagens. *APEXI* (acrônimo em inglês para *apurinic/aprimidinic endodeoxyribonuclease 1*), *MMP1* (acrônimo em inglês para *matrix metalloproteinase-1*), *PAK2* (acrônimo em inglês para *P21 (RAC1) Activated Kinase 2*), *ARHGEF12* (acrônimo em inglês para *Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 12*) e *ACTNβ* (acrônimo em inglês para *Actin Beta*).

3.12 PCR em tempo real (RT-qPCR)

A RT-qPCR foi utilizada para avaliar os níveis dos genes selecionados e citados anteriormente e, para a então validação do microarranjo de RNA. Após tratamento da cultura celular com concentração de 1 mM de CRT0044876 por um intervalo de tempo de 6 h, foram realizadas as extrações e as reações de síntese de cDNA foram utilizadas para amplificação por PCR utilizando *Master Mix Sybr Green Master* (Promega). As reações das PCRs foram realizadas em volumes finais de 10 µL contendo 0,5 µM de cada *primer* e foram realizadas no termociclador Rotor-Gene 6000 (Qiagen). As análises foram realizadas com auxílio do programa *Rotor-Gene 6000 Series Software* (Qiagen). Os níveis de mRNA dos genes *APEXI*, *MMP1*, *PAK2* e *ARHGEF12* foram normalizados pelos níveis de mRNA do gene *ACTNβ*. As reações foram feitas em triplicata experimental de pelo menos cinco experimentos

independentes, e as quantificações foram determinadas através do cálculo de $\Delta\Delta Ct$ (LIVAK e SCHITTIGEN, 2001).

3.13 The Cancer Genome Atlas (TCGA)

Para as análises *in silico* dos níveis de mRNA e subtipos tumorais foram utilizados dados públicos de pacientes com câncer de mama, obtidos do TCGA (acrônimo em inglês para *The Cancer Genome Atlas Program*) com coorte BRCA. O TCGA é um projeto que disponibiliza dados de sequenciamento do genoma e bioinformática, sendo composto por diversos tipos de cânceres. A coorte BRCA faz parte do projeto que é composta apenas por amostra de paciente de câncer de mama. Os dados podem ser gerados pelo TCGA *Research Network* (<https://www.cancer.gov/tcga>).

Todas as análises foram feitas na plataforma online do UCSC Xena (GOLDMAN *et al.*, 2020). Essa plataforma permite aos usuários agrupar conjuntos de dados genômicos para correlações entre variáveis genômicas e/ou fenotípicas. Além disso, utilizando os dados de microarranjo disponíveis, é possível organizar os dados de expressão gênica dos pacientes através de assinaturas gênicas. Essas assinaturas são formadas por uma equação onde cada gene contribui de forma positiva ou negativa e o resultado dessa equação indica níveis elevados ou reduzidos de acordo com perfis gênicos relacionados à análise. Ou seja, a coorte dos pacientes é organizada e distribuída desde elevados até baixos níveis de expressão de acordo com o resultado final da equação.

A assinatura de atividade de APE1 utilizada neste trabalho é composta por genes que se correlacionaram com a proteína em pacientes de câncer de mama e os que apresentaram maiores valores de expressão da equação dessa assinatura foram classificados como alta atividade de APE1. A seguinte assinatura foi cedida pelo autor Emiliano Dalla (AYYILDIZ *et al.*, 2020) e é composta por genes regulados positivamente (+) e negativamente (-), desta forma, e a equação gerada foi = + *RPLP1* + *PRPF19* + *TUFM* + *PHB* + *LRRC59* + *AHCY* + *NME1* + *TUBA1B* + *CDK5* + *KPNA2* + *FNI* + *GSTM1* + *RPLP0* + *ILF2* + *TRIM28* + *RAN* + *CCT3* + *MYL6* + *NUDC* + *DDBI* + *ARHGDI1* + *PSMD2* + *EIF4A3* + *CCT2* + *CKAP4* + *SRPRB* + *LGALS1* + *SHMT2* + *FH* + *ATP1A1* + *PHGDH* + *GGH* + *NPM1* + *CCT4* + *RPL7* +

SET + XRCC5 + RPL4 + RARS + ARCNI + WDR61 + RAC1 + RHOA + ACTB + RPA1 + PRDX6 + WDR5 + GNB1 + DCTN2 + TXNL1 + EIF3J + NDUFV1 + HARS + ACTR2 + UQCRC2 + COPS4 + APP + PCMT1 + PGD + RTN3 + EPHX1 + PSPH + CNP - SUGT1 - HUS1 - CLIC4 - EIF4A1 - OXCT1.

3.14 Análise estatística

Os dados foram apresentados a partir das médias dos resultados encontrados \pm erro padrão, no caso de amostras que seguiam distribuição normal, e mediana e quartis para amostras que não apresentavam distribuição normal. Para determinar se um grupo de amostras possuía uma distribuição normal, foi realizado do teste Kolmogorov-Smirnov. Para os experimentos que passaram pelo teste de normalidade as comparações foram realizadas com o t de Student para dois grupos experimentais e ANOVA para comparação de três ou mais grupos experimentais, seguido de pós-teste de Bonferroni. Para experimentos não paramétricos, as análises comparativas entre dois grupos experimentais foram realizadas com o teste de Mann Whitney, e para três ou mais grupos experimentais utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunns. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para o valor de $p < 0,05$, e nas análises do Webgestalt os valores significativos consideraram o FDR (acrônimo para inglês *false discovery rate*) $< 0,05$. Nas análises dos testes de correlação foi considerado o coeficiente de Spearman para comparação das amostras, visto que estas não apresentam uma distribuição normal.