

GUILHERME DE MELO OLIVEIRA GOMES

**ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR E EXPRESSÃO DE miR-671 EM
MODELO *IN VITRO* DE NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA
INDUZIDA POR MPP⁺**

BRASÍLIA

2025

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GUILHERME DE MELO OLIVEIRA GOMES

ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR E EXPRESSÃO DE miR-671 EM
MODELO *IN VITRO* DE NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA INDUZIDA
POR MPP⁺

Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do Título de Mestre
em Ciências da Saúde pelo Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Titze de
Almeida

BRASÍLIA

2025

GUILHERME DE MELO OLIVEIRA GOMES

ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR E EXPRESSÃO DE miR-671 EM
MODELO *IN VITRO* DE NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA INDUZIDA
POR MPP⁺

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 14 de agosto de 2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Titze de Almeida (presidente)
Universidade de Brasília

Dra. Mary-Ann Elvina Xavier (membro titular)
Universidade de Brasília

Dr. Fernando Francisco Borges Resende (membro titular)
Uniceplac – Centro Universitário Planalto Central Aparecido dos Santos

Dra. Clara Luna Freitas Marina (membro suplente)
Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho a todas as pessoas que, com esforço e paixão, fazem ciência no
Brasil, mesmo diante dos desafios.*

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças ao apoio, incentivo e parceria de muitas pessoas ao longo dessa jornada.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado, que viabilizou a dedicação integral a esta pesquisa e ao meu crescimento acadêmico.

À minha mãe, Andréa, minha primeira e maior inspiração, que sempre me mostrou o valor da educação e acreditou em mim mesmo nos momentos mais difíceis. Seu exemplo e amor foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador, Professor Ricardo Titze de Almeida, agradeço pela oportunidade, pela confiança e por todo o conhecimento compartilhado. Sua orientação foi essencial não apenas para este trabalho, mas também para minha formação como pesquisador.

Aos meus colegas do Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica (LTTG), meu sincero agradecimento pelo companheirismo e apoio diário. Em especial à Fran e à Simoneide, meu muito obrigado por toda a ajuda, incentivo e parceria — sem vocês, nada disso teria sido possível.

Aos meus amigos de longa data, Amanda, Ana Carolina, Bryam, Kamilla e Tathiana, agradeço o apoio constante, pelas palavras de encorajamento e por estarem sempre ao meu lado, mesmo nos momentos mais desafiadores.

Agradeço ao meu companheiro de jornada, Felinto, por todo apoio, companheirismo e amor. Sua presença tornou esse caminho mais leve e significativo, e sou grato por termos compartilhado tantos momentos importantes durante esse processo.

Aos meus companheiros de cheerleading do Hidrillaz, obrigado por todos os momentos de descontração, amizade e superação. Vocês tornaram o caminho mais leve e inspirador.

Por fim, agradeço às agências de fomento à pesquisa no Brasil, que, apesar das dificuldades, continuam promovendo o desenvolvimento científico e acadêmico em nosso país.

A todas essas pessoas e instituições, minha profunda gratidão.

*Sometimes life is like this dark tunnel.
You can't always see the light at the end of the tunnel,
but if you just keep moving... you will come to a better place.*

Uncle Iroh, Avatar: The Last Airbender

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma enfermidade neurodegenerativa progressiva caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra e pela presença de corpos de Lewy, resultando em comprometimentos motores, cognitivos e emocionais. MicroRNAs (miRNAs) têm sido apontados como importantes moduladores dos processos patológicos da DP, incluindo estresse oxidativo, neuroinflamação e apoptose neuronal. Dentre eles, miR-671 destaca-se por seu papel regulatório em vias neuro inflamatórias e na biologia neuronal. Esta dissertação investigou os efeitos das neurotoxinas MPP⁺ e rotenona sobre a viabilidade celular e a expressão de miR-671 em células SH-SY5Y, utilizando um modelo *in vitro* de neurodegeneração dopaminérgica. Ensaio de viabilidade celular foram realizados com os métodos MTT e CCK-8, avaliando diferentes concentrações das toxinas, tempos de exposição e densidades celulares, para comparar a extensão do dano induzido e validar as condições experimentais ideais para o ensaio CCK-8. A expressão de miR-671 foi quantificada por RT-qPCR em células expostas a MPP⁺, complementada por análises bioinformáticas para identificar possíveis vias celulares reguladas por esse microRNA. Os resultados indicaram redução significativa e dose-dependente da viabilidade celular após exposição a MPP⁺, observada tanto pelo método MTT quanto pelo CCK-8, confirmando a eficácia do modelo neurotóxico. A análise de expressão revelou aumento significativo do miR-671 em células tratadas com 1 mM de MPP⁺ por 24 horas, sugerindo possível envolvimento desse miRNA na resposta ao insulto neurotóxico e potencial papel neuroprotetor. A investigação dos alvos gênicos de miR-671-5p, por meio de abordagem integrativa combinando predição computacional e dados validados experimentalmente, resultou em uma lista de 28 genes. A análise funcional via DAVID evidenciou 18 clusters significativos relacionados a processos como regulação da longevidade celular, sinalização via receptores acoplados à proteína G, desenvolvimento celular, modificação lipídica de membranas, regulação transcricional e modificações pós-traducionais. Esses dados indicam que miR-671-5p pode influenciar múltiplos processos celulares essenciais, incluindo homeostase energética e mecanismos associados à fisiopatologia da DP. Em síntese, o estudo destaca a importância da padronização das metodologias para análise da viabilidade celular em modelos de neurodegeneração e evidencia que a expressão aberrante do miR-671 está associada à injúria dopaminérgica. Por atuar em diversas vias celulares, miR-671 pode representar um biomarcador e alvo terapêutico promissor na Doença de Parkinson. Esses achados reforçam a relevância dos miRNAs no entendimento e tratamento dessa enfermidade, abrindo caminho para futuras investigações.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. miR-671. Neurodegeneração. Células SH-SY5Y. MicroRNA.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra and the presence of Lewy bodies, resulting in motor, cognitive, and emotional impairments. MicroRNAs (miRNAs) have been identified as important modulators of the pathological processes in PD, including oxidative stress, neuroinflammation, and neuronal apoptosis. Among them, miR-671 stands out for its regulatory role in neuroinflammatory pathways and neuronal biology. This dissertation investigated the effects of the neurotoxins MPP⁺ and rotenone on cell viability and miR-671 expression in SH-SY5Y cells, using an *in vitro* model of dopaminergic neurodegeneration. Cell viability assays were performed using the MTT and CCK-8 methods, evaluating different toxin concentrations, exposure times, and cell densities to compare the extent of induced damage and to validate the ideal experimental conditions for the CCK-8 assay. MiR-671 expression was quantified by RT-qPCR in cells exposed to MPP⁺, complemented by bioinformatics analyses to identify potential cellular pathways regulated by this microRNA. The results showed a significant dose-dependent reduction in cell viability after MPP⁺ exposure, observed in both the MTT and CCK-8 assays, confirming the effectiveness of the neurotoxic model. Expression analysis revealed a significant increase of miR-671 in cells treated with 1 mM MPP⁺ for 24 hours, suggesting the possible involvement of this miRNA in the response to neurotoxic insult and a potential neuroprotective role. The investigation of miR-671-5p gene targets, using an integrative approach combining computational prediction and experimentally validated data, resulted in a list of 28 genes. Functional analysis via DAVID identified 18 significant clusters related to processes such as cellular longevity regulation, G protein-coupled receptor signaling, cell development, membrane lipid modification, transcriptional regulation, and post-translational modifications. These data indicate that miR-671-5p may influence multiple essential cellular processes, including energy homeostasis and mechanisms associated with PD pathophysiology. In summary, this study highlights the importance of standardizing methodologies for cell viability analysis in neurodegeneration models and shows that aberrant miR-671 expression is associated with dopaminergic injury. By acting on diverse cellular pathways, miR-671 may represent a promising biomarker and therapeutic target in Parkinson's disease. These findings reinforce the relevance of miRNAs in understanding and treating this disorder, paving the way for future research.

Keywords: Parkinson's disease. miR-671. Neurodegeneration. SH-SY5Y cells. microRNA.

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo progresivo caracterizado por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra y la presencia de cuerpos de Lewy, lo que resulta en compromisos motores, cognitivos y emocionales. Los microARN (miARN) han sido identificados como importantes moduladores de los procesos patológicos en la EP, incluyendo el estrés oxidativo, la neuroinflamación y la apoptosis neuronal. Entre ellos, el miR-671 destaca por su papel regulador en las vías neuroinflamatorias y en la biología neuronal. Esta disertación investigó los efectos de las neurotoxinas MPP⁺ y rotenona sobre la viabilidad celular y la expresión de miR-671 en células SH-SY5Y, utilizando un modelo *in vitro* de neurodegeneración dopaminérgica. Se realizaron ensayos de viabilidad celular con los métodos MTT y CCK-8, evaluando diferentes concentraciones de las toxinas, tiempos de exposición y densidades celulares para comparar la extensión del daño inducido y validar las condiciones experimentales ideales para el ensayo CCK-8. La expresión de miR-671 se cuantificó mediante RT-qPCR en células expuestas a MPP⁺, complementada con análisis bioinformáticos para identificar posibles vías celulares reguladas por este microARN. Los resultados mostraron una reducción significativa y dependiente de la dosis en la viabilidad celular tras la exposición a MPP⁺, observada tanto en el método MTT como en el CCK-8, confirmando la eficacia del modelo neurotóxico. El análisis de expresión reveló un aumento significativo de miR-671 en células tratadas con 1 mM de MPP⁺ durante 24 horas, sugiriendo la posible implicación de este miARN en la respuesta al insulto neurotóxico y un potencial papel neuroprotector. La investigación de los genes diana de miR-671-5p, mediante un enfoque integrador que combinó predicción computacional y datos validados experimentalmente, resultó en una lista de 28 genes. El análisis funcional vía DAVID identificó 18 clústeres significativos relacionados con procesos como la regulación de la longevidad celular, la señalización mediada por receptores acoplados a proteínas G, el desarrollo celular, la modificación lipídica de membranas, la regulación transcripcional y las modificaciones postraduccionales. Estos datos indican que miR-671-5p puede influir en múltiples procesos celulares esenciales, incluida la homeostasis energética y mecanismos asociados a la fisiopatología de la EP. En síntesis, este estudio destaca la importancia de la estandarización de metodologías para el análisis de la viabilidad celular en modelos de neurodegeneración y evidencia que la expresión aberrante de miR-671 está asociada con la lesión dopaminérgica. Al actuar en diversas vías celulares, miR-671 puede representar un biomarcador y un objetivo terapéutico prometedor en la enfermedad de Parkinson. Estos hallazgos refuerzan la relevancia de los miARN en la comprensión y tratamiento de este trastorno, abriendo camino para futuras investigaciones.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson. miR-671. Neurodegeneración. Células SH-SY5Y. microARN.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografias da linhagem celular SH-SY5Y, cultivada em baixa e alta densidade.....	23
Figura 2. Estrutura química da molécula 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT).....	25
Figura 3. Gráficos Quantil-Quantil (Q-Q plot) utilizados para a avaliação visual da normalidade dos dados de viabilidade celular obtidos pelo ensaio MTT em células SH-SY5Y tratadas com rotenona (0,1 mM) por 24 horas.....	32
Figura 4. Gráficos de barras representando a viabilidade celular das células SH-SY5Y cultivadas em duas densidades distintas e expostas à rotenona (0,1 mM) por 24 horas.....	32
Figura 5. Gráficos Quantil-Quantil (Q-Q plot) utilizados para a avaliação da normalidade dos dados de viabilidade celular, obtidos pelo ensaio MTT, em células SH-SY5Y tratadas com rotenona (0,1 mM) por 24 horas.....	34
Figura 6. Gráficos de barras representando os resultados do teste t não pareado aplicado para comparação da viabilidade celular, avaliada pelo ensaio MTT, entre os grupos Controle e Rotenona (0,1 mM) após 24 horas, em uma repetição experimental.....	34
Figura 7. Gráficos Quantil-Quantil (Q-Q plot) utilizados para a avaliação da normalidade dos dados de viabilidade celular obtidos pelo ensaio MTT após 48 horas de exposição à rotenona (0,1 mM).....	36
Figura 8. Gráficos de barras representando a viabilidade celular, avaliada pelo ensaio MTT, após 48 horas de exposição à rotenona (0,1 mM) em culturas de diferentes densidades celulares.....	36
Figura 9. Gráficos Quantil-Quantil (Q-Q plot) utilizados para avaliação da normalidade dos dados obtidos nos ensaios de viabilidade celular pelo método MTT.....	38
Figura 10. Gráficos de barras mostrando a avaliação da viabilidade celular das células SH-SY5Y expostas à rotenona (0,1 mM) por 72 horas, em duas diferentes densidades celulares.....	38

Figura 11. Gráficos de barras representando a análise da viabilidade celular das células SH-SY5Y, após 24 horas de exposição a diferentes tratamentos, avaliadas pelo ensaio MTT em densidade celular de $5,0 \times 10^4$ células/poço.....	41
Figura 12. Gráfico Quantil-Quantil (Q-Q plot) ilustrando a distribuição dos dados de absorbância obtidos pelo ensaio CCK-8 em células MDA-MB-231.....	42
Figura 13. Gráfico de linhas representando a evolução temporal da resposta ao ensaio CCK-8 em células MDA-MB-231.....	43
Figura 14. Gráfico Quantil-Quantil (Q-Q plot) para avaliação da distribuição dos dados obtidos no ensaio CCK-8 em células MDA-MB-436.....	44
Figura 15. Gráfico de linhas ilustrando a evolução temporal da resposta ao ensaio CCK-8 em células MDA-MB-436.....	45
Figura 16. Gráficos Quantil-Quantil (Q-Q plot) utilizados para a avaliação da normalidade dos dados obtidos no ensaio CCK-8 em diferentes tempos de leitura.....	46
Figura 17. Gráficos de barras representando a viabilidade celular após exposição aos tratamentos.....	48
Figura 18. Gráfico de barras representando a viabilidade celular média $\pm$ EPM após exposição aos tratamentos nos tempos de (a) 4 horas e (b) 5 horas.....	49
Figura 19. Gráficos Quantil-Quantil (Q-Q plot) para avaliação da normalidade dos dados obtidos no ensaio CCK-8 nos diferentes tempos de leitura.....	51
Figura 20. Gráficos de barras representando a viabilidade celular das células SH-SY5Y após exposição a diferentes concentrações de MPP ⁺ (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mM) e peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂), avaliadas pelo ensaio CCK-8 nos tempos de (a) 3 horas, (b) 4 horas e (c) 5 horas.....	53
Figura 21. Gráficos Quantil-Quantil (Q-Q plot) para avaliação da normalidade dos dados obtidos no ensaio CCK-8 nos diferentes tempos de leitura: (a) 3 h, (b) 4 h e (c) 5 h.....	54
Figura 22. Gráficos de barras representando a viabilidade celular das células SH-SY5Y após exposição a diferentes concentrações de MPP ⁺ (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mM) e peróxido	

de hidrogênio (H_2O_2), avaliadas pelo ensaio CCK-8 nos tempos de (a) 3 horas, (b) 4 horas e (c) 5 horas.....56

Figura 23. Gráfico Quantil-Quantil (Q-Q plot) dos resíduos utilizados para a avaliação da normalidade dos dados de expressão relativa de miR-671 ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) nos grupos Controle e MPP⁺.....57

Figura 24. Gráfico de barras representando a expressão relativa de miR-671 em células SH-SY5Y tratadas com 1 mM de MPP⁺ e no grupo Controle.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados nos ensaios de expressão de miRNAs	28
Tabela 2 - Critérios Rigorosos de Seleção de Genes Alvo.....	29
Tabela 3 - Valores de expressão relativa de miR-671 obtidos por RT-qPCR utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ em células SH-SY5Y tratadas com MPP ⁺ e no grupo Controle.....	57
Tabela 4 - Lista Completa de 28 Genes Qualificados com Critérios de Seleção.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - análise de variância

BCRJ - Banco de Células do Rio de Janeiro

CCK-8 - Cell Counting Kit-8

CDR1as - Cerebellar degeneration-related protein 1 antisense RNA

CircRNAs - RNAs circulares

Cq - cycle quantification

DAT - Transportador de Dopamina

DAVID - Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery

DMEM - Dulbeccos's Modified Medium

DP - Doença de Parkinson

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ELAVL1 - ELAV-like RNA binding protein 1

EPM – Erro Padrão da Média

ER - Receptor de Estrogênio

EUA - Estados Unidos da América

FBS - Soro Fetal Bovino

GLP-1 - peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1

GSK3 β - Glicogênio Sintase Quinase 3 beta

HER2 - Receptor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano

L-DOPA - Levodopa

lncRNA LINC00943 - Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 943

miR-671 - microRNA-671

miR-671-5p - microRNA-671-5p

miRNAs - microRNAs

MPP⁺ - 1-methyl-4-phenylpyridinium

MPTP - 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

PARP - Poli (ADP-ribose) polimerase

PR - Receptor de Progesterona

RIP - RNA immunoprecipitation

RNA - ácido ribonucleico

RNAi - interferência de RNA

RNA_m - RNA mensageiro

RT-qPCR - Transcrição reversa seguida de PCR em tempo real

TNBC - câncer de mama triplo negativo

WST-8 - Tetrazólio Solúvel em Água - 8

APRESENTAÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é uma enfermidade neurodegenerativa progressiva, caracterizada principalmente pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra e pelo acúmulo anormal de proteínas, como a α -sinucleína. Apesar dos avanços na compreensão dos aspectos clínicos e patológicos da doença, os mecanismos moleculares que desencadeiam a neurodegeneração ainda não estão completamente elucidados. Nesse contexto, os microRNAs (miRNAs) têm emergido como reguladores críticos da expressão gênica pós-transcricional, desempenhando papéis relevantes em processos fisiológicos e patológicos, incluindo aqueles associados a doenças neurodegenerativas.

Entre os miRNAs recentemente implicados na fisiopatologia da DP, destaca-se o miR-671, cuja função permanece pouco explorada, especialmente no contexto da neurotoxicidade induzida por compostos clássicos como MPP⁺ e rotenona. Ambos os agentes são amplamente utilizados em modelos celulares por reproduzirem de forma confiável a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo característicos da DP.

A linhagem SH-SY5Y foi escolhida por representar um modelo dopaminérgico humano amplamente utilizado em estudos de neurotoxicidade, apresentando sensibilidade a agentes como MPP⁺ e rotenona. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar os efeitos dessas neurotoxinas sobre a viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y e avaliar a expressão do miR-671 como possível modulador da resposta celular à lesão neurotóxica. A escolha do modelo celular e das metodologias aplicadas - incluindo ensaios de viabilidade CCK-8 e MTT, além da quantificação de expressão por Transcrição reversa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR) - visa oferecer uma abordagem integrada para compreender os efeitos tóxicos induzidos por MPP⁺ e rotenona, assim como o potencial envolvimento do miR-671 nos mecanismos moleculares da neurodegeneração.

A presente dissertação está estruturada de forma a apresentar inicialmente uma introdução sintética sobre a Doença de Parkinson e o papel dos microRNAs, para contextualizar os objetivos do estudo. Após, referem-se os materiais e métodos utilizados, os resultados obtidos e a discussão dos achados à luz da literatura atual. Espera-se que este trabalho contribua para o refinamento de metodologias experimentais sobre viabilidade celular e modelos de injúria, que finalmente apoiem o avanço do

conhecimento sobre os processos celulares associados à DP e para a identificação de novos alvos moleculares envolvidos na patogênese da doença.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVO.....	21
2.1 Objetivos Específicos.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Cultivos celulares.....	22
3.2 Neurotoxinas.....	23
3.2.1 MPP ⁺	23
3.2.2 Rotenona.....	24
3.3 Testes de viabilidade celular.....	24
3.3.1 MTT.....	25
3.3.2 Cell Counting Kit-8 (CCK-8)	26
3.4 Expressão de miR-671 por qPCR em tempo real.....	26
3.5 Determinação da expressão relativa de miR-671 em células expostas a MPP⁺.....	28
3.6 Análise Funcional <i>In Silico</i> dos Genes Alvo de miR-671-5p.....	28
3.7 Análise Estatística.....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1 MTT.....	31
4.2 CCK-8.....	41
4.3 RT-qPCR.....	56
4.4 Análise Funcional <i>In Silico</i> dos Genes Alvo de miR-671-5p.....	58
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÃO.....	64
7. REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICE.....	71

1. INTRODUÇÃO

Parkinson é uma enfermidade neurodegenerativa progressiva, caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra do mesencéfalo, pela presença de corpos de Lewy, estruturas intracelulares compostas principalmente por α -sinucleína causando distúrbios motores que podem ser acompanhados de sintomas emocionais e cognitivos (POEWE et al., 2017; POSTUMA et al., 2015). A etiologia da DP é multifatorial e envolve tanto fatores genéticos quanto ambientais, além de processos celulares como estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, neuroinflamação e alterações epigenéticas. O tratamento baseia-se na reposição de dopamina com Levodopa (L-DOPA) (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003), o que pode causar movimentos involuntários na maioria dos pacientes, as chamadas discinesias (JENNER, 2008). Assim, o conhecimento dos mecanismos subjacentes da doença, incluindo microRNAs, pode revelar novos alvos terapêuticos para tratamentos neuroprotetores.

Retornando aos microRNAs ou miRNAs, estes são RNAs pequenos e em dupla fita, que controlam a expressão de determinados RNAs mensageiros (RNAm) – fenômeno conhecido como interferência de RNA ou RNAi (FIRE et al., 1998; TITZE-DE-ALMEIDA; DAVID; TITZE-DE-ALMEIDA, 2017), e cujo resultado é o silenciamento gênico (MEISTER; TUSCHL, 2004).

A Doença de Parkinson está associada a alterações na expressão de múltiplos microRNAs, os quais podem influenciar processos celulares críticos e contribuir para a vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos, justificando a investigação do miR-671 nos mecanismos da doença. Um miRNA em particular, o microRNA-671 (miR-671), tem sido implicado em diversos processos fisiopatológicos, incluindo câncer, doenças inflamatórias, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas, como a DP. Codificado na região 7q36.1 do genoma humano, o miR-671 dá origem às isoformas miR-671-3p e miR-671-5p, cujas funções ainda não são completamente compreendidas, mas que parecem ter papéis distintos dependendo do tecido e da condição patológica estudada (GHAFOURI-FARD, S. et al., 2022)

Na doença de Parkinson, estudos recentes indicam que o microRNA-671-5p (miR-671-5p) faz parte de uma rede regulatória de vias moleculares envolvidas na neuroinflamação e na morte neuronal. Foi demonstrado que o RNA longo não codificante

(lncRNA) LINC00943 pode atuar como esponja molecular do miR-671-5p, levando ao aumento da expressão de ELAV-like RNA binding protein 1 (ELAVL1), proteína associada à estabilidade de RNAs inflamatórios e apoptóticos. Em modelos celulares da DP, a superexpressão de LINC00943 associou-se ao aumento da toxicidade neuronal e apoptose, efeitos que puderam ser parcialmente revertidos com a restauração dos níveis de miR-671-5p (ZHANG; LUAN; SHI, 2022). Outro estudo demonstrou que o tratamento com Exendin-4, um agonista do GLP-1 (peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1), leva à redução dos níveis do ácido ribonucleico circular (circRNA) Cerebellar degeneration-related protein 1 antisense RNA (CDR1as), promovendo o aumento da expressão do miR-671, o qual por sua vez reduz a fosforilação da glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3 β), uma quinase envolvida na patogênese da DP (QUAN et al., 2021). Esses achados reforçam a ideia de que o miR-671 possui um papel neuroprotetor por meio da regulação negativa de alvos pró-apoptóticos e pró-inflamatórios no sistema nervoso central.

Além disso, dados de expressão em amostras humanas também sugerem a desregulação do miR-671 em pacientes com DP. Uwatoko et al. (2019) observaram uma redução nos níveis circulantes de miR-671-5p em pacientes diagnosticados com a doença, reforçando seu potencial como biomarcador diagnóstico ou prognóstico. Embora os mecanismos moleculares precisos ainda estejam sendo elucidados, a modulação do miR-671 desponta como uma via promissora para novas abordagens terapêuticas e para o aprimoramento do diagnóstico da DP.

Quanto ao modelo de parkinsonismo do presente estudo, optou-se por duas neurotoxinas a 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) e a rotenona. A primeira, resulta da conversão de 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), molécula precursora, realizada após a passagem pela barreira hematoencefálica, o MPP⁺ tem sido usada para produzir modelos celulares experimentais de Parkinson, pois consegue ser transportada seletivamente para neurônios dopaminérgicos. Inibe o transporte de elétrons mitocondriais, enfraquece o potencial da membrana mitocondrial e perturba a homeostase do Ca²⁺, levando a perda neuronal (BLESÁ; PRZEDBORSKI, 2014).

Já a rotenona, trata-se de um pesticida ambiental, que atua inibindo o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (BLESÁ; PRZEDBORSKI, 2014; UVERSKY, 2004). A exposição sistêmica ou intranigral à rotenona em ratos reproduz várias alterações do Parkinson, como perda nigroestriatal seletiva de dopamina, hipocinesia, rigidez e déficit

cognitivo (BETARBET et al., 2000; BASSANI et al., 2014). Além disto, há estudos propondo que rotenona gera acúmulo intracelular de sinucleína e ubiquitina semelhantes aos corpos de Lewy, tema ainda sem consenso na literatura (BOVE et al., 2005).

A linhagem celular SH-SY5Y foi escolhida para os experimentos com MPP⁺ e rotenona por se tratar de um modelo amplamente utilizado no estudo da neurodegeneração dopaminérgica, apresentando características morfológicas e bioquímicas semelhantes às de neurônios dopaminérgicos humanos. Essas células possuem capacidade de diferenciação neuronal e são sensíveis a neurotoxinas como a rotenona e o MPP⁺, permitindo a investigação de mecanismos celulares e moleculares associados à Doença de Parkinson. Além disso, estudos prévios realizados já demonstraram a aplicabilidade desse modelo na análise dos efeitos da rotenona, evidenciando o envolvimento dos canais de potássio Eag1 e do microRNA miR-34a na morte celular induzida por essa toxina, o que reforça a relevância e a continuidade da utilização das células SH-SY5Y no presente trabalho (HORST; TITZE-DE-ALMEIDA; TITZE-DE-ALMEIDA, 2017).

2. OBJETIVO

Examinar metodologias para a determinação da viabilidade celular na linhagem SH-SY5Y exposta às neurotoxinas MPP⁺ e rotenona, avaliando, nessa condição de injúria, a expressão do microRNA-671 (miR-671) e seus potenciais alvos.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o desempenho das metodologias CCK-8 e MTT na determinação da viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y após exposição a diferentes concentrações de MPP⁺ e rotenona.
- Comparar o grau de injúria induzida por MPP⁺ e rotenona, em diferentes tempos de exposição e densidades celulares.
- Determinar as condições experimentais adequadas para aplicação do ensaio CCK-8 como ferramenta de avaliação da viabilidade celular no modelo proposto.
- Quantificar a expressão do miR-671 em células SH-SY5Y tratadas com MPP⁺, utilizando a técnica de RT-qPCR.

- Realizar análise de bioinformática para busca de vias celulares reguladas por miR-671.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivos celulares

Como modelo de neurônio dopaminérgico, foram utilizadas células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC® HTB-22™) (Figura 1) adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Medium + F12 (DMEM/F12 Gibco™, Cat. N° 12400-024) previamente filtrado, suplementado com 10% de soro fetal bovino filtrado (FBS Gibco™, Cat. N° 12657-029), 1% de glutamax (Gibco™, Cat. N° 35050-061) e 1% de solução antibiótica/antimicótica (Sigma-Aldrich®, Cat. N° A 5955). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂, acondicionadas em frascos de cultivo de 5 ou 10 mL e submetidas a passagens com solução de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich®, Cat. N° T4049) sempre que atingiam confluência entre 70 e 80%. (HORST; TITZE-DE-ALMEIDA; TITZE-DE-ALMEIDA, 2017).

No presente estudo, as linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-436 foram utilizadas para padronizar o ensaio de viabilidade celular utilizando o reagente CCK-8, por sua robustez e facilidade de cultivo, antes da aplicação na linhagem neuronal SH-SY5Y.

Estas linhagens celulares são modelos amplamente utilizados na pesquisa sobre câncer de mama triplo-negativo (TNBC), caracterizado pela ausência dos receptores hormonais de estrogênio (ER), de progesterona (PR) e o receptor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER2). A linhagem MDA-MB-231, derivada de um adenocarcinoma mamário metastático, apresenta características mesenquimatosas, alta taxa de proliferação e mutações em genes como p53 e KRAS, sendo frequentemente empregada para estudar invasão tumoral e resistência a tratamentos (DA SILVA; MORAIS, 2021; HOLLIDAY; SPEIRS, 2011). Já a linhagem MDA-MB-436, originada de uma efusão pleural de paciente com adenocarcinoma mamário, possui mutação no gene BRCA1, o que a torna modelo relevante para investigações sobre reparo do DNA e terapias com inibidores de Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) (NIK-ZAINAL et al., 2016; WILLIS; ADAMS, 2018).

Quanto ao cultivo celular, ambas as linhagens foram cultivadas em meio DMEM ou RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e antibióticos, mantidas em condições padrão de incubação a 37°C com 5% de CO₂. Essas células apresentam crescimento rápido e aderente, facilitando a manipulação e reprodução dos experimentos (ATCC, 2022).

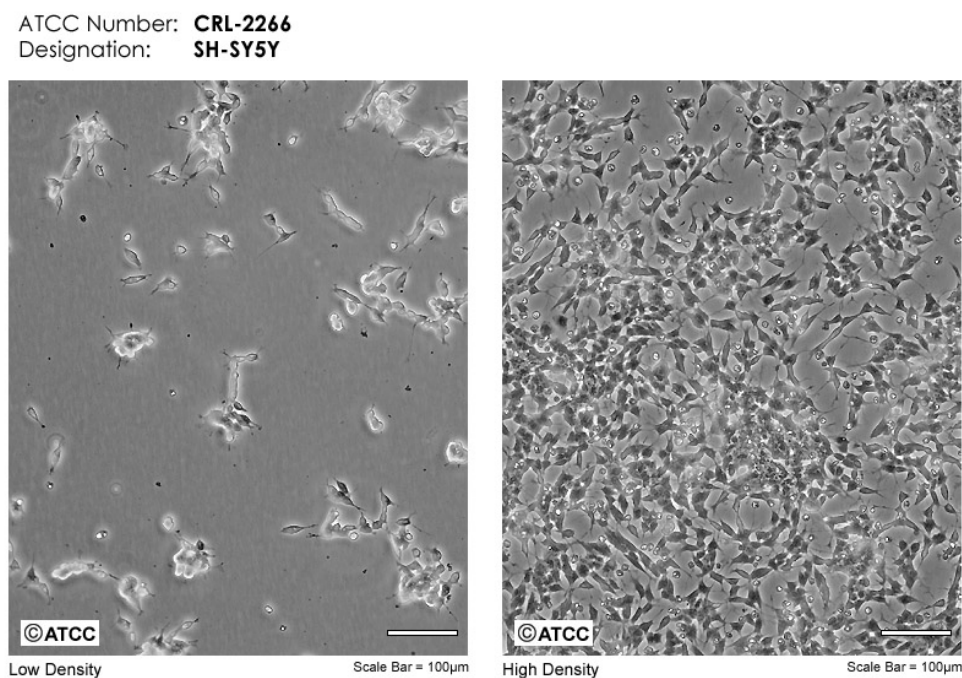


Figura 1. Micrografias da linhagem celular SH-SY5Y, cultivada em baixa e alta densidade. Essa linhagem é derivada de neuroblastoma humano e amplamente utilizada como modelo *in vitro* em estudos de neurociência e toxicologia, devido à sua capacidade de diferenciação em fenótipos neuronais (ATCC, 2022).

3.2 Neurotoxinas

3.2.1 MPP⁺

O iodeto de 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺) (Sigma-Aldrich®; Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), um metabólito ativo da MPTP, foi utilizado para a indução de estresse celular em modelos *in vitro* de neurônio dopaminérgico. Para isso, foi preparada uma solução estoque de MPP⁺ a 50 mM, a partir da qual foram feitas diluições seriadas em água ultrapura Milli-Q para obtenção das concentrações finais de 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM e 2,0 mM. O

MPP⁺ atua inibindo complexos da cadeia respiratória mitocondrial, especialmente o complexo I, promovendo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e levando à morte celular, sendo amplamente utilizado em modelos celulares dopaminérgicos, como SH-SY5Y (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; BOVE et al., 2005; HORST; TITZE-DE-ALMEIDA; TITZE-DE-ALMEIDA, 2017).

3.2.2 Rotenona

A rotenona é uma toxina lipofílica de origem vegetal. Foi empregada neste estudo para indução de injúria celular em modelo *in vitro* de neurônio dopaminérgico. Essa substância atua como inibidor do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, promovendo disfunção mitocondrial, aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação de vias apoptóticas. Assim, foi preparada uma solução estoque de rotenona a 50 mM, a qual foi posteriormente diluída em meio de cultura para obtenção da concentração final de 0,1 mM utilizada nos ensaios. A utilização da rotenona é consolidada na literatura como uma estratégia eficaz para mimetizar aspectos neurodegenerativos da Doença de Parkinson em modelos celulares e animais, incluindo a perda de neurônios dopaminérgicos e o estresse oxidativo associado (BETARBET et al., 2000; UVERSKY, 2004; BASSANI et al., 2014).

3.3 Testes de viabilidade celular

Foram realizados ensaios que visam avaliar a viabilidade celular após injúria induzida pela neurotoxina MPP⁺ e/ou rotenona, utilizando-se o kit Cell Counting Kit-8 (CCK-8) e o método MTT, conforme descrito a seguir. Ambos os ensaios se baseiam na formação de um corante formazânico, cuja quantidade é proporcional ao número de células viáveis presentes (MOSMANN, 1983; VAN TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015; ZHAO; TAN; CHAN, 2019).

3.3.1 MTT

O método de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Figura 2) é um sal de tetrazólio, utilizado em ensaios de viabilidade e proliferação celular. Sua estrutura química é composta pelo núcleo tetrazólio, ligado a dois grupos fenila e um grupo tiazol (VAN TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015). Por conta de sua estrutura, tem característica lipofílica, pouco solúvel em água, porém é capaz de adentrar a membrana das células onde é metabolizado em formazan. Essa metabolização gera uma alteração de cor onde o sal inicialmente de coloração amarela passa a ser púrpura (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005).

Para a realização do ensaio, foram utilizadas placas de 96 poços contendo células SH-SY5Y, nas concentrações de $2,5 \times 10^4$ e $5,0 \times 10^4$ células por poço, em meio de cultura DMEM/F12. Após 24 horas de incubação em estufa, foi adicionada rotenona na concentração de 0,1mM ou MPP⁺ na concentração de 2mM. Nos poços dos grupos Controle, foi realizada apenas a troca do meio de cultura. Após 24 horas, foram trocados os meios de cultura e adicionados 10uL de solução de MTT (5mg/mL) e incubados novamente em estufa. A leitura de absorbância foi realizada 3 horas após a incubação, utilizando-se comprimento de onda de 570 nm, em leitor de microplacas (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader) (Thermo Fisher Scientific).

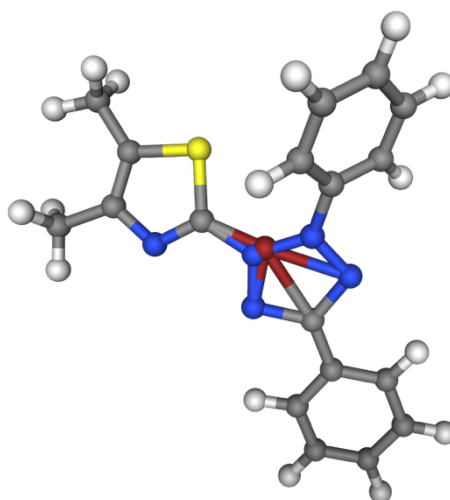


Figura 2. Estrutura química da molécula 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT).

3.3.2 Cell Counting Kit-8 (CCK-8)

O Cell Counting Kit-8 (CCK-8) é um kit comercial, fornecido em solução pronta para uso, baseado na utilização do sal de tetrazólio solúvel em água WST-8 (2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)-2H-tetrazólio, sal monossódico). Na presença de um mediador de elétrons (geralmente o 1-metoxifenazina metossulfato – PMS), o composto WST-8 é reduzido pelas desidrogenases mitocondriais de células viáveis, formando um produto formazânico amarelo solúvel no meio de cultura. A intensidade da coloração é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas (ISHIYAMA et al., 1996; DOJINDO, 2023).

Comparado a outros sais de tetrazólio, como MTT, XTT, MTS ou ST-1, o WST-8 apresenta maior sensibilidade e estabilidade, além da vantagem de não requerer etapas de solubilização do produto formado, o que simplifica o protocolo e minimiza erros (TANAKA et al., 2020).

Para a realização dos ensaios de viabilidade, foram utilizadas placas de 96 poços contendo células SH-SY5Y na concentração de $4,0 \times 10^4$ células/poço, cultivadas em meio DMEM/F12. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações da neurotoxina MPP⁺ (0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM e 2,0 mM). Para o grupo Controle, foi realizada apenas a troca do meio de cultura. Decorridas 24 horas de exposição, foram adicionados 10 µL da solução CCK-8 diretamente em cada poço. As leituras de absorbância foram realizadas entre 1 e 5 horas após a incubação, em comprimento de onda de 450 nm, utilizando o equipamento Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific).

3.4 Expressão de miR-671 por qPCR em tempo real

Inicialmente, foi feito o isolamento de microRNAs (miRNAs) utilizando-se o kit comercial mirVana™ miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA) (AMBION, 2004; RICCI et al., 2014). Para isso, células da linhagem SH-SY5Y, foram previamente cultivadas até atingirem confluência ideal e depois expostas às neurotoxinas. Após, foram armazenadas a -80 °C, a fim de preservar a integridade do RNA.

A lise celular foi conduzida com o tampão Lysis/Binding Buffer, seguido da inativação de RNases e homogeneização completa das amostras, conforme as instruções do fabricante. A extração de RNA total, incluindo miRNAs, baseou-se no método de ácido-fenol:clorofórmio, com posterior centrifugação para recuperação da fase aquosa contendo o RNA. A etapa final de eluição foi realizada com a solução Elution Solution pré-aquecida a 95 °C, e as amostras obtidas foram armazenadas a -20 °C até sua utilização (PAN et al., 2010).

A avaliação da pureza do RNA foi realizada por espectrofotometria UV no equipamento NanoDrop™ (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher Scientific, EUA) (DESJARDINS; CONKLIN, 2010). Já a quantificação específica de miRNAs foi conduzida por meio do Qubit™ miRNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA), baseado em fluorescência, garantindo maior especificidade e sensibilidade para pequenas moléculas de RNA (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2022).

Após a quantificação do RNA purificado das células SH-SH5Y, procedeu-se à síntese de cDNA. Para tanto, utilizou-se o kit TaqMan® MicroRNA RT Kit (Applied Biosystems, EUA), em conjunto com sondas específicas TaqMan® MicroRNA Assays, conforme protocolo do fabricante. O RNA total foi diluído para uma concentração de 2 ng/μL por reação, garantindo padronização entre as amostras.

Para garantir a normalização adequada da expressão dos microRNAs, utilizou-se a técnica de *spike-in*, adicionando-se o microRNA sintético exógeno cel-miR-39 às amostras antes da extração de RNA, permitindo controlar variações técnicas durante a extração, retrotranscrição e amplificação, e assegurando maior confiabilidade na quantificação relativa por RT-qPCR (MESTDAGH et al., 2009).

Para os ensaios de expressão de miRNAs, as reações de RT-qPCR foram realizadas em triplicata utilizando o sistema QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, EUA). A mistura reacional continha 1x TaqMan™ Universal PCR Master Mix e o ensaio TaqMan™ específico (*primers*) para cada miRNA-alvo (Tabela 1). O programa térmico inclui etapas de: ativação inicial a 50 °C por 2 minutos, desnaturação a 95 °C por 20 segundos, seguidas de 40 ciclos de amplificação (95 °C por 3 segundos; 60 °C por 30 segundos), em conformidade com protocolos otimizados para detecção de microRNAs (CHEN et al., 2005).

Tabela 1 - *Primers* utilizados nos ensaios de expressão de miRNAs

Nome do ensaio	ID do ensaio	Sequência do miRNA maduro
hsa-miR-671-5p	197646_mat	AGGAAGCCCUGGAGGGGCUGGAG
cel-miR-39	000200	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG

3.5 Determinação da expressão relativa de miR-671 em células expostas a MPP⁺

A análise dos resultados de expressão gênica foi realizada por meio do método de quantificação relativa $\Delta\Delta Cq$ ($2^{-\Delta\Delta Cq}$), conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001), o que permitiu mensurar as variações nos níveis de miR-671 em resposta à exposição à neurotoxina MPP⁺. Esse método consiste em três etapas principais: inicialmente, calcula-se o valor de ΔCq para cada amostra, que corresponde à diferença entre o Cq (cycle quantification) do gene-alvo (miR-671) e o Cq do gene endógeno de referência (normalizador), utilizado para corrigir variações entre amostras ($\Delta Cq = Cq \text{ gene-alvo} - Cq \text{ controle endógeno}$). Em seguida, determina-se o valor de $\Delta\Delta Cq$, que corresponde à diferença entre o ΔCq do grupo experimental e o ΔCq do grupo Controle ($\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ tratado} - \Delta Cq \text{ controle}$). Por fim, a razão de expressão relativa é obtida aplicando-se a equação $2^{-\Delta\Delta Cq}$, que reflete a quantidade relativa de expressão do gene-alvo nas amostras tratadas em comparação ao grupo Controle, assumindo eficiência de amplificação próxima a 100%.

3.6 Análise Funcional *In Silico* dos Genes Alvo do miR-671-5p

Foi realizada uma análise funcional *in silico* com o objetivo de identificar e caracterizar os genes alvo de miR-671-5p em nível genômico e funcional. Essa abordagem visa ampliar a compreensão dos possíveis mecanismos regulatórios mediados por esse microRNA, oferecendo subsídios que complementam os dados empíricos e possibilitam a construção de hipóteses mais robustas sobre suas implicações biológicas.

A identificação dos alvos do miR-671-5p foi conduzida utilizando uma estratégia combinada de predição computacional e validação experimental, com foco na seleção rigorosa de genes de alta confiabilidade. Inicialmente, foram utilizados dois bancos de dados de predição reconhecidos: o miRDB (CHEN; WANG, 2020), considerando genes com score ≥ 50 , e o TargetScan Human 8.0 (AGARWAL et al., 2015), com inclusão de genes com

context++ score $\leq -0,04$, gerando listas preliminares de 621 e 4.181 genes candidatos, respectivamente (Tabela 2).

Em paralelo, foram extraídos do miRTarBase (HU et al., 2022) os genes alvos validados experimentalmente para o miR-671-5p, totalizando 132 interações descritas na literatura científica. Para compor a lista final, foram adotados critérios de inclusão conservadores, considerando apenas os genes que apresentaram: (i) validação experimental confirmada, ou (ii) consenso entre ao menos duas fontes computacionais independentes. Com base nesses critérios, foram selecionados 28 genes de alta confiança, excluindo-se aqueles com apenas uma evidência computacional e sem suporte experimental (ex: GPD5 e ZNF233).

A análise funcional dos genes selecionados foi realizada por meio da plataforma DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) v6.8 (HUANG; SHERMAN; LEMPICKI, 2009), utilizando o genoma humano como background. O agrupamento de anotações funcionais foi conduzido com estringência de classificação média, e a significância estatística foi ajustada com o método de Benjamini-Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995), adotado para Controle da taxa de falsos positivos em testes múltiplos. Clusters com enrichment scores $> 1,3$ foram considerados estatisticamente relevantes.

Tabela 2 - Critérios Rigorosos de Seleção de Genes Alvo

Critério de Qualificação	Número de Genes	Percentual	Descrição
Validação Experimental	8	28,6%	Genes com evidência experimental independente do suporte computacional
Consenso Computacional	14	50,0%	Genes preditos por ambos MirDB e TargetScan
Tripla Validação	6	21,4%	Genes presentes em ambas as predições computacionais E validação experimental
Total Qualificado	28	100%	Genes atendendo aos critérios rigorosos
Genes Excluídos	2	6,7%	GPD5 e ZNF233 (apenas uma predição computacional)

3.7 Análise Estatística

As análises estatísticas dos ensaios de viabilidade celular (MTT e CCK-8) foram conduzidas seguindo rigorosos critérios metodológicos para garantir a confiabilidade dos resultados. Inicialmente, a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram avaliadas por meio do teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965). Na presença de heterocedasticidade, a ANOVA (análise de variância) de Welch foi utilizada para ajustar os graus de liberdade e manter a robustez dos testes estatísticos (Delacre et al., 2017). Além disso, o teste Brown-Forsythe serviu para confirmar a diferença entre variâncias dos grupos experimentais (Brown & Forsythe, 1974).

Para as comparações múltiplas pós-hoc, optou-se por testes apropriados a cada situação: o Tamhane's T2 e o Dunnett's T3 foram usados em condições de variância desigual, enquanto o teste de Tukey foi aplicado quando a homogeneidade das variâncias foi verificada, assegurando controle rigoroso do erro tipo I (FIELD & WILCOX, 2017; LIX et al., 2019; GARCÍA et al., 2021). Para experimentos com medidas repetidas, a ANOVA de medidas repetidas foi adotada com a correção de Geisser-Greenhouse para ajustar possíveis violações da esfericidade, aumentando a precisão da análise temporal e das interações entre tratamentos (Blanca et al., 2020).

No caso das análises de expressão gênica por RT-qPCR, utilizou-se o método $\Delta\Delta C_t$ para quantificação relativa da expressão dos miRNAs de interesse, considerando um controle endógeno e o grupo Controle para normalização, conforme protocolos validados na literatura (Livak & Schmittgen, 2001; Rao et al., 2013). Esta abordagem permite a comparação quantitativa robusta entre grupos experimentais, sendo amplamente recomendada para estudos de expressão gênica em modelos celulares.

As análises foram realizadas no software GraphPad Prism 9.4.1, que suporta os testes estatísticos citados e facilita a visualização e interpretação dos dados. O emprego dessas metodologias estatísticas, combinadas com as melhores práticas para análise de dados biológicos, assegura a validade, reprodutibilidade e rigor científico dos resultados apresentados (Lakens, 2021; Van Den Noortgate & Onghena, 2020).

4. RESULTADOS

4.1 MTT

Para avaliar os efeitos da rotenona sobre a viabilidade das células SH-SY5Y, foi realizado um ensaio de MTT após 24 horas de exposição ao agente neurotóxico. Foram utilizadas duas densidades celulares distintas: $2,5 \times 10^4$ e $5,0 \times 10^4$ células por poço, mantendo-se constante a concentração de rotenona em $0,1 \text{ mM}$ em ambos os casos.

Para verificar a normalidade dos dados dos grupos Controle e Rotenona, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para as duas condições celulares distintas ($2,5 \times 10^4$ e $5,0 \times 10^4$ células/poço). Esse teste foi escolhido por ser adequado para amostras de pequeno tamanho, permitindo avaliar de forma confiável se os dados seguem uma distribuição normal antes da aplicação de testes estatísticos paramétricos (SHAPIRO; WILK, 1965).

Esses resultados confirmam a adequação dos dados para análise por testes paramétricos em ambas as condições, destacando a robustez do teste de Shapiro-Wilk para amostras pequenas e médias, enquanto os demais testes reforçam a normalidade para amostras maiores (RAZALI; WAH, 2011; SHAPIRO; WILK, 1965; YAP; SIM, 2011). A verificação prévia da normalidade é essencial para garantir a validade das análises estatísticas subsequentes (GHASEMI; ZAHEDIASL, 2012).

Na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/poço, os dados não apresentaram distribuição normal, conforme evidenciado pelo teste de Shapiro-Wilk ($p = 0,0041$) (Tabela A1). Os gráficos Q-Q plot complementam os testes estatísticos de normalidade, oferecendo suporte visual para a escolha dos testes paramétricos ou não paramétricos (Figura 3a). Portanto, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, que demonstrou uma redução estatisticamente significativa na viabilidade celular no grupo tratado com rotenona em comparação ao Controle ($U = 8$; $p < 0,0001$) (Figura 4a). O grupo Controle apresentou mediana de absorbância de 0,4142, enquanto o grupo tratado apresentou mediana de 0,1743, com uma diferença estimada de -0,2101 pelo método de Hodges-Lehmann (Tabela A2).

Já na densidade de $5,0 \times 10^4$ células/poço, os dados apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk $p = 0,6306$, ns) (Tabela A3, Figura 3b), e o teste t não pareado indicou uma redução significativa na viabilidade celular no grupo tratado com rotenona em relação ao

Controle ($t = 6,071$, $df = 22$; $p < 0,0001$) (Figura 4b). O grupo Controle apresentou média da absorbância de $0,8104 \pm \text{EPM}$ (Erro Padrão da Média), enquanto o grupo tratado apresentou $0,5504 \pm \text{EPM}$, indicando efeito citotóxico consistente (Tabela A4).

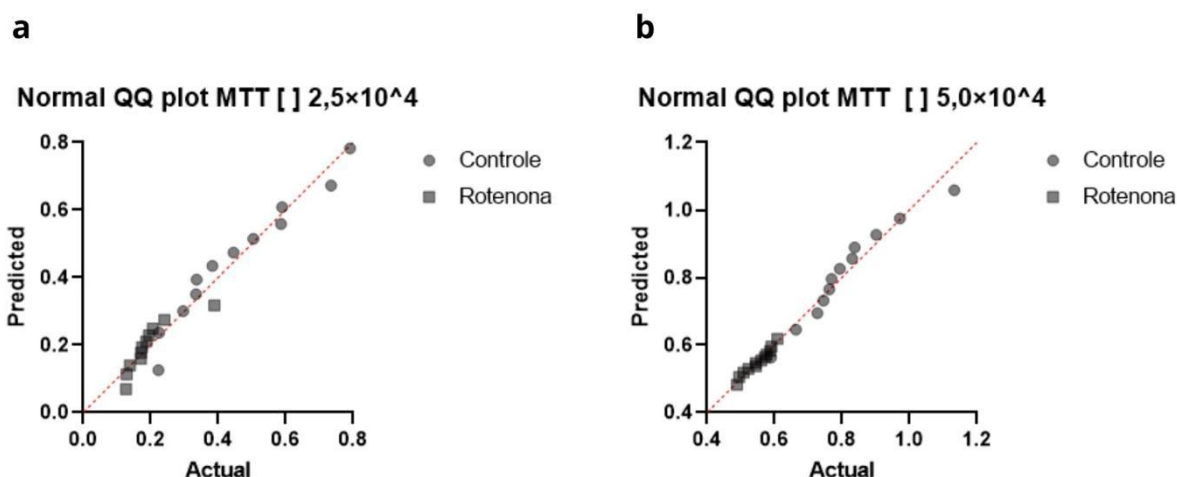


Figura 3. Gráficos Quantil-Quantil (Q-Q plot) utilizados para a avaliação visual da normalidade dos dados de viabilidade celular obtidos pelo ensaio MTT em células SH-SY5Y tratadas com rotenona (0,1 mM) por 24 horas. a) Densidade de $2,5 \times 10^4$ células/poço: o grupo Controle apresenta distribuição próxima da normalidade, enquanto o grupo Rotenona apresenta desvios evidentes, confirmando a não normalidade estatística. b) Densidade de $5,0 \times 10^4$ células/poço: ambos os grupos, Controle e Rotenona, apresentam pontos alinhados próximos à linha de referência, indicando conformidade com a distribuição normal.

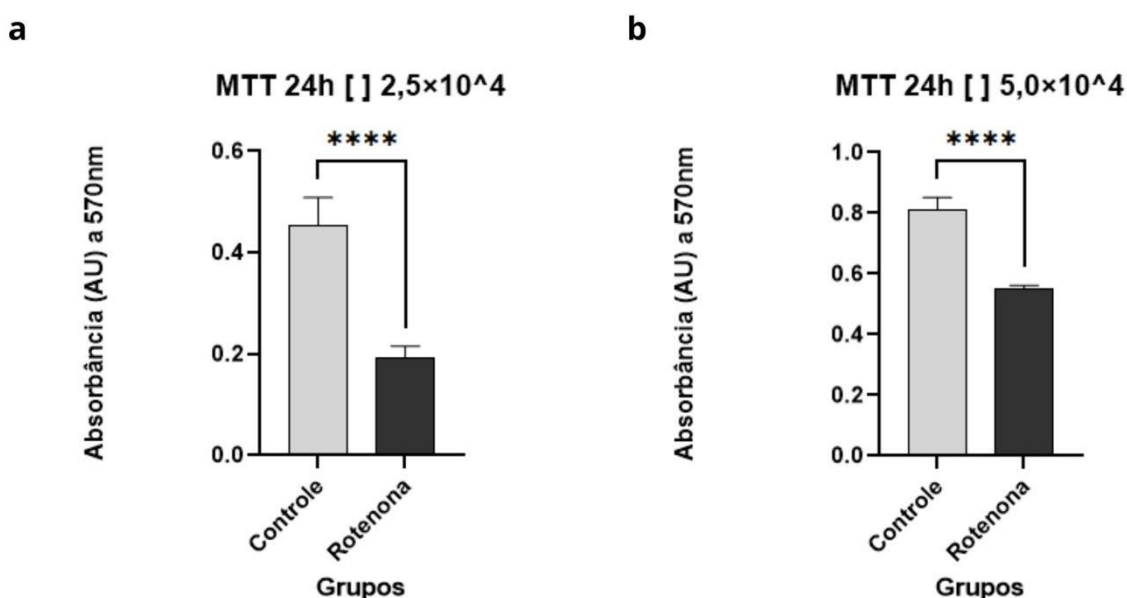


Figura 4. Gráficos de barras representando a viabilidade celular das células SH-SY5Y cultivadas em duas densidades distintas e expostas à rotenona (0,1 mM) por 24 horas. A viabilidade foi avaliada por meio do ensaio de MTT. a) Densidade de $2,5 \times 10^4$ células/poço: os dados não seguiram distribuição normal no grupo Rotenona (testes D'Agostino & Pearson, Anderson-Darling e Shapiro-Wilk, $p < 0,05$), sendo aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, que mostrou redução significativa da viabilidade ($p < 0,0001$, ****). Medianas indicadas. b) Densidade de $5,0 \times 10^4$ células/poço: os dados apresentaram distribuição normal (todos os testes $p > 0,05$) e o teste t não pareado indicou redução significativa da viabilidade celular no grupo tratado com rotenona

em relação ao Controle ($p < 0,0001$, ****). Médias $\pm$ EPM indicadas. Asteriscos indicam níveis de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Na repetição do ensaio de MTT, as células SH-SY5Y foram novamente expostas à rotenona (0,1 mM) por 24 horas, utilizando-se as mesmas densidades celulares: $2,5 \times 10^4$ e $5,0 \times 10^4$ células por poço.

Na repetição do ensaio com densidade de $2,5 \times 10^4$ células/poço e exposição a rotenona (0,1 mM) por 24 horas, os dados apresentaram distribuição normal em ambos os grupos (Controle e Rotenona), conforme confirmado pelo teste de Shapiro-Wilk (Tabela A5, Figura 5a). O teste t não pareado demonstrou que a redução de viabilidade foi estatisticamente significativa no grupo tratado com rotenona em relação ao Controle ($t = 5,478$; $df = 10$; $p = 0,0003$) (Figura 6a). As médias de absorbância foram 0,3308 para o Controle e 0,1840 para o grupo Rotenona, com diferença entre médias de $-0,1468 \pm 0,02679$ (EPM) e intervalo de confiança de 95% entre -0,2064 e -0,08706. O teste F indicou variâncias homogêneas entre os grupos ($p = 0,0552$, ns), validando a aplicação do teste t (Tabela A7).

De forma semelhante, na densidade de $5,0 \times 10^4$ células/poço, os dados apresentaram distribuição normal nos grupos Controle e Rotenona, conforme confirmado pelo teste de Shapiro-Wilk (Tabela A6, Figura 5b). O teste t não pareado demonstrou redução estatisticamente significativa na viabilidade celular do grupo tratado com rotenona em relação ao Controle ($t = 3,433$; $df = 10$; $p = 0,0064$) (Figura 6b). As médias de absorbância foram 0,7722 para o Controle e 0,5784 para o grupo Rotenona, com diferença entre médias de $-0,1937 \pm 0,05642$ (EPM) e intervalo de confiança de 95% entre -0,3194 e -0,06800. O teste F indicou variâncias homogêneas entre os grupos ($p = 0,7099$, ns), permitindo a aplicação do teste t (Tabela A8).

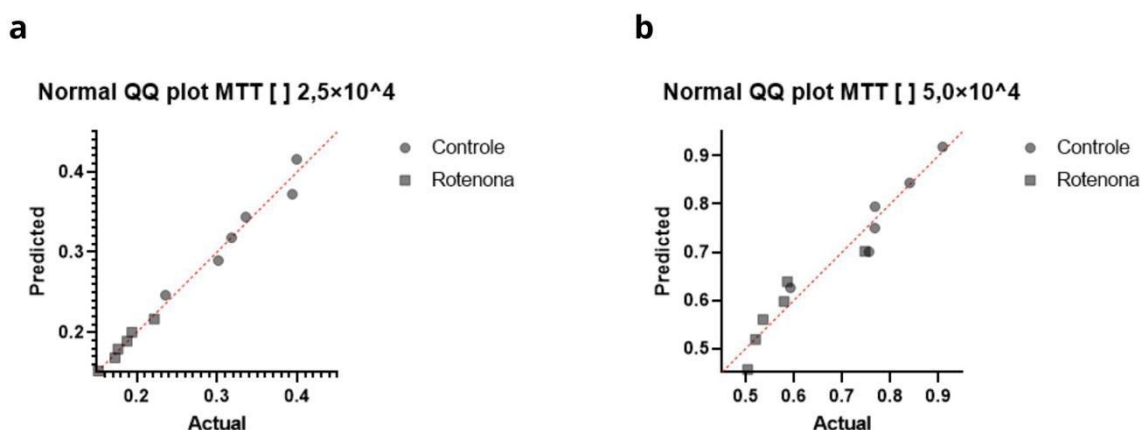


Figura 5. Gráficos Quantil-Quantil (Q-Q plot) utilizados para a avaliação da normalidade dos dados de viabilidade celular, obtidos pelo ensaio MTT, em células SH-SY5Y tratadas com rotenona (0,1 mM) por 24 horas. a) $2,5 \times 10^4$ células/poço; b) $5,0 \times 10^4$ células/poço. Ambos os grupos Controle e Rotenona apresentaram dados compatíveis com distribuição normal, justificando o uso de testes paramétricos.

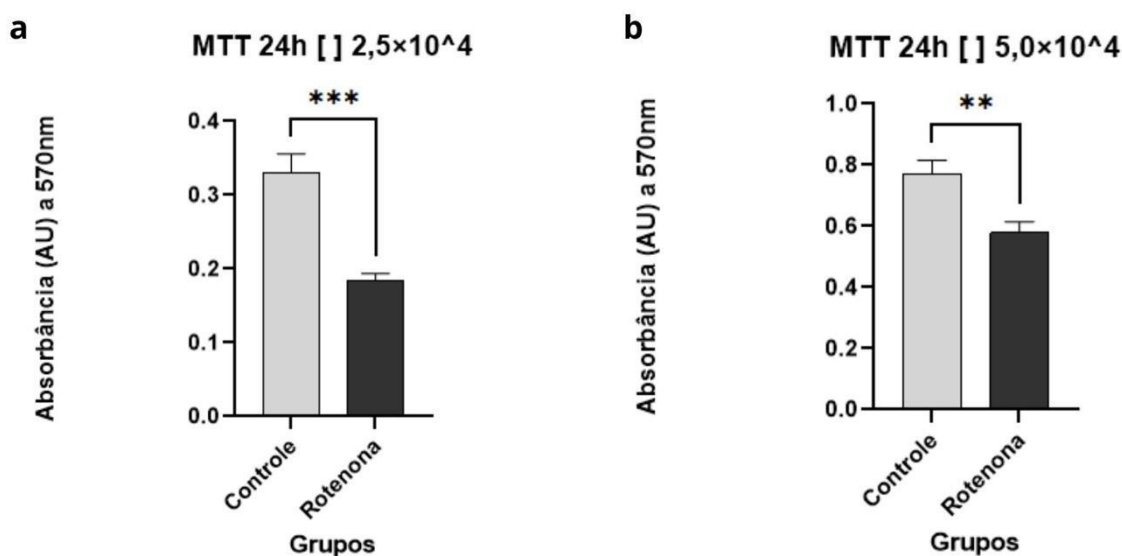


Figura 6. Gráficos de barras representando os resultados do teste t não pareado aplicado para comparação da viabilidade celular, avaliada pelo ensaio MTT, entre os grupos Controle e Rotenona (0,1 mM) após 24 horas, em uma repetição experimental. a) Densidade celular de $2,5 \times 10^4$ células/poço ($p = 0,0003$, ***); b) Densidade celular de $5,0 \times 10^4$ células/poço ($p = 0,0064$, **). Médias $\pm$ EPM indicadas; asteriscos indicam níveis de significância estatística.

Com o objetivo de avaliar o impacto da exposição prolongada à rotenona sobre a viabilidade celular, foi realizado um novo ensaio de MTT com duração de 48 horas, utilizando novamente as densidades de $2,5 \times 10^4$ e $5,0 \times 10^4$ células SH-SY5Y por poço.

Para a concentração de $2,5 \times 10^4$ células expostas por 48 horas, os dados dos grupos Controle e Rotenona ($n = 6$ por grupo) foram inicialmente submetidos à análise de normalidade para definição do teste estatístico apropriado. Os testes de Shapiro-Wilk (Controle: $W = 0,9747$, $p = 0,9222$; Rotenona: $W = 0,9076$, $p = 0,4206$) indicou que os dados apresentavam distribuição normal (Tabela A9, Figura 7a). Dessa forma, foi justificado o uso do teste t de Student para amostras independentes na comparação entre os grupos.

O teste t não pareado indicou redução estatisticamente significativa na viabilidade celular do grupo tratado com rotenona em relação ao Controle ($t = 3,525$; $df = 10$; $p = 0,0055$) (Figura 8a). As médias de absorbância foram 0,4756 para o grupo Controle e 0,3503 para o grupo Rotenona, com diferença entre médias de $-0,1254 \pm 0,03556$ (EPM) e intervalo de confiança de 95% entre -0,2046 e -0,04613. O teste F indicou homogeneidade das variâncias entre os grupos ($p = 0,5127$, ns), viabilizando a aplicação do teste t (Tabela A11).

Na repetição do ensaio de viabilidade celular (MTT) com densidade de $5,0 \times 10^4$ células/poço e exposição à rotenona (0,1 mM) por 48 horas, os dados dos grupos Controle e Rotenona apresentaram distribuição normal, conforme indicaram o teste de Shapiro-Wilk (Controle: $p = 0,8293$; Rotenona: $p = 0,1112$). Esses resultados validam a aplicação de testes paramétricos para comparação entre os grupos nesta condição experimental.

O teste F indicou diferença significativa entre as variâncias dos grupos ($p = 0,0060$), evidenciando variâncias heterogêneas. Dessa forma, foi aplicado o teste t não pareado com correção de Welch, que pressupõe a não homogeneidade de variâncias. Este teste revelou redução estatisticamente significativa na viabilidade celular no grupo tratado com rotenona comparado ao Controle ($t = 4,164$; $df = 5,534$; $p = 0,0071$) (Figura 8b). As médias de absorbância foram 1,203 para o Controle e 0,8569 para o grupo Rotenona, com diferença entre médias de $-0,3459 \pm 0,08307$ (EPM) e intervalo de confiança de 95% entre -0,5534 e -0,1384, indicando efeito citotóxico relevante ($\eta^2 = 0,7581$) (Tabela A12).

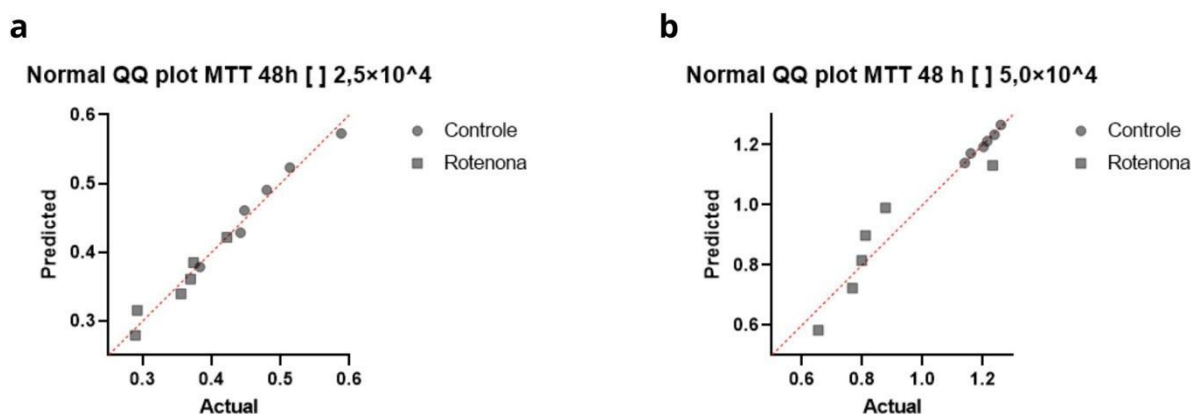


Figura 7. Gráficos Quantil-Quantil (Q-Q plot) utilizados para a avaliação da normalidade dos dados de viabilidade celular obtidos pelo ensaio MTT após 48 horas de exposição à rotenona (0,1 mM). a) Dados referentes à densidade celular de $2,5 \times 10^4$ células/poço; b) Dados referentes à densidade celular de $5,0 \times 10^4$ células/poço. Em ambos os gráficos, os pontos alinhados à linha diagonal indicam conformidade dos dados com a distribuição normal, corroborando os resultados dos testes estatísticos de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov.

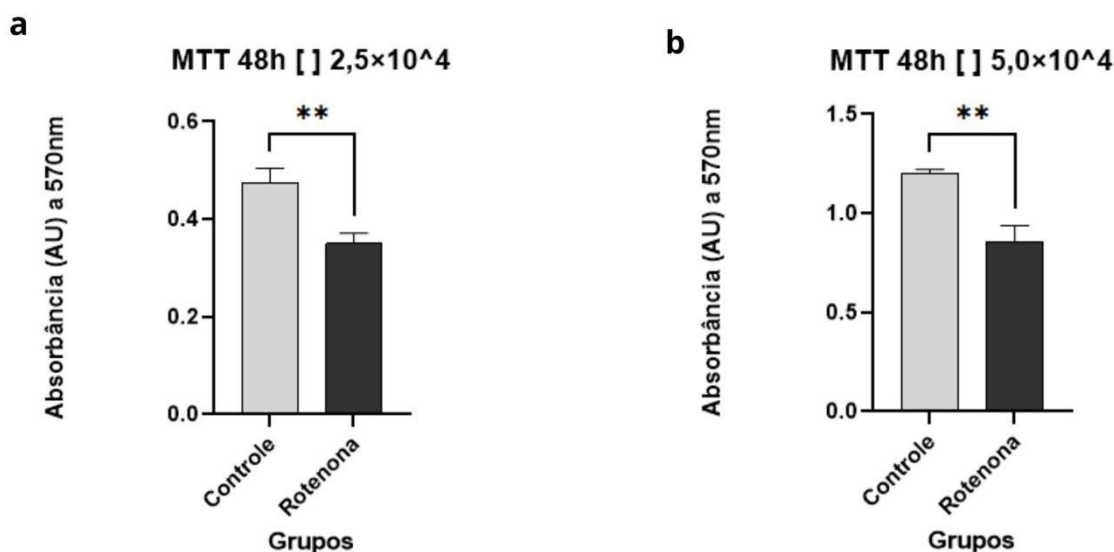


Figura 8. Gráficos de barras representando a viabilidade celular, avaliada pelo ensaio MTT, após 48 horas de exposição à rotenona (0,1 mM) em culturas de diferentes densidades celulares. a) Gráfico da densidade $2,5 \times 10^4$ células/poço, mostrando redução significativa na viabilidade celular no grupo tratado em comparação ao Controle ($p = 0,0055$, teste t não pareado); b) Gráfico da densidade $5,0 \times 10^4$ células/poço, demonstrando redução significativa da viabilidade no grupo tratado em relação ao Controle ($p = 0,0071$, teste t não pareado com correção de Welch). Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM. Os símbolos de significância estatística são: $p < 0,01$ (**).

A fim de investigar os efeitos de uma exposição ainda mais prolongada à rotenona, foi conduzido um ensaio de MTT com 72 horas de duração, utilizando as densidades de $2,5 \times 10^4$ e $5,0 \times 10^4$ de células SH-SY5Y por poço.

Na análise dos dados obtidos no ensaio de viabilidade celular (MTT) com exposição à rotenona (0,1 mM) por 72 horas e densidade celular de $2,5 \times 10^4$ células/poço, verificou-se que os grupos Controle e Rotenona apresentaram distribuição normal. Essa normalidade foi confirmada pelo teste estatístico Shapiro-Wilk ($p = 0,3008$ e $p = 0,5770$) (Tabela A13, Figura 9a). Esses resultados asseguram a adequação da aplicação de testes paramétricos na comparação entre os grupos (Tabela A15).

Devido à heterogeneidade de variâncias identificada pelo teste F ($p < 0,0001$), foi aplicado o teste t não pareado com correção de Welch, que demonstrou uma redução altamente significativa na viabilidade celular do grupo tratado com rotenona em comparação ao grupo Controle ($t = 25,52$; $df = 19,15$; $p < 0,0001$) (Figura 10a). As médias de absorbância foram de 0,7797 para o grupo Controle e 0,1293 para o grupo Rotenona, com uma diferença entre médias de $-0,6504 \pm 0,02549$ (EPM) e intervalo de confiança de 95% entre -0,7038 e -0,5971. O valor de R^2 (η^2) foi de 0,9714, indicando um forte efeito do tratamento (Tabela A16).

Os dados obtidos no ensaio de MTT com densidade de $5,0 \times 10^4$ células/poço no tempo de 72 horas foram submetidos ao teste de normalidade. O teste de Shapiro-Wilk confirmou a normalidade (Controle: $p = 0,4229$; Rotenona: $p = 0,1411$) (Tabela A14, Figura 9b). Dessa forma, todos os testes aplicados confirmaram que os dados seguem uma distribuição normal, permitindo a aplicação de testes paramétricos para análise estatística comparativa entre os grupos.

No entanto, a análise do ensaio de viabilidade celular (MTT) com densidade de $5,0 \times 10^4$ células/poço e exposição à rotenona (0,1 mM) por 72 horas indicou que os grupos apresentaram variâncias heterogêneas, conforme evidenciado pelo teste F ($p = 0,0074$) (Tabela A17). Assim, foi aplicado o teste t não pareado com correção de Welch, que demonstrou uma redução estatisticamente significativa na viabilidade celular do grupo tratado em comparação ao Controle ($t = 15,28$; $df = 25,15$; $p < 0,0001$) (Figura 10b). As médias de absorbância foram 1,088 para o Controle e 0,4108 para o grupo Rotenona, com diferença entre médias de $-0,6773 \pm 0,04431$ (EPM) e intervalo de confiança de 95% entre -0,7686 e -0,5861. O valor de R^2 (η^2) foi de 0,9028, indicando um efeito robusto do tratamento com rotenona nesta condição experimental (Tabela A18).

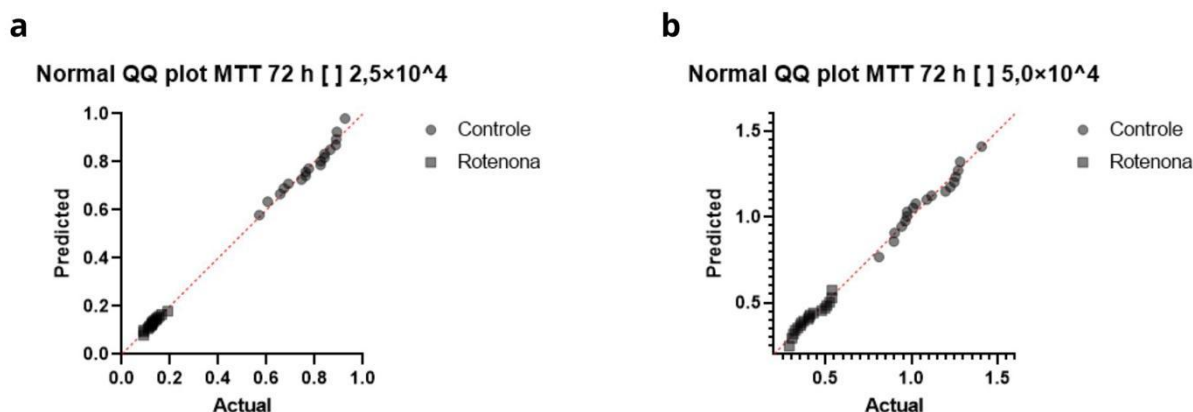


Figura 9. Gráficos Quantil-Quantil (Q-Q plot) utilizados para avaliação da normalidade dos dados obtidos nos ensaios de viabilidade celular pelo método MTT. Com densidades de a) $2,5 \times 10^4$ e b) $5,0 \times 10^4$ células por poço após 72 horas de exposição. Os pontos representam os quantis observados plotados contra os quantis teóricos da distribuição normal. A proximidade dos pontos à linha diagonal indica aderência à normalidade dos dados. A análise foi complementada pelos testes estatísticos de D'Agostino & Pearson, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov, confirmando a normalidade dos dados em ambos os grupos (Controle e Rotenona).

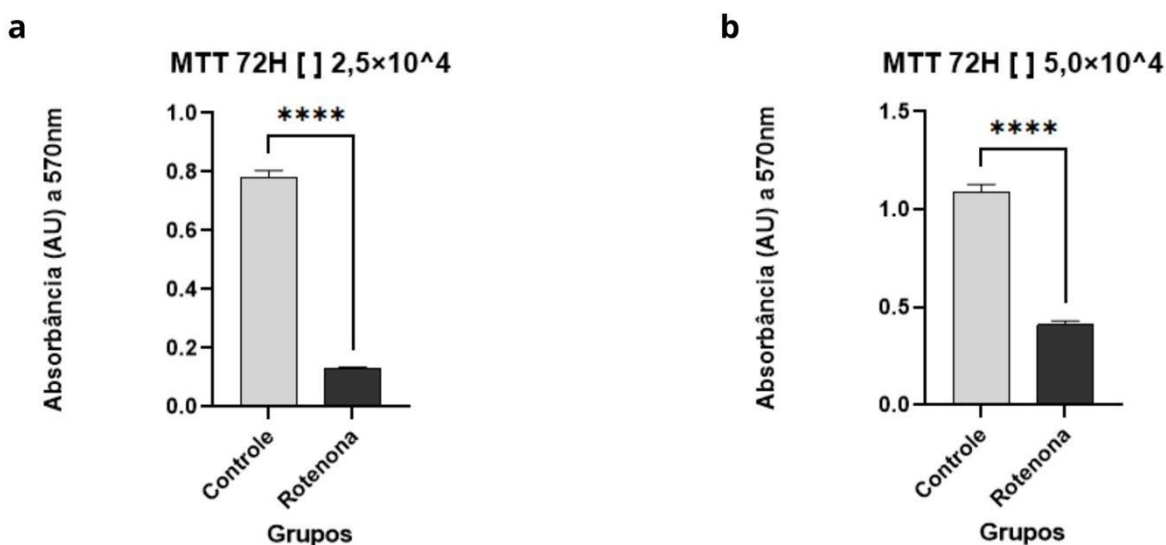


Figura 10. Gráficos de barras mostrando a avaliação da viabilidade celular das células SH-SY5Y expostas à rotenona (0,1 mM) por 72 horas, em duas diferentes densidades celulares. a) Densidade de $2,5 \times 10^4$ células/poço; b) Densidade de $5,0 \times 10^4$ células/poço. As barras representam a média da absorbância medida pelo ensaio MTT, com erro padrão da média (EPM). Em ambas as densidades, o teste t não pareado com correção de Welch revelou redução significativa da viabilidade celular no grupo tratado com rotenona em comparação ao Controle (A: $t = 25,52$; $df = 19,15$; $p < 0,0001$, ****; B: $t = 15,28$; $df = 25,15$; $p < 0,0001$). Asteriscos indicam níveis de significância estatística ($p < 0,0001$).

Com o objetivo de testar a reprodutibilidade dos efeitos da rotenona e avaliar o potencial tóxico da MPP⁺ como nova neurotoxina modelo, foi realizado um ensaio de MTT utilizando células SH-SY5Y expostas por 24 horas às duas substâncias em diferentes concentrações.

Os dados obtidos no ensaio de viabilidade celular com exposição por 24 horas às diferentes condições experimentais foram submetidos ao teste de normalidade para verificar a distribuição dos grupos antes das comparações estatísticas. Para o grupo Controle ($n = 6$), o teste de Shapiro-Wilk ($p = 0,0051$) indicou violação da normalidade, caracterizando uma distribuição não normal. Já para o grupo tratado com rotenona $2,5 \mu\text{M}$ ($n = 12$), o teste de Shapiro-Wilk ($p = 0,0395$) apontou desvios significativos, sugerindo uma distribuição não normal (Tabela A19). Diante a não normalidade clara no grupo Controle, optou-se por aplicar testes estatísticos não paramétricos nas comparações subsequentes entre esses grupos, garantindo maior rigor e confiabilidade na análise dos dados.

A comparação entre o grupo Controle e o grupo tratado com MPP^+ (2 mM) por 24 horas foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney, uma vez que o grupo Controle não apresentou distribuição normal, conforme citado. Os resultados indicaram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,0022$), com redução da viabilidade celular no grupo MPP^+ (Figura 11a). A mediana da absorbância no ensaio de MTT foi de $0,4367$ no grupo Controle e de $0,1667$ no grupo MPP^+ , evidenciando uma diminuição considerável na atividade metabólica celular. O valor de U foi igual a 0 , com uma diferença de medianas de $-0,2700$ (diferença de Hodges-Lehmann = $-0,2759$), reforçando o efeito citotóxico induzido pela exposição ao MPP^+ (Tabela A20).

A comparação entre o grupo Controle e o grupo tratado com rotenona na concentração de $2,5 \mu\text{M}$ por 24 horas foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney devido à não normalidade dos dados. Os resultados indicaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,2129$) (Figura 11b). As medianas de absorbância foram $0,4367$ para o Controle e $0,3733$ para o grupo tratado com rotenona, com uma diferença de medianas de $-0,0634$ (diferença de Hodges-Lehmann = $-0,04885$) (Tabela A21). Esses dados sugerem que, sob as condições testadas, a exposição à rotenona a $2,5 \mu\text{M}$ não promoveu redução significativa na viabilidade celular em comparação ao Controle.

A comparação entre o grupo Controle e o grupo tratado com rotenona na concentração de $5,0 \mu\text{M}$ por 24 horas foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney, devido à distribuição dos dados, da mesma forma que ocorreu com a concentração anterior, os resultados indicaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,8182$) (Figura 11c). As medianas de absorbância foram praticamente iguais, sendo $0,4367$ para o Controle e $0,4366$ para o grupo tratado com rotenona, com uma diferença de medianas

de -0,00015 (diferença de Hodges-Lehmann = -0,02255) (Tabela A22). Esses dados sugerem que a exposição à rotenona a 5,0 μM , nas condições experimentais testadas, não afetou significativamente a viabilidade celular em comparação ao Controle.

A comparação entre o grupo Controle e o grupo tratado com H_2O_2 (100 μM) por 24 horas foi também realizada por meio do teste de Mann-Whitney, devido à natureza dos dados. Os resultados indicaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,6991$) (Figura 11d). As medianas de absorbância foram 0,4367 para o Controle e 0,4136 para o grupo H_2O_2 , com uma diferença de medianas de -0,02310 (diferença de Hodges-Lehmann = -0,04550) (Tabela A23). Esses achados sugerem que, sob as condições experimentais utilizadas, a exposição ao H_2O_2 não alterou significativamente a viabilidade das células SH-SY5Y em comparação ao Controle.

A comparação entre os efeitos de MPP^+ e de rotenona sobre a viabilidade celular de células SH-SY5Y revelou perfis de toxicidade distintos sob as condições experimentais testadas. A exposição ao MPP^+ (2 mM) por 24 horas resultou em uma redução estatisticamente significativa da atividade metabólica celular, evidenciada por uma queda acentuada na absorbância no ensaio de MTT, reforçando seu potencial citotóxico como modelo de neurodegeneração dopaminérgica. Em contrapartida, a exposição à rotenona, mesmo em concentrações crescentes (2,5 μM e 5,0 μM), não promoveu alterações significativas na viabilidade celular em comparação ao Controle, indicando uma resposta celular menos pronunciada dentro do mesmo intervalo de tempo. Esses achados sugerem que, sob as condições adotadas, o MPP^+ demonstrou maior capacidade de induzir injúria celular aguda do que a rotenona, o que reforça seu uso como alternativa eficaz na indução de neurotoxicidade dopaminérgica em modelos *in vitro*.

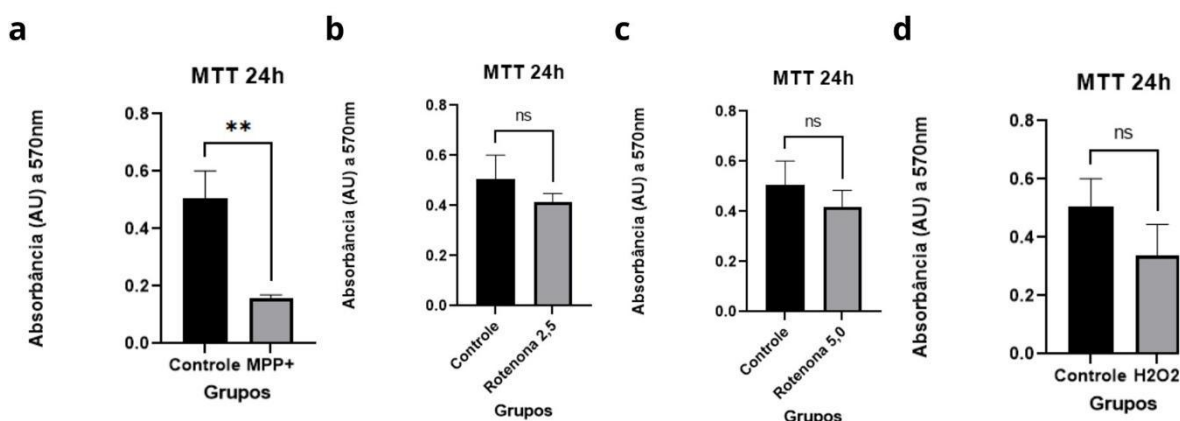


Figura 11. Gráficos de barras representando a análise da viabilidade celular das células SH-SY5Y, após 24 horas de exposição a diferentes tratamentos, avaliadas pelo ensaio MTT em densidade celular de $5,0 \times 10^4$ células/poço. a) Comparação entre grupo Controle e grupo tratado com MPP⁺ (2 mM), demonstrando redução significativa da viabilidade celular ($p = 0,0022$, **). b) Comparação entre grupo Controle e grupo tratado com rotenona 2,5 μM, sem diferença significativa observada ($p = 0,2129$, ns). c) Comparação entre grupo Controle e grupo tratado com rotenona 5,0 μM, sem diferença significativa ($p = 0,8182$, ns). d) Comparação entre grupo Controle e grupo tratado com H₂O₂ (100 μM), sem diferença significativa ($p = 0,6991$, ns). Dados expressos como mediana, analisados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. *ns: não significativo; ** $p < 0,01$.

4.2 CCK-8

Com o objetivo de validar um método alternativo e potencialmente mais sensível de avaliação de viabilidade celular, foi testado o ensaio colorimétrico Cell Counting Kit-8 (CCK-8) utilizando a princípio, a linhagem MDA-MB-231 como um piloto experimental dada a capacidade proliferativa, sendo cultivada em placas de 96 poços. Foram realizadas leituras de absorbância após 1, 2, 3 e 4 horas da adição do reagente, considerando apenas o grupo Controle. Os dados foram submetidos a testes de normalidade. Devido ao número reduzido de réplicas ($n=4$), apenas o teste de Shapiro-Wilk foi considerado válido. Os resultados demonstraram que os dados de todos os tempos analisados apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$), indicando homogeneidade da resposta e suporte à utilização do método nesses intervalos temporais (Tabela A24, Figura12).

Após 1 hora de incubação com CCK-8, foi observada uma elevação da absorbância para 0,2133, com aumentos progressivos em 2 horas (média = 0,2843), 3 horas (média = 0,3878) e atingindo um platô em 4 horas (média = 0,3931). A homogeneidade das variâncias foi confirmada pelos testes de Brown-Forsythe ($p = 0,3854$) e Bartlett ($p = 0,7534$), permitindo a aplicação de ANOVA. A ANOVA de uma via revelou diferenças

estatisticamente significativas entre os tempos ($F(3,12) = 29,94$; $p < 0,0001$), com $R^2 = 0,8822$, demonstrando que a resposta celular ao CCK-8 aumenta de forma consistente e reprodutível ao longo do tempo mesmo na ausência de tratamento (Tabela A25, Figura 13). A análise post hoc pelo teste de comparações múltiplas de Tukey indicou que os aumentos de absorbância entre 1 hora e 2 horas ($p = 0,0356$), 1 hora e 3 horas ($p < 0,0001$), e 1 hora e 4 horas ($p < 0,0001$) foram estatisticamente significativos, bem como entre 2 horas e 3 horas ($p = 0,0029$) e entre 2 horas e 4 horas ($p = 0,0019$). No entanto, não houve diferença significativa entre 3 horas e 4 horas ($p = 0,9950$), sugerindo a estabilização da reação a partir da terceira hora (Tabela A25A). Estes achados preliminares apoiaram o uso do ensaio CCK-8 como método sensível e confiável de análise de viabilidade celular em MDA-MB-231.

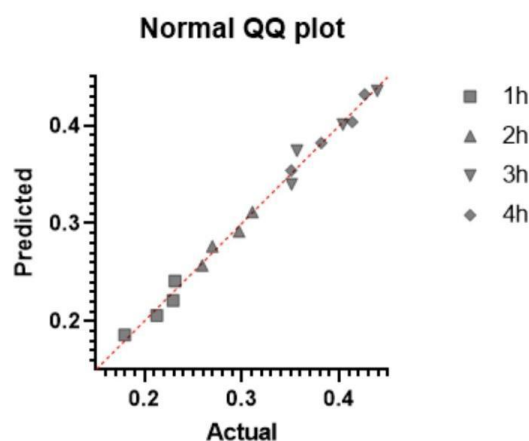


Figura 12. Gráfico Quantil-Quantil (Q-Q plot) ilustrando a distribuição dos dados de absorbância obtidos pelo ensaio CCK-8 em células MDA-MB-231. Os valores observados ("Actual") foram comparados com os valores esperados sob a hipótese de normalidade ("Predicted"). A aderência dos pontos à linha de identidade (vermelha tracejada) indica distribuição aproximadamente normal dos dados em todos os tempos analisados (1h a 4h), validando a aplicação de testes estatísticos paramétricos.

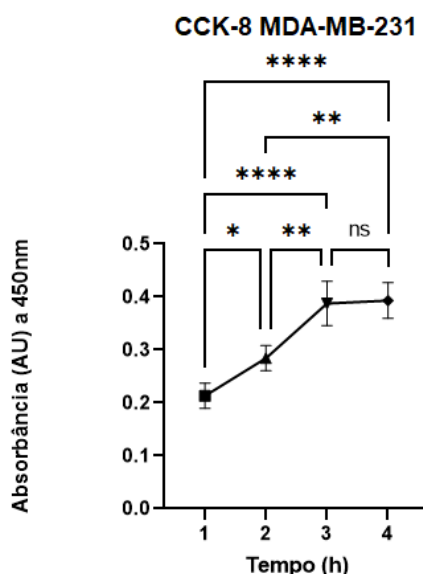


Figura 13. Gráfico de linhas representando a evolução temporal da resposta ao ensaio CCK-8 em células MDA-MB-231. As células foram incubadas com o reagente CCK-8, e as leituras de absorbância a 450 nm foram realizadas após 1, 2, 3 e 4 horas. Observa-se aumento progressivo da absorbância até 3 h, com estabilização após esse ponto, indicando saturação da reação. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média ($n = 4$). ANOVA de uma via indicou diferença significativa entre os tempos ($p < 0,0001$). Comparações múltiplas pelo teste de Tukey revelaram significância entre 1 h e 2 h ($*p = 0,0356$), 1 h e 3 h ($****p < 0,0001$), 1 h e 4 h ($****p < 0,0001$), 2 h e 3 h ($**p = 0,0029$), 2 h e 4 h ($**p = 0,0019$), enquanto não houve diferença significativa entre 3 h e 4 h (ns, $p = 0,9950$).

Com o objetivo de confirmar a reprodutibilidade do ensaio CCK-8 em outra linhagem celular, o protocolo foi aplicado às células MDA-MB-436, mantidas as condições experimentais. As leituras de absorbância foram realizadas após 1, 2, 3 e 4 horas da adição do reagente. O teste de Shapiro-Wilk indicou distribuição normal dos dados nos tempos de 1h a 3h ($p > 0,05$), mas violação da normalidade em 4h ($p = 0,0138$), sugerindo uma possível alteração na consistência da resposta após este ponto. Este resultado contrasta com o observado na linhagem MDA-MB-231, que apresentou distribuição normal em todos os tempos, sugerindo que a resposta ao CCK-8 pode variar de acordo com a linhagem utilizada, sobretudo em tempos mais prolongados de incubação (Tabela A26, Figura 14).

Considerando essa limitação, optou-se pela aplicação do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, que revelou diferenças estatisticamente significativas entre os tempos avaliados ($H = 13,06$; $p < 0,0001$) (Tabela A27, Figura 15). Esses resultados indicam que o ensaio CCK-8 também é sensível na linhagem MDA-MB-436, embora a resposta no tempo de 4 horas sugira maior variabilidade ou possível saturação da reação nessa condição. A análise

post hoc pelo teste de comparações múltiplas de Dunn demonstrou significância estatística entre os tempos de 1 hora e 3 horas ($p = 0,0451$), bem como entre 1 hora e 4 horas ($p = 0,0065$). Não foram observadas diferenças significativas entre os demais pares de tempos ($p > 0,05$) (Tabela A27A).

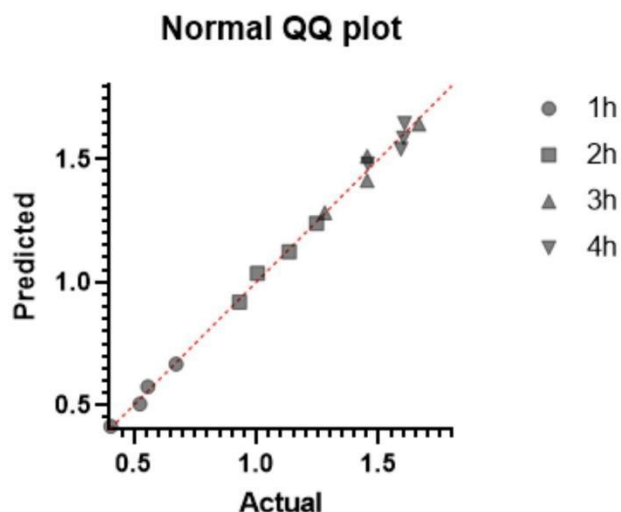


Figura 14. Gráfico Quantil-Quantil (Q-Q plot) para avaliação da distribuição dos dados obtidos no ensaio CCK-8 em células MDA-MB-436. Os valores observados ("Actual") foram comparados com os valores esperados sob distribuição normal ("Predicted"). A proximidade dos pontos com a linha vermelha indica aderência à normalidade nos tempos de 1h, 2h e 3h. No entanto, observa-se leve afastamento dos pontos correspondentes a 4h, o que corrobora a violação da normalidade detectada pelo teste de Shapiro-Wilk ($p = 0,0138$).

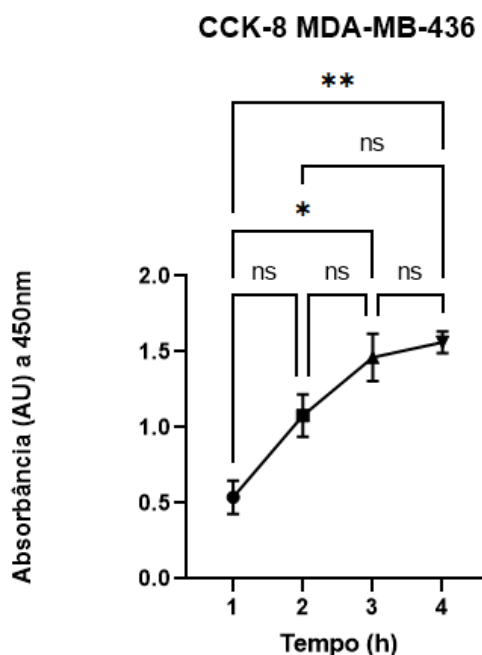


Figura 15. Gráfico de linhas ilustrando a evolução temporal da resposta ao ensaio CCK-8 em células MDA-MB-436. As células foram incubadas com o reagente CCK-8, e as leituras de absorbância a 450 nm foram realizadas após 1, 2, 3 e 4 horas. Observa-se aumento progressivo da absorbância até 3 h, com tendência à estabilização ou maior variabilidade após esse ponto. A análise pelo teste de Kruskal-Wallis indicou diferenças significativas entre os tempos ($H = 13,06$; $p < 0,0001$). Comparações múltiplas pelo teste de Dunn revelaram diferenças significativas entre 1 h e 3 h ($*p = 0,0451$) e entre 1 h e 4 h ($**p = 0,0065$), enquanto os demais pares não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média ($n = 4$).

Considerando os resultados positivos obtidos em duas linhagens tumorais, seguiu-se para aplicar e validar o método CCK-8 na linhagem neuronal SH-SY5Y. Foram realizadas exposições de 24 horas a concentrações crescentes de MPP^+ (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mM), além de um grupo Controle negativo e um grupo exposto ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , Controle positivo), incubado por 20 minutos. As leituras de absorbância foram realizadas de 1 a 5 horas após a adição do reagente CCK-8.

A normalidade dos dados obtidos nas leituras do ensaio CCK-8, realizadas aos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 horas, foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk, recomendado para amostras pequenas ($n=4$) devido à sua maior potência em comparação a outros testes de normalidade (Razali & Wah, 2011). Na leitura de 1 hora, observou-se que o grupo tratado com MPP^+ 1,0 mM apresentou desvio significativo da normalidade ($p = 0,0252$), enquanto os demais grupos não rejeitaram a hipótese de distribuição normal (Tabela A28, Figura 16a).

Para as leituras subsequentes, de 2 a 5 horas, todos os grupos experimentais, incluindo Controle e diferentes concentrações de MPP⁺ e H₂O₂, apresentaram dados compatíveis com a normalidade ($p > 0,05$) (Tabela A29, Tabela A30, Tabela A31, Tabela A32, Figura 16b, c, d, e).

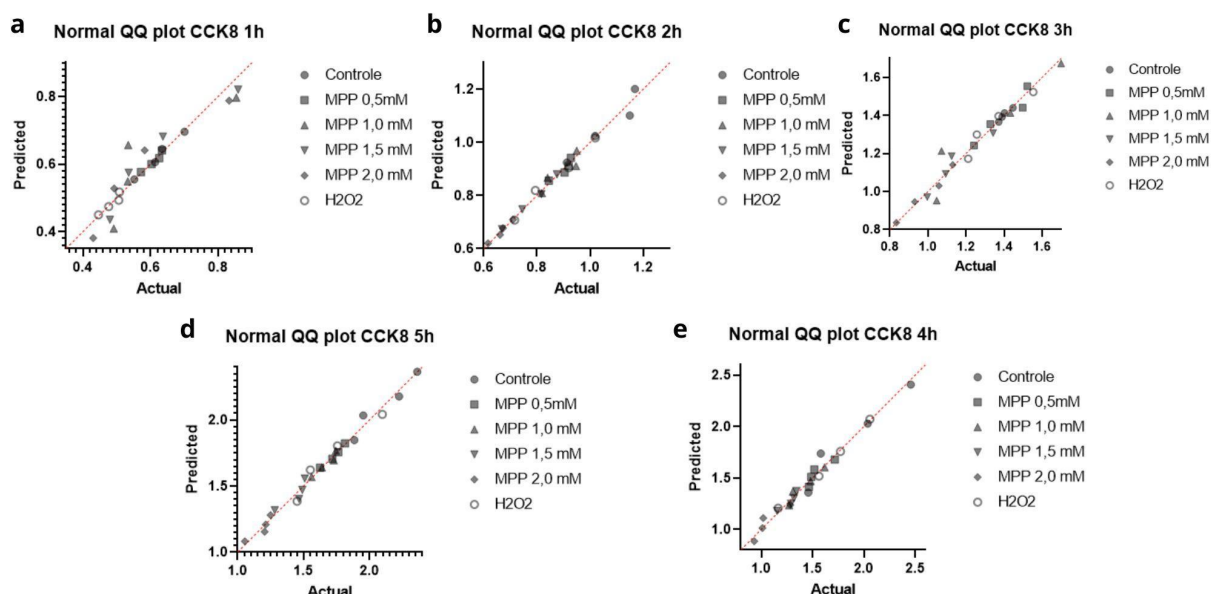


Figura 16. Gráficos Quantil-Quantil (Q-Q plot) utilizados para a avaliação da normalidade dos dados obtidos no ensaio CCK-8 em diferentes tempos de leitura. a) 1h, b) 2h, c) 3h, d) 4h e e) 5h. Os gráficos representam a comparação entre a distribuição observada dos resíduos e a distribuição normal teórica para os grupos experimentais (Controle, MPP⁺ nas concentrações de 0,5 a 2,0 mM e H₂O₂). Na leitura de 1 hora, observou-se desvio da normalidade apenas no grupo tratado com MPP⁺ 1,0 mM, evidenciado pela dispersão dos pontos em relação à linha de referência. Nos demais tempos, os dados demonstraram aderência à normalidade, com os pontos próximos à linha reta, conforme o teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

Apesar da predominância da normalidade nas leituras posteriores, a presença de distribuição não normal em pelo menos um grupo na primeira leitura, associada ao tamanho reduzido da amostra e à variabilidade intrínseca dos dados, justificou a adoção de testes estatísticos não paramétricos para todas as análises comparativas entre grupos. A utilização de testes não paramétricos é recomendada quando os pressupostos de normalidade não são atendidos, especialmente em amostras pequenas, pois esses testes não dependem de distribuição específica dos dados e oferecem maior robustez (Conover, 2019; Ghasemi & Zahediasl, 2012). Essa estratégia visa assegurar a robustez metodológica, a validade dos pressupostos estatísticos e a confiabilidade dos resultados obtidos ao longo do estudo.

Para investigar as diferenças entre os grupos específicos, no tempo de leitura de 1 hora, após o teste global de Kruskal-Wallis, aplicou-se o teste post hoc de Dunn com correção para comparações múltiplas. Os resultados indicaram que nenhuma comparação entre o

Controle e os diferentes tratamentos (MPP⁺ em várias concentrações e H₂O₂) apresentou diferença estatisticamente significativa (valores-p ajustados > 0,05). Apesar da maior diferença observada entre o Controle e o grupo tratado com H₂O₂, o valor-p ajustado de 0,0820 não atingiu o nível de significância preestabelecido ($\alpha = 0,05$) (Tabela A33, Tabela A34, Figura 17a). Assim, confirma-se a ausência de efeito significativo dos tratamentos na viabilidade celular aos 1 hora de exposição.

Seguiu-se para a análise no segundo ponto temporal. Na análise das diferenças específicas entre os grupos após o teste global de Kruskal-Wallis às 2 horas, o teste post hoc de Dunn foi aplicado com correção para comparações múltiplas. Os resultados demonstraram que o tratamento com MPP⁺ na concentração de 2,0 mM promoveu redução significativa da viabilidade celular em comparação ao Controle ($p = 0,0019$). O grupo tratado com MPP⁺ 1,5 mM apresentou tendência à redução da viabilidade ($p = 0,0539$), embora não tenha atingido o nível de significância estatística adotado. Os demais grupos experimentais não diferiram significativamente do Controle (Tabela A35, Tabela A36, Figura 17b). Esses achados indicam que concentrações mais elevadas de MPP⁺ (2mM) exercem efeito citotóxico significativo desde que o tempo de exposição seja maior, como após 2 horas de exposição.

Para o tempo de 3 horas de exposição aos tratamentos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, uma abordagem estatística não paramétrica adequada para dados que não seguem distribuição normal (Gibbons & Chakraborti, 2011; Conover, 2019). O teste indicou diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($H = 11,26$; $p = 0,0465$), sugerindo que pelo menos um dos tratamentos induziu alterações significativas na viabilidade celular em relação ao grupo Controle no tempo de 3 horas de exposição (Tabela A37).

Com o objetivo de identificar quais grupos foram responsáveis por essa diferença global, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Dunn, com correção de significância para múltiplos testes. Observou-se que apenas o grupo tratado com MPP⁺ na concentração de 2,0 mM apresentou diferença significativa em relação ao Controle ($p = 0,0347$), com uma redução marcada nos ranks de viabilidade. As demais comparações, incluindo as concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mM de MPP⁺ e o tratamento com H₂O₂, não atingiram significância estatística ($p > 0,05$) (Tabela A38, Figura 17c). Com relação ao tempo de 3 horas de exposição, apenas a dose mais elevada de MPP⁺ (2mM) foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade celular em comparação ao grupo Controle.

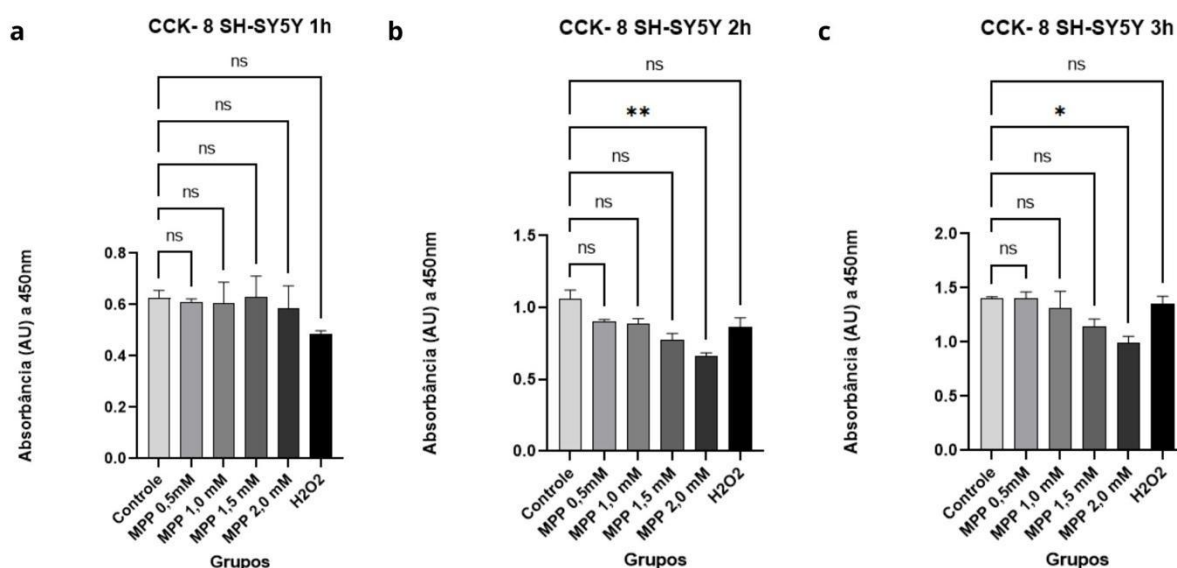


Figura 17. Gráficos de barras representando a viabilidade celular após exposição aos tratamentos. Os dados referem-se aos tempos de (a) 1 hora, (b) 2 horas e (c) 3 horas. As barras indicam a média da viabilidade celular das células SH-SY5Y e as barras de erro representam o erro padrão da média (EPM). Análise da viabilidade celular após exposição aos tratamentos nos tempos de 1, 2 e 3 horas, realizada por meio do teste post hoc de Dunn com correção para comparações múltiplas, após teste global de Kruskal-Wallis. À 1 hora (a), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o Controle e os grupos tratados com MPP⁺ em diferentes concentrações e H₂O₂ (*p* ajustados > 0,05). Às 2 horas (b), o tratamento com MPP⁺ 2,0 mM promoveu redução significativa da viabilidade celular em relação ao Controle (*p* = 0,0019), enquanto o grupo tratado com MPP⁺ 1,5 mM apresentou tendência à redução (*p* = 0,0539). Às 3 horas (c), o grupo tratado com MPP⁺ 2,0 mM manteve a redução significativa da viabilidade celular em comparação ao Controle (*p* = 0,0347). As demais comparações apresentaram diferenças significativas (*p* > 0,05). Níveis de significância: *p* < 0,05 (*), *p* < 0,01 (**), *p* < 0,001 (***).

A seguir, testaram-se mais dois pontos temporais, 4 e 5 horas. A análise estatística dos dados de viabilidade celular após 4 horas de exposição indicou diferença significativa entre os grupos experimentais (Kruskal-Wallis, *p* = 0,0159) (Tabela A39). O teste post hoc de Dunn revelou que apenas a concentração de MPP⁺ a 2,0 mM causou uma redução significativa na viabilidade celular em comparação ao grupo Controle (*p* = 0,0082). As demais concentrações (0,5, 1,0 e 1,5 mM) de MPP⁺, assim como o grupo tratado com H₂O₂, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (*p* > 0,05), embora uma tendência de redução progressiva na viabilidade celular seja observável com o aumento da concentração (Tabela A40, Figura 18a). Esses achados sugerem que, após 4 horas de exposição, apenas a concentração mais alta de MPP⁺ foi suficientemente tóxica para comprometer significativamente a viabilidade das células SH-SY5Y, indicando um efeito dependente do tempo e da dose.

Finalmente, a análise estatística dos dados de viabilidade celular após 5 horas de exposição revelou diferenças significativas entre os grupos (Kruskal-Wallis, *p* = 0,0024)

(Tabela A41). Após, a análise de comparações múltiplas de Dunn indicou que, embora não tenha havido diferença significativa entre o grupo Controle e os grupos tratados com MPP⁺ nas concentrações de 0,5 mM e 1,0 mM ($p > 0,49$), houve uma redução significativa pela primeira vez na viabilidade celular com 1,5 mM de MPP⁺ ($p = 0,0159$) e ainda mais acentuada com 2,0 mM ($p = 0,0005$). O grupo tratado com H₂O₂, apesar de apresentar menor viabilidade, não diferiu estatisticamente do Controle ($p = 0,4947$) (Tabela A42, Figura 18b). Esses achados reforçam que a toxicidade induzida por MPP⁺ é dose-dependente e torna-se mais evidente com o prolongamento da exposição, caracterizando um comprometimento progressivo da viabilidade celular.

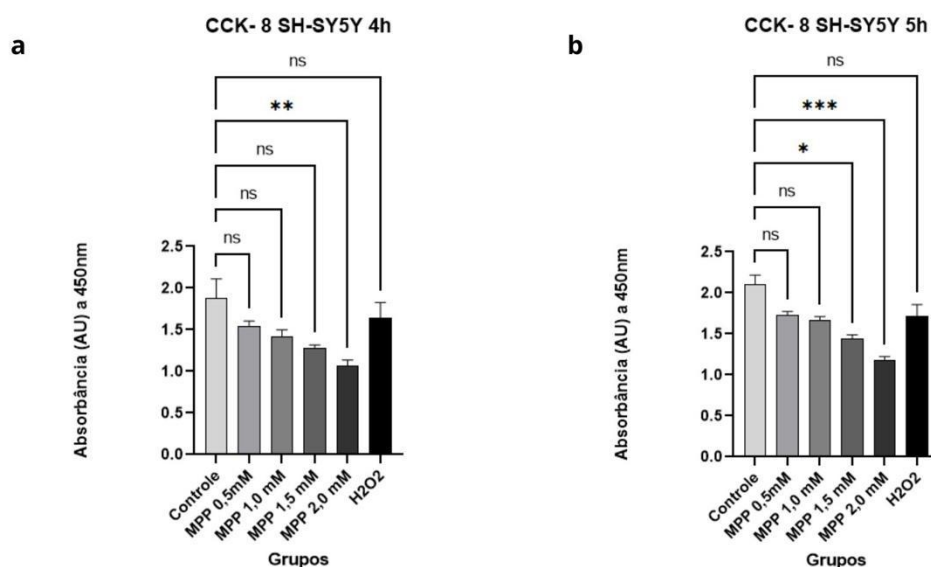


Figura 18. Gráfico de barras representando a viabilidade celular média $\pm$ EPM após exposição aos tratamentos nos tempos de (a) 4 horas e (b) 5 horas. Análise da viabilidade celular após exposição aos tratamentos nos tempos de 4 e 5 horas, realizada por meio do teste post hoc de Dunn com correção para comparações múltiplas, após teste global de Kruskal-Wallis. Às 4 horas (a), observou-se redução significativa da viabilidade celular apenas no grupo tratado com MPP⁺ 2,0 mM em relação ao Controle ($p = 0,0082$), enquanto as demais concentrações de MPP⁺ (0,5, 1,0 e 1,5 mM) e o tratamento com H₂O₂ não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), apesar da tendência à redução progressiva da viabilidade com o aumento da dose. Às 5 horas (b), houve redução significativa da viabilidade celular nos grupos tratados com MPP⁺ 1,5 mM ($p = 0,0159$) e 2,0 mM ($p = 0,0005$), enquanto os grupos com MPP⁺ 0,5 e 1,0 mM e H₂O₂ não diferiram significativamente do Controle ($p > 0,05$). Estes resultados indicam um efeito citotóxico dependente da dose e do tempo de exposição. Níveis de significância: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Para avaliar a reprodutibilidade dos efeitos citotóxicos do MPP⁺ e otimizar os tempos de leitura do ensaio CCK-8, o experimento foi repetido em dois grupos independentes de células SH-SY5Y, realizando-se as leituras nos tempos de 3, 4 e 5 horas após a adição do reagente.

Para o primeiro grupo, os dados referentes às leituras realizadas no tempo de 3 horas foram submetidos a testes de normalidade para verificar a adequação dos dados aos pressupostos das análises estatísticas paramétricas. Devido ao pequeno tamanho amostral ($n=4$ por grupo), os testes de D'Agostino & Pearson, Anderson-Darling e Kolmogorov-Smirnov não foram aplicáveis. Contudo, o teste de Shapiro-Wilk, adequado para amostras pequenas, indicou que todas as distribuições dos grupos experimentais (Controle, MPP^+ em concentrações de 0,5 mM a 2,0 mM e H_2O_2) seguiram uma distribuição normal ($p > 0,05$) (Tabela A43, Figura 19a). Esses resultados respaldam a utilização de testes estatísticos paramétricos para análise comparativa dos dados obtidos nesse tempo, garantindo maior confiabilidade nos resultados.

Para os dados obtidos após 4 horas de incubação, os testes de normalidade também foram aplicados a fim de verificar a distribuição dos dados experimentais. Assim como nas análises de 3 horas, os testes de D'Agostino & Pearson, Anderson-Darling e Kolmogorov-Smirnov não foram aplicáveis devido ao tamanho reduzido da amostra ($n=4$ por grupo). O teste de Shapiro-Wilk, mais apropriado para esse número de amostras, revelou que a maioria dos grupos experimentais (Controle, MPP^+ 0,5 mM, 1,5 mM e 2,0 mM, e H_2O_2) apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$). No entanto, o grupo tratado com MPP^+ 1,0 mM apresentou desvio significativo da normalidade ($p = 0,0289$), indicando que os dados deste grupo não seguem uma distribuição normal (Tabela A44, Figura 19b). Este achado sugere que, para comparações envolvendo esse grupo, deve-se considerar o uso de testes estatísticos não paramétricos, a fim de evitar viés na interpretação dos resultados.

Na análise das leituras obtidas após 5 horas de incubação, observou-se novamente a limitação dos testes D'Agostino & Pearson, Anderson-Darling e Kolmogorov-Smirnov, devido ao tamanho amostral reduzido ($n=4$ por grupo), impedindo sua aplicação. O teste de Shapiro-Wilk foi empregado para avaliar a normalidade dos dados e indicou que a maioria dos grupos apresentou distribuição normal ($p > 0,05$), incluindo o grupo Controle, os grupos tratados com MPP^+ (0,5 mM a 1,5 mM) e o grupo H_2O_2 . No entanto, o grupo tratado com MPP^+ 2,0 mM apresentou uma distribuição significativamente diferente da normal ($p = 0,0073$), evidenciando uma violação dos pressupostos da normalidade (Tabela A45, Figura 19c). Sendo assim, para comparações estatísticas envolvendo esse grupo, é recomendado o uso de testes não paramétricos, a fim de garantir a validade dos resultados e evitar inferências equivocadas.

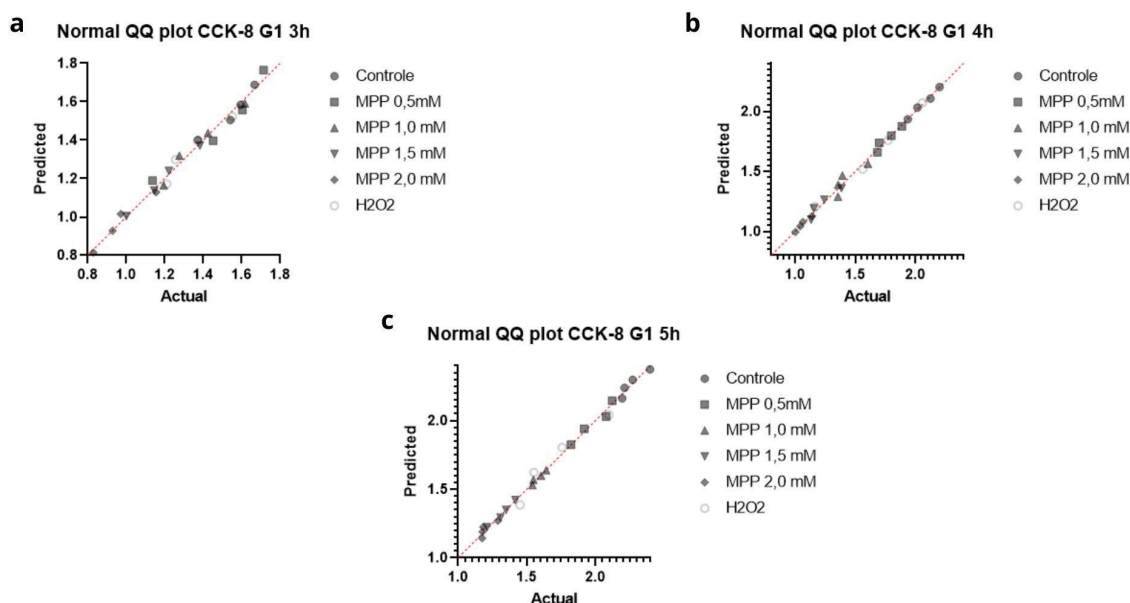


Figura 19. Gráficos Quantil-Quantil (Q-Q plot) para avaliação da normalidade dos dados obtidos no ensaio CCK-8 nos diferentes tempos de leitura. (a) 3 h, (b) 4 h e (c) 5 h. Os gráficos representam a comparação entre a distribuição observada dos resíduos e a distribuição normal teórica para os grupos experimentais (Controle, MPP⁺ nas concentrações de 0,5 a 2,0 mM e H₂O₂).

As análises estatísticas realizadas com os dados de viabilidade celular obtidos após 3 horas de exposição às diferentes concentrações de MPP⁺ e ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) revelaram diferenças significativas entre os grupos. Considerando a possibilidade de heterogeneidade de variâncias, foram aplicados os testes de ANOVA de Brown-Forsythe ($F(5, 14,11) = 5,805$; $p = 0,0041$) e de Welch ($W(5, 8,351) = 6,577$; $p = 0,0092$), ambos indicando diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (Tabela A46). O teste post-hoc de Tamhane's T2 identificou uma redução significativa da viabilidade celular apenas no grupo tratado com MPP⁺ 2,0 mM em relação ao Controle (diferença média = 0,5725; IC 95% = 0,2295 a 0,9155; $p = 0,0042$), indicando toxicidade celular já evidente após esse tempo de exposição. Embora os grupos MPP⁺ 1,5 mM e H₂O₂ tenham apresentado tendências de redução na viabilidade, essas diferenças não alcançaram significância estatística ($p = 0,0671$ e $p = 0,3924$, respectivamente). Os demais grupos (MPP⁺ 0,5 mM e 1,0 mM) não apresentaram alterações significativas em comparação ao grupo Controle (Tabela A47, Figura 20a). Esses resultados sugerem que, após 3 horas de exposição, apenas a maior concentração de MPP⁺ é capaz de comprometer significativamente a viabilidade das células SH-SY5Y.

A análise da viabilidade celular após 4 horas de exposição revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Devido à ausência de normalidade no grupo MPP⁺ 1,0 mM, optou-se pela utilização do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, que indicou diferença significativa nas medianas dos grupos ($H = 19,18$; $p = 0,0018$) (Tabela A48). O teste post-hoc de Dunn revelou que os grupos tratados com MPP⁺ 1,5 mM (diferença de postos médios = 14,75; $p = 0,0159$) e MPP⁺ 2,0 mM (diferença = 19,25; $p = 0,0006$) apresentaram redução significativa da viabilidade celular em comparação ao grupo Controle. Os demais grupos — MPP⁺ 0,5 mM, MPP⁺ 1,0 mM e H₂O₂ — não mostraram diferenças estatisticamente significativas em relação ao Controle ($p > 0,05$) (Tabela A49, Figura 20b). Esses resultados indicam que a citotoxicidade do MPP⁺ é tempo e dose-dependente, sendo que a partir da concentração de 1,5 mM já se observam efeitos deletérios significativos nas células SH-SY5Y após 4 horas de exposição.

A análise da viabilidade celular após 5 horas de exposição confirmou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. O teste de Kruskal-Wallis revelou variação significativa nas medianas ($H = 21,08$; $p = 0,0008$), evidenciando o impacto dos tratamentos com MPP⁺ e H₂O₂ na sobrevivência celular (Tabela A50). O teste post-hoc de Dunn indicou que as concentrações de MPP⁺ 1,5 mM (diferença de postos médios = 16,25; $p = 0,0058$) e 2,0 mM (diferença = 19,75; $p = 0,0004$) reduziram significativamente a viabilidade em relação ao Controle. Os grupos tratados com MPP⁺ 0,5 mM, 1,0 mM e H₂O₂ não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Tabela A51, Figura 20c). Estes resultados reforçam a dose-dependência da toxicidade do MPP⁺, que se torna mais pronunciada com o tempo, evidenciando que concentrações iguais ou superiores a 1,5 mM promovem efeitos deletérios relevantes na viabilidade das células SH-SY5Y após 5 horas de exposição.

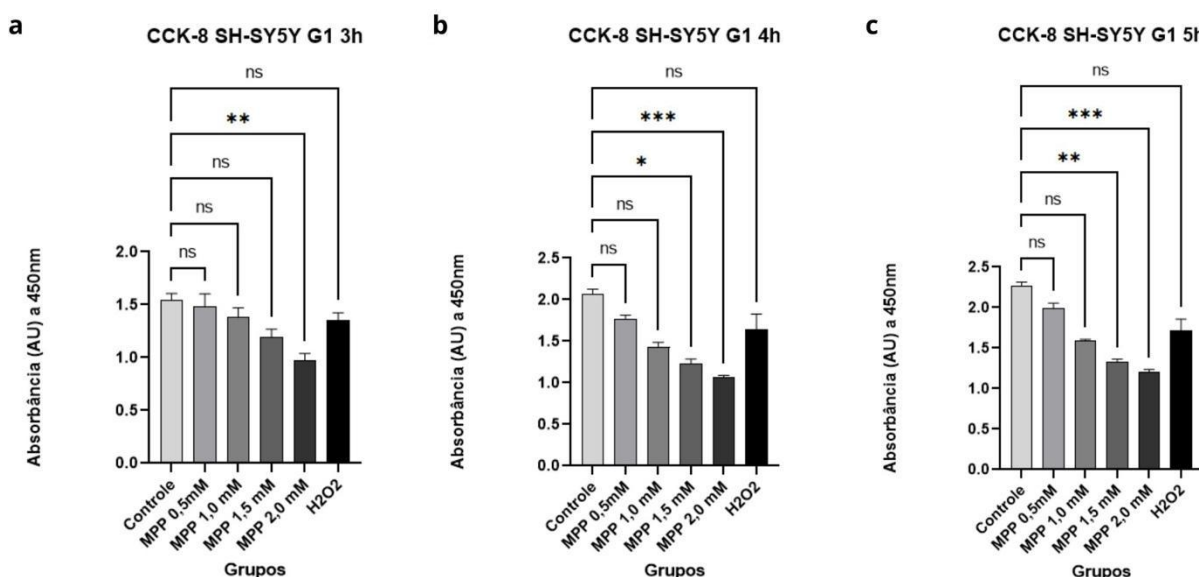


Figura 20. Gráficos de barras representando a viabilidade celular das células SH-SY5Y após exposição a diferentes concentrações de MPP⁺ (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mM) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), avaliadas pelo ensaio CCK-8 nos tempos de (a) 3 horas, (b) 4 horas e (c) 5 horas. As análises estatísticas indicaram diferenças significativas na viabilidade celular ao longo do tempo e das concentrações testadas. Após 3 horas (a), os testes robustos de ANOVA (Brown-Forsythe e Welch) e o post-hoc de Tamhane's T2 mostraram redução significativa apenas no grupo tratado com MPP⁺ 2,0 mM comparado ao Controle. Após 4 horas (b), o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do post-hoc de Dunn indicou redução significativa da viabilidade nos grupos MPP⁺ 1,5 mM e 2,0 mM. Após 5 horas (c), a dose-dependência da toxicidade do MPP⁺ foi confirmada, com diminuição significativa da viabilidade nos mesmos grupos (1,5 e 2,0 mM), enquanto os demais grupos não apresentaram diferenças significativas em relação ao Controle. Níveis de significância: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Os dados obtidos nas leituras de 3 horas para o segundo grupo foram avaliados quanto à normalidade da distribuição. Devido ao tamanho reduzido da amostra ($n=4$), os testes de D'Agostino & Pearson, Anderson-Darling e Kolmogorov-Smirnov não puderam ser aplicados. O teste de Shapiro-Wilk, adequado para amostras pequenas, indicou que todos os grupos experimentais (Controle, MPP⁺ em diversas concentrações e H₂O₂) apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$) (Tabela A52, Figura 21a). Assim, os dados desse tempo e grupo atendem ao pressuposto de normalidade, autorizando o uso de testes estatísticos paramétricos nas análises subsequentes.

Os dados referentes às leituras realizadas após 4 horas de exposição no segundo grupo foram submetidos à avaliação de normalidade. Novamente, devido ao pequeno tamanho amostral ($n=4$), os testes de D'Agostino & Pearson, Anderson-Darling e Kolmogorov-Smirnov não foram aplicáveis. O teste de Shapiro-Wilk indicou que todos os grupos experimentais, incluindo Controle, diferentes concentrações de MPP⁺ e H₂O₂, apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$) (Tabela A53, Figura 21b). Estes resultados

confirmam que os dados deste tempo e grupo também são adequados para análises estatísticas paramétricas.

Os dados obtidos após 5 horas de exposição no segundo grupo foram submetidos aos testes de normalidade para garantir a adequação às análises estatísticas paramétricas. Novamente, devido ao pequeno número de amostras ($n=4$), os testes de D'Agostino & Pearson, Anderson-Darling e Kolmogorov-Smirnov não puderam ser aplicados. O teste de Shapiro-Wilk indicou que todos os grupos experimentais, incluindo Controle, diferentes concentrações de MPP^+ e H_2O_2 , apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$) (Tabela A54, Figura 21c). Dessa forma, os dados desse tempo seguem o pressuposto de normalidade, permitindo o uso de testes paramétricos para as análises subsequentes.

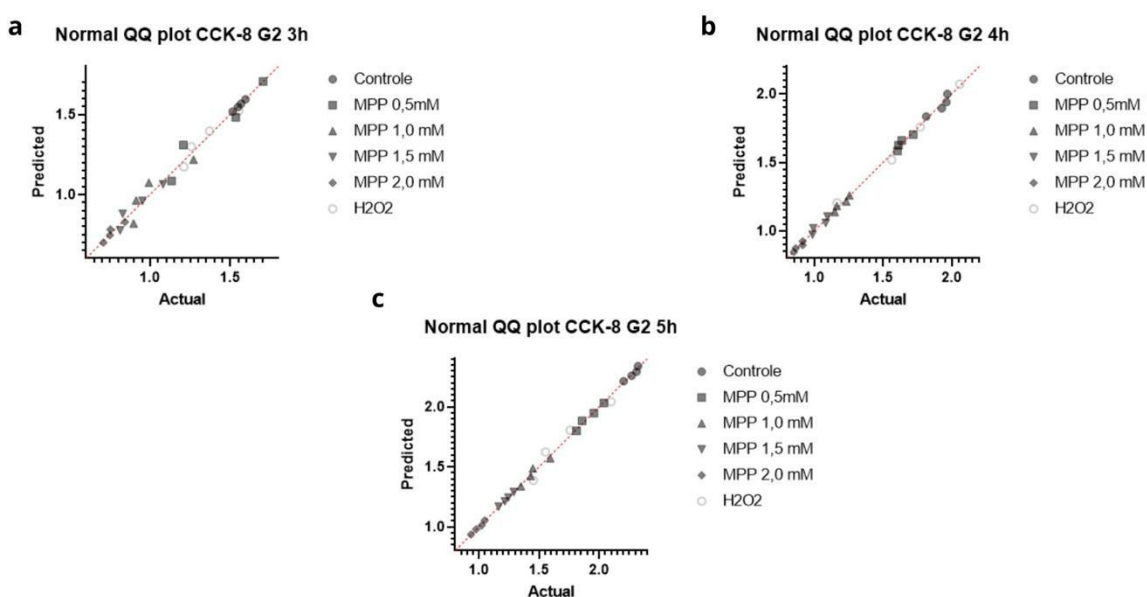


Figura 21. Gráficos Quantil-Quantil (Q-Q plot) para avaliação da normalidade dos dados obtidos no ensaio CCK-8 nos diferentes tempos de leitura: (a) 3 h, (b) 4 h e (c) 5 h. Os gráficos representam a comparação entre a distribuição observada dos resíduos e a distribuição normal teórica para os grupos experimentais (Controle, MPP^+ nas concentrações de 0,5 a 2,0 mM e H_2O_2).

A viabilidade celular após 3 horas de exposição às diferentes concentrações de MPP^+ e ao H_2O_2 foi analisada por meio de testes ANOVA robustos, que indicaram diferenças significativas entre os grupos (Brown-Forsythe: $F(5, 9,126) = 15,87$; $p = 0,0003$; Welch: $W(5, 7,805) = 95,45$; $p < 0,0001$) (Tabela A55). O teste post-hoc de Tamhane's T2 revelou que as concentrações de MPP^+ 1,0 mM (diferença média = 0,5379; IC 95% = 0,0602 a 1,016; $p = 0,0353$), 1,5 mM (diferença média = 0,6373; IC 95% = 0,3054 a 0,9692; $p = 0,0061$) e 2,0

mM (diferença média = 0,7929; IC 95% = 0,6598 a 0,9261; $p < 0,0001$) reduziram significativamente a viabilidade celular em relação ao Controle. As concentrações de MPP⁺ 0,5 mM e o tratamento com H₂O₂ não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Tabela A56, Figura 22a). Estes resultados indicam que, mesmo em curto período de exposição, concentrações iguais ou superiores a 1,0 mM de MPP⁺ causam redução significativa da viabilidade em células SH-SY5Y.

Após 4 horas de exposição, a viabilidade celular apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme indicado pelos testes de Brown-Forsythe ($F(5, 3,664) = 25,09$; $p = 0,0057$) e Welch ($W(5, 8,215) = 161,3$; $p < 0,0001$) (Tabela A57). O teste post-hoc de Tamhane's T2 demonstrou que todas as concentrações de MPP⁺ testadas (0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM e 2,0 mM) promoveram redução significativa da viabilidade celular em relação ao Controle, com diferenças médias variando de 0,2746 a 1,032 ($p \leq 0,0056$). Por outro lado, o tratamento com H₂O₂ não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,7385$) (Tabela A58, Figura 22b). Esses resultados indicam que a toxicidade do MPP⁺ nas células SH-SY5Y é dependente da concentração e do tempo de exposição, sendo já detectável em concentrações baixas após 4 horas.

Após 5 horas de exposição, a análise robusta de variância indicou diferenças significativas entre os grupos (Brown-Forsythe: $F(5, 5,326) = 47,62$; $p = 0,0002$; Welch: $W(5, 8,240) = 210,3$; $p < 0,0001$) (Tabela A59). O teste post-hoc de Tamhane's T2 demonstrou que todas as concentrações de MPP⁺ avaliadas, de 0,5 mM a 2,0 mM, provocaram redução significativa da viabilidade celular em comparação ao Controle, com diferenças médias entre 0,3604 e 1,281 ($p \leq 0,0104$). O tratamento com H₂O₂ não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,1279$) (Tabela A60, Figura 22c). Estes dados confirmam que o efeito citotóxico do MPP⁺ é dose-dependente e se intensifica com o tempo, afetando a sobrevivência das células SH-SY5Y de maneira significativa após 5 horas de exposição.

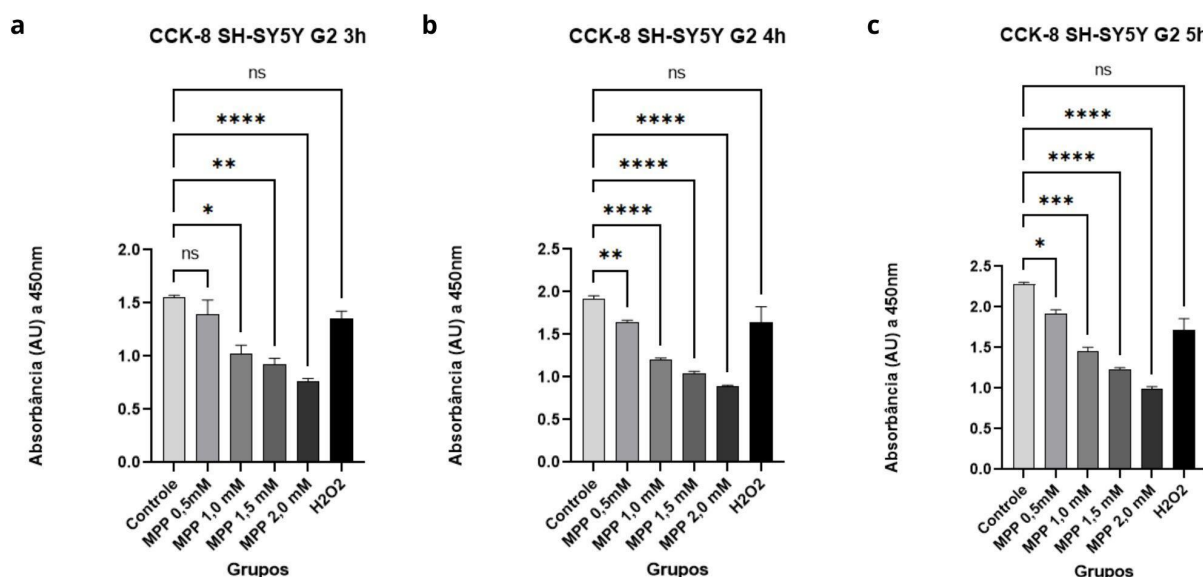


Figura 22. Gráficos de barras representando a viabilidade celular das células SH-SY5Y após exposição a diferentes concentrações de MPP⁺ (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mM) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), avaliadas pelo ensaio CCK-8 nos tempos de (a) 3 horas, (b) 4 horas e (c) 5 horas. As análises estatísticas revelaram que, após 3 horas (a), apenas as concentrações de MPP⁺ iguais ou superiores a 1,0 mM promoveram redução significativa da viabilidade celular em comparação ao Controle, enquanto MPP⁺ 0,5 mM e H₂O₂ não apresentaram efeito significativo. Após 4 horas (b), todas as concentrações de MPP⁺ resultaram em redução significativa da viabilidade, conforme indicado pelos testes de Brown-Forsythe, Welch e post-hoc de Tamhane's T2, enquanto o grupo H₂O₂ permaneceu sem diferença significativa. Às 5 horas (c), o efeito tóxico do MPP⁺ se intensificou, com todas as concentrações testadas apresentando redução significativa da viabilidade celular. O grupo tratado com H₂O₂ continuou sem apresentar diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle. Níveis de significância: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

4.3 RT-qPCR

A expressão relativa de miR-671 foi quantificada por RT-qPCR utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_q}$, com normalização ao Controle endógeno e comparação com o grupo Controle (Tabela 3). O teste de normalidade (Shapiro-Wilk) confirmou a distribuição normal dos dados ($p = 0,1500$ para MPP⁺; $p = 0,1800$ para Controle), enquanto o teste F apontou variância significativamente diferente entre os grupos ($p = 0,0455$) (Tabela A61, Figura 23). Os valores médios de expressão relativa foram de $1,448 \pm 0,222$ no grupo tratado e $0,878 \pm 0,079$ no grupo Controle (média $\pm$ erro padrão da média, $n = 6$ por grupo) (Figura 24). Assim, foi aplicado o teste t de Student não pareado com correção de Welch, que indicou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,0493$; $t = 2,428$; $gl = 6,314$), com um intervalo de confiança de 95% para a diferença entre as médias variando de $-1,138$ a $-0,0023$ (Tabela A62). Esses resultados indicam que a exposição ao MPP⁺ foi capaz de induzir o

aumento da expressão de miR-671, sugerindo uma possível regulação associada ao estresse neurotóxico.

Tabela 3 - Valores de expressão relativa de miR-671 obtidos por RT-qPCR utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ em células SH-SY5Y tratadas com MPP⁺ e no grupo Controle.

Grupos	Cq gene alvo (miR-671)	Cq gene ref. (média)	$\Delta Cq = Cq(\text{alvo}) - Cq(\text{ref})$	$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{trat.}) - \Delta Cq(\text{contr.})$	$2^{-\Delta\Delta Cq}$
Controle 1	28,161	25,627	2,534	0,018	0,987600861
Controle 2	28,515	25,478	3,037	0,521	0,696888619
Controle 3	28,676	27,211	1,465	0,0885	0,940500099
Controle 4	28,278	26,99	1,288	-0,0885	1,06326411
Controle 5	26,315	25,627	0,688	-0,013166667	1,009168211
Controle 6	26,99	25,478	1,512	0,810833333	0,570052488
MPP ⁺ 1	27,122	25,38	1,742	-0,774	1,710004356
MPP ⁺ 2	27,688	25,358	2,33	-0,186	1,137605228
MPP ⁺ 3	27,7	25,374	2,326	-0,19	1,140763716
MPP ⁺ 4	26,089	25,38	0,709	-0,391	1,311302014
MPP ⁺ 5	25,182	25,358	-0,176	-1,276	2,421666168
MPP ⁺ 6	26,524	25,374	1,15	0,05	0,965936329

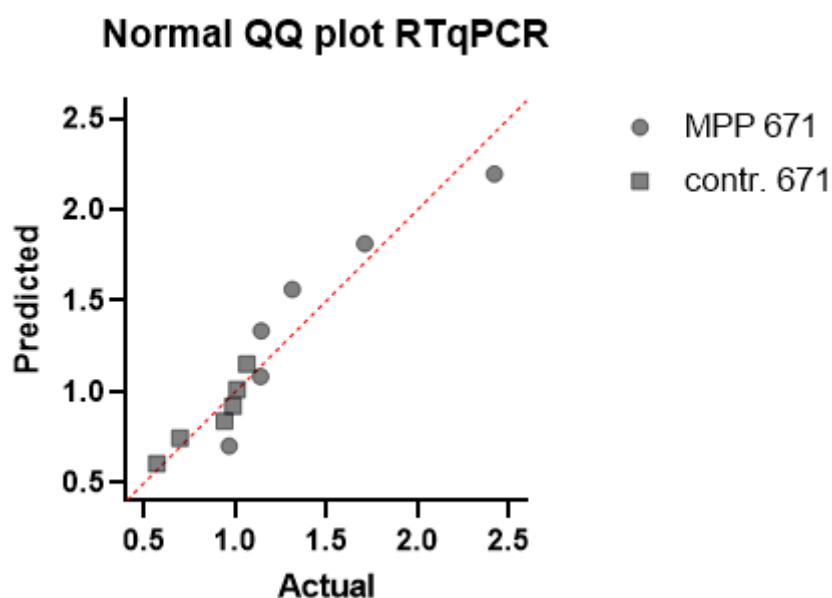


Figura 23. Gráfico Quantil-Quantil (Q-Q plot) dos resíduos utilizados para a avaliação da normalidade dos dados de expressão relativa de miR-671 ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) nos grupos Controle e MPP⁺. O gráfico mostra o alinhamento dos quantis observados em relação à distribuição normal teórica. A proximidade dos pontos à linha de referência indica aderência à normalidade. A normalidade foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$ para ambos os grupos).

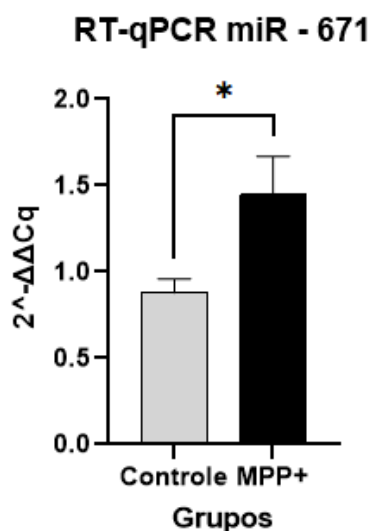


Figura 24. Gráfico de barras representando a expressão relativa de miR-671 em células SH-SY5Y tratadas com 1 mM de MPP⁺ e no grupo Controle. A expressão foi avaliada por RT-qPCR e normalizada utilizando o Controle endógeno miR-39. As barras representam a média da expressão relativa e as barras de erro indicam o erro padrão da média (EPM). O tratamento com MPP⁺ resultou em aumento significativo da expressão do miR-671 em comparação ao Controle (diferença média = $-0,570 \pm 0,235$; $p < 0,05$). Níveis de significância: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

4.4 Análise Funcional *In Silico* dos Genes Alvo de miR-671-5p

A análise de 28 genes revelou 18 agrupamentos funcionais (clusters) com enriquecimento estatisticamente significativo (enrichment scores entre 3,85 e 1,57), indicando que os genes regulados pelo miR-671-5p participam de processos biológicos interconectados e altamente relevantes do ponto de vista fisiopatológico (Tabela 4).

Genes como KRAS, FOXO3 e CAMKK2 foram associados à via de regulação da longevidade celular (via KEGG), além de apresentarem envolvimento em processos de sinalização dependente de ATP e homeostase energética. A presença de enzimas como USP46, ENTPD1, ACY1 e AAK1 reforça a hipótese de que o miR-671-5p participa da modulação de processos relacionados ao envelhecimento e manutenção da função celular.

Diversos genes alvos, como ENTPD1, KRAS, HRH2, CPNE2 e EPB41, foram associados à palmitação e à localização em membranas plasmáticas, indicando possível influência do miR-671-5p na regulação da dinâmica de membranas celulares e na sinalização lipídica.

A presença de genes como HRH2, KRAS e CAMKK2 sugere que o miR-671-5p pode atuar na modulação da sinalização via receptores GPCR, vias de grande relevância na farmacologia e em processos fisiológicos como inflamação e neurotransmissão.

Genes como ACTR2, ATP1B3, FOXO3 e KRT38 apresentaram envolvimento em vias relacionadas ao desenvolvimento e a doenças, sugerindo um papel do miR-671-5p em processos patológicos, possivelmente incluindo distúrbios neurodegenerativos, inflamatórios ou neoplásicos.

A análise também identificou genes como SATB2, FOXO3 e ASCL2 associados à regulação positiva da transcrição, além de apresentarem localização predominante no núcleo celular. Esses dados indicam que o miR-671-5p pode interferir na expressão gênica por meio da regulação de fatores de transcrição e remodeladores da cromatina.

Foram observadas associações com processos de ubiquitinação, metilação de proteínas e formação de ligações isopeptídicas, indicando que o miR-671-5p pode exercer Controle indireto sobre a estabilidade, localização e atividade funcional de proteínas por meio da regulação de genes relacionados a modificações pós-traducionais.

Tabela 4 - Lista Completa de 28 Genes Qualificados com Critérios de Seleção

Gene Symbol	MirDB Score	TargetScan Context++	Evidência Experimental	Critério de Qualificação	Confiança
LGALS3BP	90	-1,05	3 artigos, score: 2	Tripla validação	+++
CPNE2	62	-1,08	2 artigos, score: 2	Tripla validação	+++
KRAS	69	-0,18	2 artigos, score: 2	Tripla validação	+++
ACY1	63	-0,57	2 artigos, score: 2	Tripla validação	+++
HNRNPUL1	54	-0,98	1 artigo, score: 1	Tripla validação	+++
ACTR2	94	-0,35	6 artigos, score: 2	Tripla validação	+++
USP46	100	-0,89	Não validado	Consenso computacional	++
SATB2	100	-0,58	Não validado	Consenso computacional	++
AAK1	99	-0,33	Não validado	Consenso computacional	++

Gene Symbol	MirDB Score	TargetScan Context++	Evidência Experimental	Critério de Qualificação	Confiança
CAMKK2	99	-0,53	Não validado	Consenso computacional	++
C16orf72	98	-0,74	Não validado	Consenso computacional	++
TBL2	98	-0,59	Não validado	Consenso computacional	++
ST8SIA5	98	-0,97	Não validado	Consenso computacional	++
CA7	97	-0,8	Não validado	Consenso computacional	++
VSNL1	96	-0,6	Não validado	Consenso computacional	++
KRT38	96	-0,6	Não validado	Consenso computacional	++
C10orf25	95	-1,27	Não validado	Consenso computacional	++
SLC30A6	93	-1,16	Não validado	Consenso computacional	++
CFL2	96	-1,14	Não validado	Consenso computacional	++
FAM83F	52	-1,12	Não validado	Consenso computacional	++
NDUFB5	59	-1,1	Não validado	Consenso computacional	++
CDR1	Não predito	Não predito	1 artigo, score: 3	Validação experimental	+
FOXO3	Não predito	-0,2	2 artigos, score: 2	Validação experimental	+
ASCL2	Não predito	-0,12	2 artigos, score: 2	Validação experimental	+
ATP1B3	Não predito	-0,13	2 artigos, score: 2	Validação experimental	+
ENTPD1	Não predito	-0,25	2 artigos, score: 2	Validação experimental	+
EPB41	Não predito	-0,04	2 artigos, score: 2	Validação experimental	+
HRH2	Não predito	-0,32	2 artigos, score: 2	Validação experimental	+

5. DISCUSSÃO

A presente dissertação investigou os efeitos neurotóxicos do MPP⁺ em células SH-SY5Y, com foco em sua influência na viabilidade celular e na modulação do microRNA miR-671. A exposição ao MPP⁺ resultou em uma diminuição significativa da viabilidade celular, observada por dois métodos complementares: MTT e CCK-8. Ambos os ensaios demonstraram um perfil claro de toxicidade dose-dependente, com redução progressiva da atividade metabólica mitocondrial conforme o aumento da concentração do agente neurotóxico.

Tanto o MPP⁺ quanto a rotenona são amplamente utilizados como agentes neurotóxicos em modelos experimentais da doença de Parkinson, por mimetizarem de forma eficaz a disfunção mitocondrial observada na degeneração dopaminérgica. Embora ambos atuem como inibidores do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, suas características farmacocinéticas e mecanismos adicionais diferem significativamente. A rotenona é um composto lipofílico de origem vegetal, capaz de atravessar facilmente as membranas celulares e induzir acúmulo intracelular progressivo, o que a torna particularmente eficaz na indução de neurodegeneração sustentada (Horst et al., 2017; Horst et al., 2018).

Já o MPP⁺ é um metabólito ativo da MPTP, transportado seletivamente para dentro de neurônios dopaminérgicos por meio do transportador de dopamina (DAT), o que lhe confere maior especificidade celular (TITZE-DE-ALMEIDA et al., 2014). Em modelos com células da linhagem SH-SY5Y, ambos os compostos induzem morte celular dependente de estresse oxidativo, mas evidências sugerem que a rotenona promove alterações mais amplas no perfil de microRNAs associados à inflamação e apoptose (HORST et al., 2018), enquanto MPP⁺ apresenta efeito tóxico mais agudo e dependente de cofatores como a ativação da via do óxido nítrico e da inflamação mediada por interferon-gama (TITZE-DE-ALMEIDA et al., 2014). Assim, apesar de ambos serem úteis na modelagem *in vitro* da doença de Parkinson, suas diferenças bioquímicas podem influenciar a magnitude e a natureza das respostas celulares observadas.

A diminuição da viabilidade celular observada tanto no ensaio MTT, que mede a capacidade de redução de sais de tetrazólio por enzimas mitocondriais ativas, quanto no

CCK-8, que utiliza o reagente WST-8, reforça a hipótese de disfunção mitocondrial como mecanismo central na citotoxicidade do MPP⁺.

Adicionalmente, foi observada uma mudança no conteúdo de miR-671 nas células SH-SY5Y tratadas com 1 mM de MPP⁺. Este achado é particularmente relevante, considerando que microRNAs (miRNAs) são importantes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica e podem atuar como moduladores de respostas celulares ao estresse. O microRNA miR-671, embora ainda pouco explorado no contexto específico da DP, tem sido associado a processos como inflamação, apoptose e autofagia — todos altamente relevantes na fisiopatologia das doenças neurodegenerativas (Wang et al., 2020; Chen et al., 2022).

Nesse contexto, destaca-se a rede regulatória envolvendo miR-671, CDR1as e miR-7, que vem sendo apontada como um eixo molecular de relevância na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas. CDR1as é um RNA circular altamente expresso no tecido neural e atua como esponja para miR-7, regulando negativamente sua disponibilidade funcional (MEMCZAK et al., 2013; HANSEN et al., 2013). O microRNA miR-7, por sua vez, está envolvido em processos essenciais como a modulação da expressão de alfa-sinucleína, morte celular e neuroinflamação - todos implicados na doença de Parkinson (JUNN & MOURADIAN, 2012; FRAGKOULI & DOXAKIS, 2014). O microRNA miR-671 participa desse eixo ao se ligar a CDR1as com alta complementaridade, promovendo sua clivagem mediada por Ago2 e, conseqüentemente, liberando miR-7 previamente sequestrado (PIWECKA et al., 2017; KLEAVELAND et al., 2018). Assim, miR-671 pode modular indiretamente a atividade de miR-7, influenciando respostas celulares ao estresse e à disfunção mitocondrial. Alterações na dinâmica dessa via sugerem potenciais implicações no desenvolvimento ou progressão de fenótipos patológicos observados em modelos de lesão neurológica (LIU et al., 2020; ZHOU et al., 2021).

Estudos recentes sugerem que o miR-671 pode atuar sobre vias como NF-κB, SIRT1/FOXO1 e TLR4, modulando a inflamação e o equilíbrio entre morte e sobrevivência celular em contextos de estresse oxidativo (Liu et al., 2019; Zhang et al., 2021; Yu et al., 2018). O aumento de sua expressão após o tratamento com MPP⁺ pode refletir uma resposta adaptativa à injúria mitocondrial, potencialmente com função neuroprotetora. Por outro lado, dependendo do contexto celular, sua superexpressão também pode estar envolvida na amplificação de sinais pró-apoptóticos, como observado em modelos de lesão cerebral isquêmica e inflamação do sistema nervoso central (Cao et al., 2021).

Nesse sentido, a análise bioinformática realizada no presente estudo forneceu subsídios importantes para a compreensão dos possíveis mecanismos moleculares mediados pelo miR-671-5p. A predição de 28 genes alvos revelou 18 agrupamentos funcionais com enriquecimento estatisticamente significativo, indicando que o miR-671-5p pode atuar em processos fisiopatológicos complexos e interconectados. Foram identificadas vias associadas à longevidade celular, homeostase energética e sinalização dependente de ATP, com destaque para genes como KRAS, FOXO3 e CAMKK2 (Yang et al., 2019). Outros alvos, como ENTPD1, CPNE2 e EPB41, estão relacionados à palmitação de proteínas e à localização em membranas plasmáticas, sugerindo participação na sinalização lipídica e na regulação da dinâmica de membranas celulares (Qin et al., 2020).

Além disso, a presença de genes como HRH2 e SATB2 sugere que o miR-671-5p pode modular vias de sinalização mediadas por receptores GPCR, bem como atuar sobre fatores de transcrição nucleares envolvidos na resposta inflamatória e em processos neurodegenerativos (Chen et al., 2022; Cao et al., 2021). Notavelmente, o RNA circular CDR1as também foi identificado como alvo validado do miR-671-5p, reforçando a hipótese de que esse microRNA possa integrar um eixo regulatório que impacta a biodisponibilidade do miR-7 e, por consequência, processos críticos para a sobrevivência neuronal (Piwecka et al., 2017). Esses achados de bioinformática, integrados aos dados experimentais, contribuem para consolidar o papel do miR-671-5p como um modulador chave em vias celulares relevantes à fisiopatologia da doença de Parkinson.

O modelo SH-SY5Y utilizado neste estudo é amplamente aceito na literatura por reproduzir aspectos-chave de neurônios dopaminérgicos, principalmente após diferenciação. A linhagem celular SH-SY5Y não diferenciada mantém características de neuroblasto, expressando níveis mínimos de marcadores dopaminérgicos e não apresentando os padrões de vulnerabilidade típicos de neurônios dopaminérgicos maduros. A diferenciação dessas células com ácido retinoico e BDNF é essencial para induzir a expressão de marcadores dopaminérgicos e tornar o modelo mais representativo da fisiologia dos neurônios dopaminérgicos humanos, o que justifica sua utilização em estudos de neurotoxicidade com agentes como MPP⁺ e rotenona (XIE et al., 2010; KORECKA et al., 2013).

A associação entre a diminuição da viabilidade celular e a expressão aberrante de miR-671 sugere que este miRNA possa integrar circuitos regulatórios ativados diante da injúria mitocondrial e oxidativa causada pelo MPP⁺. Ainda que não se possa inferir

causalidade direta neste modelo, os dados apontam o miR-671 como potencial biomarcador molecular da resposta ao estresse neurotóxico (WU et al., 2019).

Cabe destacar que o papel dual dos microRNAs - podendo ser tanto neuroprotetores quanto neurotóxicos dependendo da magnitude e contexto de sua expressão - reforça a necessidade de estudos funcionais adicionais. Investigações futuras com silenciamento ou superexpressão de miR-671, bem como a identificação de seus alvos gênicos diretos por técnicas como luciferase reporter assay e RNA immunoprecipitation (RIP), serão essenciais para elucidar seus mecanismos de ação no contexto da neurodegeneração dopaminérgica (EULALIO et al., 2008).

Em conjunto, os achados desta dissertação demonstram que o MPP⁺ compromete significativamente a viabilidade de células SH-SY5Y por meio de mecanismos compatíveis com disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, e que essa agressão está associada a uma resposta molecular envolvendo mudanças na expressão de miR-671. Assim, este microRNA surge como possível modulador da resposta ao dano neuronal, com potencial para investigação como biomarcador diagnóstico ou alvo terapêutico em modelos de Doença de Parkinson.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os modelos *in vitro* utilizando a linhagem SH-SY5Y são válidos para a avaliação da toxicidade induzida por compostos neurotóxicos como a rotenona e o MPP⁺.

- A exposição à rotenona resultou em uma redução significativa da viabilidade celular, com efeitos mais pronunciados em culturas com menor densidade, indicando maior vulnerabilidade em condições de baixa confluência. O aumento do tempo de exposição intensificou a perda de viabilidade, evidenciando um efeito cumulativo da neurotoxina, mesmo em culturas mais densas.
- Os dados do presente estudo, corroboram que o MPP⁺ induz toxicidade celular de forma dose-dependente e tempo-dependente, sendo mais acurado do que a rotenona nas condições testadas.

- O ensaio CCK-8 mostra-se uma ferramenta sensível, reprodutível e de resposta rápida para a quantificação da viabilidade celular; entretanto, é fundamental validar-se o melhor tempo de incubação e condições experimentais de densidade celular e dose da toxina.

- A toxicidade induzida por MPP⁺ é acompanhada por maior expressão de miR-671, sugerindo a participação deste microRNA nos mecanismos celulares de resposta à injúria neurotóxica. Esse achado aponta para um possível papel regulador do miR-671 em contextos de estresse mitocondrial, o que pode contribuir para o entendimento dos processos moleculares envolvidos na Doença de Parkinson, e merece investigação complementar com imitadores e inibidores deste microRNA.

- A análise funcional dos alvos gênicos do miR-671-5p, baseada em predições bioinformáticas robustas e evidências experimentais, reforça seu papel como um regulador multifacetado, com impacto sobre vias essenciais para o funcionamento e a integridade celular. Esses dados complementam os achados obtidos por RT-qPCR, ampliando a compreensão sobre os possíveis mecanismos moleculares mediados pelo miR-671-5p no modelo experimental analisado. Além disso, os resultados aqui apresentados fornecem uma base sólida para investigações futuras sobre o envolvimento desse microRNA em condições patológicas específicas, como neurodegeneração, inflamação crônica e processos tumorais.

Em síntese, este trabalho reforça a utilidade de modelos celulares baseados na linhagem SH-SY5Y para o estudo da neurotoxicidade e destaca o potencial do miR-671 como biomarcador ou alvo terapêutico em distúrbios neurodegenerativos. Estudos futuros são necessários para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos e validar esses achados em modelos mais complexos com alterações neuropatológicas semelhantes às da Doença de Parkinson.

7. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, V. et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, v. 4, e05005, 2015. Disponível em: <https://www.targetscan.org>. Acesso em: 17 jul. 2025.
- AMBION. mirVana™ miRNA Isolation Kit Instruction Manual. Thermo Fisher Scientific, 2004.
- ATCC. SH-SY5Y; Neuroblastoma; Humano (Homo sapiens). Disponível em: <https://www.atcc.org/products/crl-2266>. Acesso em: 22 mai. 2025.
- BASSANI, T. B. et al. Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. *Brain Research*, v. 1593, p. 95–105, 2014.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.
- BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, v. 11, p. 127–152, 2005.
- BETARBET, R. et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, v. 3, n. 12, p. 1301–1306, 2000.
- BLANCA, M. J. et al. Non-normal data: Is ANOVA still a valid option? *Psicothema*, v. 32, n. 4, p. 552–557, 2020. DOI: <https://doi.org/10.7334/psicothema2019.383>.
- BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in Neuroanatomy*, v. 8, p. 155, 2014.
- BOVE, J. et al. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx*, v. 2, n. 3, p. 484–494, 2005.
- BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust tests for the equality of variances. *Journal of the American Statistical Association*, v. 69, n. 346, p. 364–367, 1974.
- CAO, Y. et al. MicroRNA-671-5p promotes neuronal apoptosis and aggravates brain injury via targeting CDR1as in ischemic stroke. *Frontiers in Neuroscience*, v. 15, p. 664899, 2021.
- CAO, Y. et al. Role of miR-671 in modulating inflammatory injury in the CNS. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 41, n. 6, p. 1289–1301, 2021.
- CHEN, C. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 33, n. 20, e179, 2005.
- CHEN, J. et al. MicroRNA-671-5p: a potential therapeutic target in human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 4, p. 1935, 2022.

CHEN, X. et al. MicroRNA-671-5p regulates neuroinflammatory responses. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 15, p. 823456, 2022.

CHEN, Y.; WANG, X. MiRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research*, v. 48, n. D1, p. D127–D131, 2020. Disponível em: <https://mirdb.org>. Acesso em: 17 jul. 2025.

CONOVER, W. J.; IMAN, R. L.; JOHNSON, M. E. A comparative study of tests for heteroscedasticity. *Computational Statistics & Data Analysis*, v. 138, p. 192–208, 2019.

DA SILVA, P. F.; MORAIS, S. MDA-MB-231 cells as model for breast cancer invasion: A review. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 122, n. 10, p. 1780–1790, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcb.29902>.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, v. 39, n. 6, p. 889–909, 2003.

DELACRE, M.; LAKENS, D.; LEYS, C. Why psychologists should by default use Welch's t-test instead of Student's t-test. *International Review of Social Psychology*, v. 30, n. 1, p. 92–101, 2017.

DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments*, n. 45, p. 2565, 2010. DOI: 10.3791/2565.

EULALIO, A.; HUNTZINGER, E.; IZAURRALDE, E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*, v. 132, n. 1, p. 9–14, 2008.

FIELD, A.; WILCOX, R. R. Robust statistical methods: A primer for clinical psychology and experimental psychology. *Journal of Experimental Psychopathology*, v. 8, n. 3, p. 268–281, 2017.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v. 391, n. 6669, p. 806–811, 1998.

FRAGKOULI, A.; DOXAKIS, E. miR-7 and miR-153 protect neurons against MPP⁺-induced cell death via upregulation of mTOR pathway. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 2, p. 22, 2014.

GARCÍA, L.; LÓPEZ, M.; NAVARRO, J. Post hoc tests for multiple comparisons: principles and recommendations. *Revista Colombiana de Estadística*, v. 44, n. 2, p. 25–41, 2021.

GHAFOURI-FARD, S. et al. A review on the role of miR-671 in human disorders. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 9, p. 1077968, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1077968>. Acesso em: 12 set. 2025.

GHASEMI, A.; ZAHEDIASL, S. Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, v. 10, n. 2, p. 486–489, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5812/ijem.3505>. Acesso em: 18 jul. 2025.

GHASEMI, M. et al. The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 23, 2021.

- HANSEN, T. B. et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, v. 495, n. 7441, p. 384–388, 2013.
- HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, v. 13, n. 4, p. 215, 2011.
- HORST, C. H. et al. Signature of aberrantly expressed microRNAs in the striatum of rotenone-induced Parkinsonian rats. *Neurochemical Research*, v. 43, p. 2132–2140, 2018.
- HORST, C. H.; TITZE-DE-ALMEIDA, R.; TITZE-DE-ALMEIDA, S. S. The involvement of Eag1 potassium channels and miR-34a in rotenone-induced death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *Molecular Medicine Reports*, v. 15, n. 4, p. 1479–1488, 2017.
- HU, H. et al. miRTarBase update 2022: an informative resource for experimentally validated miRNA–target interactions. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. D1, p. D222–D230, 2022. Disponível em: <https://mirtarbase.cuhk.edu.cn>. Acesso em: 17 jul. 2025.
- HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, v. 4, n. 1, p. 44–57, 2009. Disponível em: <https://david.ncifcrf.gov>. Acesso em: 17 jul. 2025.
- JENNER, P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 9, n. 9, p. 665–677, 2008.
- JUNN, E.; MOURADIAN, M. M. MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 133, n. 2, p. 142–150, 2012.
- KIM, H. Y. Statistical notes for clinical researchers: assessing normal distribution (2) using skewness and kurtosis. *Restorative Dentistry & Endodontics*, v. 40, n. 1, p. 52–54, 2015.
- KLEAVELAND, B. et al. A network of noncoding regulatory RNAs acts in the mammalian brain. *Cell*, v. 174, n. 2, p. 350–362.e17, 2018.
- KORECKA, Joanna A. et al. Phenotypic characterization of retinoic acid differentiated SH-SY5Y cells by transcriptional profiling. *PLoS ONE*, v. 8, n. 5, p. e63862, 2013.
- LAKENS, D. Sample size justification. *Collabra: Psychology*, v. 7, n. 1, p. 33267, 2021.
- LIU, X. et al. CircRNA–miRNA–mRNA network construction reveals potential regulatory axis in ischemic stroke. *Aging*, v. 12, n. 15, p. 15002–15022, 2020.
- LIU, Y. et al. miR-671/SIRT1/FOXO1 axis in oxidative stress. *Journal of Cellular Physiology*, v. 234, n. 9, p. 15936–15947, 2019.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LIX, L. M.; KESELMAN, J. C.; KESELMAN, H. J.; ROSENTHAL, R. Post hoc power analysis and multiple comparison corrections: recommendations for their use. *Journal of Modern Applied Statistical Methods*, v. 18, n. 2, p. 525–541, 2019.

- MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, v. 431, n. 7006, p. 343–349, 2004.
- MEMCZAK, S. et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, v. 495, n. 7441, p. 333–338, 2013.
- MESTDAGH, P. et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nature Methods*, v. 6, n. 8, p. 667–673, 2009.
- NIK-ZAINAL, S. et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell*, v. 149, n. 5, p. 979–993, 2016.
- PAN, W. et al. Simultaneous extraction of RNA and DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using phenol and guanidine isothiocyanate. *Nature Protocols*, v. 5, n. 3, p. 516–525, 2010.
- PIWECKA, M. et al. Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. *Science*, v. 357, n. 6357, eaam8526, 2017.
- POEWE, W. et al. Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 3, p. 17013, 2017.
- POSTUMA, R. B. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, v. 30, n. 12, p. 1591–1601, 2015.
- QIN, Y. et al. MicroRNA and lipid metabolism: a relationship of mutual regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 17, p. 6201, 2020.
- QUAN, H. et al. Exendin-4 reversed the PC12 cell damage induced by circRNA CDR1as/miR-671/gsk3 β signaling pathway. *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 71, p. 778–789, 2021.
- RAO, X.; HUANG, X.; ZHOU, Z.; LIN, X. An improvement of the 2^{-($\Delta\Delta$ CT)} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomath*, v. 3, p. 71–85, 2013.
- RAZALI, N. M.; WAH, Y. B. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, v. 2, n. 1, p. 21–33, 2011.
- RICCI, E. P.; MANFRINI, N.; TAZZARI, M. miRNA Isolation and Quality Assessment. In: RICCI, E. P. (Ed.). *Methods in Molecular Biology*, v. 1095, p. 37–51, 2014.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, v. 52, n. 3-4, p. 591–611, 1965.
- TITZE-DE-ALMEIDA, R.; DAVID, C.; TITZE-DE-ALMEIDA, S. S. The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. *Pharmaceutical Research*, 2017.
- TITZE-DE-ALMEIDA, R.; TITZE-DE-ALMEIDA, S. S.; FERREIRA, N. R. et al. Suppressing nNOS Enzyme by Small-Interfering RNAs Protects SH-SY5Y Cells and Nigral Dopaminergic Neurons from 6-OHDA Injury. *Neurotoxicity Research*, v. 36, n. 1, p. 117–131, 2019.

TITZE-DE-ALMEIDA, S. S.; LUSTOSA, C. F.; HORST, C. H.; BEL, E. D.; TITZE-DE-ALMEIDA, R. Interferon Gamma potentiates the injury caused by MPP(+) on SH-SY5Y cells, which is attenuated by the nitric oxide synthases inhibition. *Neurochemical Research*, v. 39, n. 12, p. 2452–2464, 2014.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Qubit® microRNA Assay Kit User Guide, 2022.

UVERSKY, V. N. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell and Tissue Research*, v. 318, n. 1, p. 225–241, 2004.

UWATOKO, H. et al. Identification of plasma microRNA expression changes in multiple system atrophy and Parkinson's disease. *Molecular Brain*, v. 12, p. 49, 2019.

VAN DEN NOORTGATE, W.; ONGHENA, P. An introduction to advanced methods of statistical analysis in psychology and education. *European Journal of Psychology*, v. 16, n. 4, p. 679–697, 2020.

VAN TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. A beginner's guide to understanding and implementing the MTT assay to measure cell proliferation and cytotoxicity. *Toxicology in Vitro*, v. 29, n. 7, p. 1010–1014, 2015.

WANG, S. et al. MicroRNA-671-5p modulates inflammation and oxidative stress. *Neurochemistry International*, v. 138, p. 104761, 2020.

WU, D. M. et al. MiR-671-5p protects against Parkinson's disease by regulating GTP cyclohydrolase 1. *Aging*, v. 11, n. 22, p. 10793–10809, 2019.

XIE, H. R.; HUANG, C. L.; LIU, Z. G. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 31, n. 4, p. 469–479, 2010.

YANG, Y. et al. FOXO3a: a key player in cellular responses to oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 141, p. 38–44, 2019.

YAP, B. W.; SIM, C. H. Comparisons of various types of normality tests. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, v. 81, n. 12, p. 2141–2155, 2011.

YU, C. et al. miR-671-5p inhibits the TLR4/NF-κB pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 504, n. 4, p. 1044–1050, 2018.

ZHANG, J. et al. miR-671-5p regulates apoptosis via targeting Bcl-2 in neuronal cells. *Molecular Medicine Reports*, v. 24, n. 3, p. 1–10, 2021.

ZHANG, X.; LUAN, N.; SHI, J. A novel LINC00943/miR-671-5p/ ELAVL1 ceRNA crosstalk regulates MPP(+) toxicity in SK-N-SH cells. *Metabolic Brain Disease*, v. 37, p. 2349–2362, 2022.

ZHOU, L. et al. MPP⁺ induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in SH-SY5Y cells. *Neurotoxicity Research*, v. 39, n. 2, p. 301–312, 2021.

APÊNDICE

Tabela A1: Teste para distribuição normal MTT 24h [] $2,5 \times 10^4$

	Controle	Rotenona
Test for normal distribution		
D'Agostino & Pearson test		
K2	1,130	15,98
P value	0,5684	0,0003
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No
P value summary	ns	***
Anderson-Darling test		
A2*	0,3106	0,9295
P value	0,5075	0,0116
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No
P value summary	ns	*
Shapiro-Wilk test		
W	0,9321	0,7724
P value	0,4031	0,0041
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No
P value summary	ns	**
Kolmogorov-Smirnov test		
KS distance	0,1494	0,2501
P value	>0,1000	0,0530
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Number of values	12	11

Tabela A2: Teste Mann-Whitney MTT 24h [] $2,5 \times 10^4$

Column B	Rotenona
vs.	vs,
Column A	Controle
Mann Whitney test	
P value	<0,0001
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	202 , 74
Mann-Whitney U	8
Difference between medians	
Median of column A	0,4142, n=12
Median of column B	0,1743, n=11
Difference: Actual	-0,2399
Difference: Hodges-Lehmann	-0,2101

Tabela A3: Teste para distribuição normal MTT 24h [] $5,0 \times 10^4$

	Controle	Rotenona
Test for normal distribution		
D'Agostino & Pearson test		
K2	3,408	1,340
P value	0,1820	0,5118
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Anderson-Darling test		
A2*	0,3208	0,2417
P value	0,4833	0,7094
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Shapiro-Wilk test		
W	0,9496	0,9516
P value	0,6306	0,6606
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test		
KS distance	0,1745	0,1221
P value	>0,1000	>0,1000
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Number of values	12	12

Tabela A4: Teste t não pareado MTT 24h [] $5,0 \times 10^4$

Column B vs. Column A	Rotenona vs, Controle
Unpaired t test	
P value	<0,0001
P value summary	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=6,071, df=22
How big is the difference?	
Mean of column A	0,8104
Mean of column B	0,5504
Difference between means (B - A) $\pm$ SEM	-0,2600 $\pm$ 0,04283
95% confidence interval	-0,3489 to -0,1712
R squared (eta squared)	0,6262
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	13,18, 11, 11
P value	0,0002
P value summary	***
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
Data analyzed	
Sample size, column A	12
Sample size, column B	12

Tabela A5: Teste para distribuição normal MTT 24h [] $2,5 \times 10^4$

Test for normal distribution	Controle	Rotenona
D'Agostino & Pearson test		
K2	N too small	N too small
P value		
Passed normality test (alpha=0.05)?		
P value summary		
Anderson-Darling test		
A2*	N too small	N too small
P value		
Passed normality test (alpha=0.05)?		
P value summary		
Shapiro-Wilk test		
W	0,9383	0,9774
P value	0,6457	0,9380
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test		
KS distance	0,1820	0,1697
P value	>0,1000	>0,1000
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Number of values	6	6

Tabela A6: Teste para distribuição normal MTT 24h [] $5,0 \times 10^4$

	Controle	Rotenona
Test for normal distribution		
D'Agostino & Pearson test		
K2	N too small	N too small
P value		
Passed normality test (alpha=0.05)?		
P value summary		
Anderson-Darling test		
A2*	N too small	N too small
P value		
Passed normality test (alpha=0.05)?		
P value summary		
Shapiro-Wilk test		
W	0,9232	0,8132
P value	0,5290	0,0769
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test		
KS distance	0,2709	0,2998
P value	>0,1000	0,0987
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Number of values	6	6

Tabela A7: Teste t não pareado MTT 24h [] $2,5 \times 10^4$

Column B	Rotenona
vs.	vs,
Column A	Controle
Unpaired t test	
P value	0,0003
P value summary	***
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=5,478, df=10
How big is the difference?	
Mean of column A	0,3308
Mean of column B	0,1840
Difference between means (B - A) $\pm$ SEM	-0,1468 $\pm$ 0,02679
95% confidence interval	-0,2064 to -0,08706
R squared (eta squared)	0,7500
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	6,813, 5, 5
P value	0,0552
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	6
Sample size, column B	6

Tabela A8: Teste t não pareado MTT 24h [] $5,0 \times 10^4$

Column B	Rotenona
vs.	vs,
Column A	Controle
Unpaired t test	
P value	0,0064
P value summary	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3,433, df=10
How big is the difference?	
Mean of column A	0,7722
Mean of column B	0,5784
Difference between means (B - A) $\pm$ SEM	-0,1937 $\pm$ 0,05642
95% confidence interval	-0,3194 to -0,06800
R squared (eta squared)	0,5410
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	1,420, 5, 5
P value	0,7099
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	6
Sample size, column B	6

Tabela A9: Teste para distribuição normal MTT 48h [] $2,5 \times 10^4$

	Controle	Rotenona
Test for normal distribution		
D'Agostino & Pearson test		
K2	N too small	N too small
P value		
Passed normality test (alpha=0.05)?		
P value summary		
Anderson-Darling test		
A2*	N too small	N too small
P value		
Passed normality test (alpha=0.05)?		
P value summary		
Shapiro-Wilk test		
W	0,9747	0,9076
P value	0,9222	0,4206
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test		
KS distance	0,1554	0,2075
P value	>0,1000	>0,1000
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Number of values	6	6

Tabela A10: Teste para distribuição normal MTT 48h [] $5,0 \times 10^4$

	Controle	Rotenona
Test for normal distribution		
D'Agostino & Pearson test		
K2	N too small	N too small
P value		
Passed normality test (alpha=0.05)?		
P value summary		
Anderson-Darling test		
A2*	N too small	N too small
P value		
Passed normality test (alpha=0.05)?		
P value summary		
Shapiro-Wilk test		
W	0,9613	0,8318
P value	0,8293	0,1112
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test		
KS distance	0,1596	0,2917
P value	>0,1000	>0,1000
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Number of values	6	6

Tabela A11: Teste t não pareado MTT 48h [] $2,5 \times 10^4$

Column B	Rotenona
vs.	vs,
Column A	Controle
Unpaired t test	
P value	0,0055
P value summary	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3,525, df=10
How big is the difference?	
Mean of column A	0,4756
Mean of column B	0,3503
Difference between means (B - A) $\pm$ SEM	-0,1254 $\pm$ 0,03556
95% confidence interval	-0,2046 to -0,04613
R squared (eta squared)	0,5541
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	1,859, 5, 5
P value	0,5127
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	6
Sample size, column B	6

Tabela A12: Teste t não pareado com correção de Welch MTT 48h [] $5,0 \times 10^4$

Column B	Rotenona
vs.	vs,
Column A	Controle
Unpaired t test with Welch's correction	
P value	0,0071
P value summary	**
Significantly different ($P < 0.05$)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Welch-corrected t, df	$t=4,164$, $df=5,534$
How big is the difference?	
Mean of column A	1,203
Mean of column B	0,8569
Difference between means ($B - A$) $\pm$ SEM	$-0,3459 \pm 0,08307$
95% confidence interval	-0,5534 to -0,1384
R squared (eta squared)	0,7581
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	18,68, 5, 5
P value	0,0060
P value summary	**
Significantly different ($P < 0.05$)?	Yes
Data analyzed	
Sample size, column A	6
Sample size, column B	6

Tabela A13: Teste para distribuição normal MTT 72h [] $2,5 \times 10^4$

	Controle	Rotenona
Test for normal distribution		
D'Agostino & Pearson test		
K2	1,566	1,540
P value	0,4570	0,4631
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Anderson-Darling test		
A2*	0,4001	0,2457
P value	0,3262	0,7193
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Shapiro-Wilk test		
W	0,9409	0,9587
P value	0,3008	0,5770
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test		
KS distance	0,1645	0,1097
P value	>0,1000	>0,1000
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Number of values	18	18

Tabela A14: Teste para distribuição normal MTT 72h [] $5,0 \times 10^4$

	Controle	Rotenona
Test for normal distribution		
D'Agostino & Pearson test		
K2	1,716	4,085
P value	0,4241	0,1297
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Anderson-Darling test		
A2*	0,4384	0,4670
P value	0,2616	0,2212
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Shapiro-Wilk test		
W	0,9499	0,9221
P value	0,4229	0,1411
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test		
KS distance	0,1479	0,1272
P value	>0,1000	>0,1000
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Number of values	18	18

Tabela A15: Teste t não pareado MTT 72h [] $2,5 \times 10^4$

Column B	Rotenona
vs.	vs,
Column A	Controle
Unpaired t test	
P value	<0,0001
P value summary	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=25,52, df=34
How big is the difference?	
Mean of column A	0,7797
Mean of column B	0,1293
Difference between means (B - A) $\pm$ SEM	-0,6504 $\pm$ 0,02549
95% confidence interval	-0,7022 to -0,5986
R squared (eta squared)	0,9504
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	15,78, 17, 17
P value	<0,0001
P value summary	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
Data analyzed	
Sample size, column A	18
Sample size, column B	18

Tabela A16: Teste t não pareado com correção de Welch MTT 72h [] $2,5 \times 10^4$

Column B	Rotenona
vs.	vs,
Column A	Controle
Unpaired t test with Welch's correction	
P value	<0,0001
P value summary	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Welch-corrected t, df	t=25,52, df=19,15
How big is the difference?	
Mean of column A	0,7797
Mean of column B	0,1293
Difference between means (B - A) $\pm$ SEM	-0,6504 $\pm$ 0,02549
95% confidence interval	-0,7038 to -0,5971
R squared (eta squared)	0,9714
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	15,78, 17, 17
P value	<0,0001
P value summary	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
Data analyzed	
Sample size, column A	18
Sample size, column B	18

Tabela A17: Teste t não pareado MTT 72h [] $5,0 \times 10^4$

Column B	Rotenona
vs.	vs,
Column A	Controle
Unpaired t test	
P value	<0,0001
P value summary	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=15,28, df=34
How big is the difference?	
Mean of column A	1,088
Mean of column B	0,4108
Difference between means (B - A) $\pm$ SEM	-0,6773 $\pm$ 0,04431
95% confidence interval	-0,7674 to -0,5873
R squared (eta squared)	0,8730
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	3,919, 17, 17
P value	0,0074
P value summary	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
Data analyzed	
Sample size, column A	18
Sample size, column B	18

Tabela A18: Teste t não pareado com correção de Welch MTT 72h [] $5,0 \times 10^4$

Column B	Rotenona
vs.	vs,
Column A	Controle
Unpaired t test with Welch's correction	
P value	<0,0001
P value summary	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Welch-corrected t, df	t=15,28, df=25,15
How big is the difference?	
Mean of column A	1,088
Mean of column B	0,4108
Difference between means (B - A) $\pm$ SEM	-0,6773 $\pm$ 0,04431
95% confidence interval	-0,7686 to -0,5861
R squared (eta squared)	0,9028
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	3,919, 17, 17
P value	0,0074
P value summary	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
Data analyzed	
Sample size, column A	18
Sample size, column B	18

Tabela A19: Teste para distribuição normal MTT 24h

	Controle	MPP+	H2O2	DMSO	Rotenona 2,5	Rotenona 5,0
Test for normal distribution						
D'Agostino & Pearson test						
K2	N too small	N too small	N too small	N too small	4,866	N too small
P value					0,0878	
Passed normality test (alpha=0.05)?					Yes	
P value summary					ns	
Anderson-Darling test						
A2*	N too small	N too small	N too small	N too small	0,7120	N too small
P value					0,0461	
Passed normality test (alpha=0.05)?					No	
P value summary					*	
Shapiro-Wilk test						
W	0,6924	0,9056	0,8781	0,7985	0,8526	0,9783
P value	0,0051	0,4081	0,2603	0,0570	0,0395	0,9426
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes
P value summary	**	ns	ns	ns	*	ns
Kolmogorov-Smirnov test						
KS distance	0,3988	0,2033	0,2636	0,2962	0,2099	0,1938
P value	0,0034	>0,1000	>0,1000	>0,1000	>0,1000	>0,1000
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	**	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	6	6	6	6	12	6

Tabela A20: Teste Mann-Whitney MTT 24h Controle x MPP+

Column B	MPP+
vs.	vs,
Column A	Controle

Mann Whitney test

P value	0,0022
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different ($P < 0.05$)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	57 , 21
Mann-Whitney U	0

Difference between medians

Median of column A	0,4367, n=6
Median of column B	0,1667, n=6
Difference: Actual	-0,2700
Difference: Hodges-Lehmann	-0,2759

Tabela A21: Teste Mann-Whitney MTT 24h Controle x Rotenona 2,5 μ M

Column E	Rotenona 2,5
vs.	vs,
Column A	Controle

Mann Whitney test

P value	0,2129
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different ($P < 0.05$)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,E	71 , 100
Mann-Whitney U	22

Difference between medians

Median of column A	0,4367, n=6
Median of column E	0,3733, n=12
Difference: Actual	-0,06340
Difference: Hodges-Lehmann	-0,04885

Tabela A22: Teste Mann-Whitney MTT 24h Controle x Rotenona 5,0 μ M

Column F	Rotenona 5,0
vs.	vs,
Column A	Controle

Mann Whitney test

P value	0,8182
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different ($P < 0.05$)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,F	41 , 37
Mann-Whitney U	16

Difference between medians

Median of column A	0,4367, n=6
Median of column F	0,4366, n=6
Difference: Actual	-0,0001500
Difference: Hodges-Lehmann	-0,02255

Tabela A23: Teste Mann-Whitney MTT 24h Controle x H2O2

Column C	H2O2
vs.	vs,
Column A	Controle

Mann Whitney test

P value	0,6991
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different ($P < 0.05$)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	42 , 36
Mann-Whitney U	15

Difference between medians

Median of column A	0,4367, n=6
Median of column C	0,4136, n=6
Difference: Actual	-0,02310
Difference: Hodges-Lehmann	-0,04550

Tabela A24: Teste para distribuição normal CCK-8 MDA-MB-231

	1h	2h	3h	4h
Test for normal distribution				
D'Agostino & Pearson test				
K2	N too small	N too small	N too small	N too small
P value				
Passed normality test (alpha=0.05)?				
P value summary				
Anderson-Darling test				
A2*	N too small	N too small	N too small	N too small
P value				
Passed normality test (alpha=0.05)?				
P value summary				
Shapiro-Wilk test				
W	0,8546	0,9353	0,8970	0,9526
P value	0,2415	0,6257	0,4165	0,7325
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test				
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small
P value				
Passed normality test (alpha=0.05)?				
P value summary				
Number of values	4	4	4	4

Tabela A25: Teste one-way ANOVA CCK-8 MDA-MB-231

ANOVA summary					
F	29,94				
P value	<0,0001				
P value summary	****				
Significant diff. among means ($P < 0.05$)?	Yes				
R squared	0,8822				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	1,104 (3, 12)				
P value	0,3854				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different ($P < 0.05$)?	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	1,198				
P value	0,7534				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different ($P < 0.05$)?	No				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	0,09038	3	0,03013	F (3, 12) = 29,94	P<0,0001
Residual (within columns)	0,01207	12	0,001006		
Total	0,1024	15			
Data summary					
Number of treatments (columns)	4				
Number of values (total)	16				

Tabela A25A: Resultados do teste de comparações múltiplas de Tukey para os tempos de incubação com CCK-8 em células MDA-MB-231.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value			
1 vs. 2	-0,07098	-0,1376 to -0,004387	Yes	*	0,0356	B-C		
1 vs. 3	-0,1745	-0,2410 to -0,1079	Yes	****	<0,0001	B-D		
1 vs. 4	-0,1798	-0,2464 to -0,1132	Yes	****	<0,0001	B-E		
2 vs. 3	-0,1035	-0,1701 to -0,03689	Yes	**	0,0029	C-D		
2 vs. 4	-0,1088	-0,1754 to -0,04224	Yes	**	0,0019	C-E		
3 vs. 4	-0,005350	-0,07194 to 0,06124	No	ns	0,9950	D-E		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
1 vs. 2	0,2133	0,2843	-0,07098	0,02243	4	4	4,475	12
1 vs. 3	0,2133	0,3878	-0,1745	0,02243	4	4	11,00	12
1 vs. 4	0,2133	0,3931	-0,1798	0,02243	4	4	11,34	12
2 vs. 3	0,2843	0,3878	-0,1035	0,02243	4	4	6,525	12
2 vs. 4	0,2843	0,3931	-0,1088	0,02243	4	4	6,862	12
3 vs. 4	0,3878	0,3931	-0,005350	0,02243	4	4	0,3373	12

Tabela A26: Teste para distribuição normal CCK-8 MDA-MB-436

	1h	2h	3h	4h
Test for normal distribution				
D'Agostino & Pearson test				
K2	N too small	N too small	N too small	N too small
P value				
Passed normality test (alpha=0.05)?				
P value summary				
Anderson-Darling test				
A2*	N too small	N too small	N too small	N too small
P value				
Passed normality test (alpha=0.05)?				
P value summary				
Shapiro-Wilk test				
W	0,9869	0,9713	0,9401	0,7065
P value	0,9413	0,8493	0,6552	0,0138
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	No
P value summary	ns	ns	ns	*
Kolmogorov-Smirnov test				
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small
P value				
Passed normality test (alpha=0.05)?				
P value summary				
Number of values	4	4	4	4

Tabela A27: Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis CCK-8 MDA-MB-436

Kruskal-Wallis test	
P value	<0,0001
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	****
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	13,06
Data summary	
Number of treatments (columns)	4
Number of values (total)	16

Tabela A27A – Resultados do teste de comparações múltiplas de Dunn para os tempos de incubação com CCK-8 em células MDA-MB-436, apresentando as diferenças médias de ranks, significância estatística e valores ajustados de p.

Dunn's multiple comparisons test				Adjusted P Value	
	Mean rank diff,	Significant?	Summary		
1 vs. 2	-4,000	No	ns	>0,9999	A-B
1 vs. 3	-9,000	Yes	*	0,0451	A-C
1 vs. 4	-11,00	Yes	**	0,0065	A-D
2 vs. 3	-5,000	No	ns	0,8249	B-C
2 vs. 4	-7,000	No	ns	0,2255	B-D
3 vs. 4	-2,000	No	ns	>0,9999	C-D
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff, n1	n2	Z
1 vs. 2	2,500	6,500	-4,000 4	4	1,188
1 vs. 3	2,500	11,50	-9,000 4	4	2,673
1 vs. 4	2,500	13,50	-11,00 4	4	3,267
2 vs. 3	6,500	11,50	-5,000 4	4	1,485
2 vs. 4	6,500	13,50	-7,000 4	4	2,079
3 vs. 4	11,50	13,50	-2,000 4	4	0,5941

Tabela A28: Teste para distribuição normal CCK-8 SH-SY5Y 1h

	Controle	MPP 0,5mM	MPP 1,0 mM	MPP 1,5 mM	MPP 2,0 mM	H2O2
Test for normal distribution						
D'Agostino & Pearson test						
K2	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Anderson-Darling test						
A2*	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Shapiro-Wilk test						
W	0,9902	0,9320	0,7309	0,9165	0,9060	0,8801
P value	0,9586	0,6062	0,0252	0,5175	0,4615	0,3392
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	*	ns	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test						
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Number of values	4	4	4	4	4	4

Tabela A29: Teste para distribuição normal CCK-8 SH-SY5Y 2h

	Controle	MPP 0,5mM	MPP 1,0 mM	MPP 1,5 mM	MPP 2,0 mM	H2O2
Test for normal distribution						
D'Agostino & Pearson test						
K2	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Anderson-Darling test						
A2*	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Shapiro-Wilk test						
W	0,9041	0,8458	0,8092	0,9870	0,9834	0,9738
P value	0,4518	0,2127	0,1197	0,9417	0,9217	0,8646
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test						
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Number of values	4	4	4	4	4	4

Tabela A30: Teste para distribuição normal CCK-8 SH-SY5Y 3h

	Controle	MPP 0,5mM	MPP 1,0 mM	MPP 1,5 mM	MPP 2,0 mM	H2O2
Test for normal distribution						
D'Agostino & Pearson test						
K2	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Anderson-Darling test						
A2*	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Shapiro-Wilk test						
W	0,9365	0,8929	0,8838	0,9224	0,9702	0,9270
P value	0,6333	0,3969	0,3551	0,5507	0,8428	0,5769
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test						
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Number of values	4	4	4	4	4	4

Tabela A31: Teste para distribuição normal CCK-8 SH-SY5Y 4h

	Controle	MPP 0,5mM	MPP 1,0 mM	MPP 1,5 mM	MPP 2,0 mM	H2O2
Test for normal distribution						
D'Agostino & Pearson test						
K2	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Anderson-Darling test						
A2*	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Shapiro-Wilk test						
W	0,9294	0,7906	0,9223	0,8514	0,8401	0,9928
P value	0,5910	0,0864	0,5498	0,2306	0,1956	0,9712
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test						
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Number of values	4	4	4	4	4	4

Tabela A32: Teste para distribuição normal CCK-8 SH-SY5Y 5h

	Controle	MPP 0,5mM	MPP 1,0 mM	MPP 1,5 mM	MPP 2,0 mM	H2O2
Test for normal distribution						
D'Agostino & Pearson test						
K2	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Anderson-Darling test						
A2*	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Shapiro-Wilk test						
W	0,9162	0,9783	0,9142	0,7801	0,8218	0,9367
P value	0,5158	0,8918	0,5047	0,0710	0,1474	0,6345
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test						
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Number of values	4	4	4	4	4	4

Tabela A33: Teste global de Kruskal-Wallis CCK-8 SH-SY5Y 1h

Kruskal-Wallis test	
P value	0,1760
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. ($P < 0.05$)?	No
Number of groups	6
Kruskal-Wallis statistic	7,660
Data summary	
Number of treatments (columns)	6
Number of values (total)	24

Tabela A34: Teste post hoc de Dunn CCK-8 SH-SY5Y 1h

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	A-?	
Controle vs. MPP 0,5mM	1,250	No	ns	>0,9999	B	MPP 0,5mM
Controle vs. MPP 1,0 mM	5,250	No	ns	>0,9999	C	MPP 1,0 mM
Controle vs. MPP 1,5 mM	2,250	No	ns	>0,9999	D	MPP 1,5 mM
Controle vs. MPP 2,0 mM	6,250	No	ns	>0,9999	E	MPP 2,0 mM
Controle vs. H2O2	12,00	No	ns	0,0820	F	H2O2
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff,	n1	n2	Z
Controle vs. MPP 0,5mM	17,00	15,75	1,250	4	4	0,2500
Controle vs. MPP 1,0 mM	17,00	11,75	5,250	4	4	1,050
Controle vs. MPP 1,5 mM	17,00	14,75	2,250	4	4	0,4500
Controle vs. MPP 2,0 mM	17,00	10,75	6,250	4	4	1,250
Controle vs. H2O2	17,00	5,000	12,00	4	4	2,400

Tabela A35: Teste global de Kruskal-Wallis CCK-8 SH-SY5Y 2h

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0090
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	**
Do the medians vary signif. ($P < 0.05$)?	Yes
Number of groups	6
Kruskal-Wallis statistic	15,33
Data summary	
Number of treatments (columns)	6
Number of values (total)	24

Tabela A36: Teste post hoc de Dunn CCK-8 SH-SY5Y 2h

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	A-?	
Controle vs. MPP 0,5mM	5,750	No	ns	>0,9999	B	MPP 0,5mM
Controle vs. MPP 1,0 mM	5,750	No	ns	>0,9999	C	MPP 1,0 mM
Controle vs. MPP 1,5 mM	12,75	No	ns	0,0539	D	MPP 1,5 mM
Controle vs. MPP 2,0 mM	17,75	Yes	**	0,0019	E	MPP 2,0 mM
Controle vs. H2O2	7,500	No	ns	0,6681	F	H2O2
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff,	n1	n2	Z
Controle vs. MPP 0,5mM	20,75	15,00	5,750	4	4	1,150
Controle vs. MPP 1,0 mM	20,75	15,00	5,750	4	4	1,150
Controle vs. MPP 1,5 mM	20,75	8,000	12,75	4	4	2,550
Controle vs. MPP 2,0 mM	20,75	3,000	17,75	4	4	3,550
Controle vs. H2O2	20,75	13,25	7,500	4	4	1,500

Tabela A37: Teste global de Kruskal-Wallis CCK-8 SH-SY5Y 3h

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0465
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	6
Kruskal-Wallis statistic	11,26
Data summary	
Number of treatments (columns)	6
Number of values (total)	24

Tabela A38: Teste post hoc de Dunn CCK-8 SH-SY5Y 3h

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	A-?	
Controle vs. MPP 0,5mM	1,000	No	ns	>0,9999	B	MPP 0,5mM
Controle vs. MPP 1,0 mM	4,500	No	ns	>0,9999	C	MPP 1,0 mM
Controle vs. MPP 1,5 mM	9,750	No	ns	0,2559	D	MPP 1,5 mM
Controle vs. MPP 2,0 mM	13,50	Yes	*	0,0347	E	MPP 2,0 mM
Controle vs. H2O2	2,750	No	ns	>0,9999	F	H2O2
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff,	n1	n2	Z
Controle vs. MPP 0,5mM	17,75	16,75	1,000	4	4	0,2000
Controle vs. MPP 1,0 mM	17,75	13,25	4,500	4	4	0,9000
Controle vs. MPP 1,5 mM	17,75	8,000	9,750	4	4	1,950
Controle vs. MPP 2,0 mM	17,75	4,250	13,50	4	4	2,700
Controle vs. H2O2	17,75	15,00	2,750	4	4	0,5500

Tabela A39: Teste global de Kruskal-Wallis CCK-8 SH-SY5Y 4h

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0159
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	6
Kruskal-Wallis statistic	13,95
Data summary	
Number of treatments (columns)	6
Number of values (total)	24

Tabela A40: Teste post hoc de Dunn CCK-8 SH-SY5Y 4h

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	A-?	
Controle vs. MPP 0,5mM	3,000	No	ns	>0,9999	B	MPP 0,5mM
Controle vs. MPP 1,0 mM	7,000	No	ns	0,8076	C	MPP 1,0 mM
Controle vs. MPP 1,5 mM	10,75	No	ns	0,1578	D	MPP 1,5 mM
Controle vs. MPP 2,0 mM	15,75	Yes	**	0,0082	E	MPP 2,0 mM
Controle vs. H2O2	2,500	No	ns	>0,9999	F	H2O2
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff,	n1	n2	Z
Controle vs. MPP 0,5mM	19,00	16,00	3,000	4	4	0,6000
Controle vs. MPP 1,0 mM	19,00	12,00	7,000	4	4	1,400
Controle vs. MPP 1,5 mM	19,00	8,250	10,75	4	4	2,150
Controle vs. MPP 2,0 mM	19,00	3,250	15,75	4	4	3,150
Controle vs. H2O2	19,00	16,50	2,500	4	4	0,5000

Tabela A41: Teste global de Kruskal-Wallis CCK-8 SH-SY5Y 5h

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0024
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	6
Kruskal-Wallis statistic	18,52
Data summary	
Number of treatments (columns)	6
Number of values (total)	24

Tabela A42: Teste post hoc de Dunn CCK-8 SH-SY5Y 5h

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	A-?	
Controle vs. MPP 0,5mM	6,250	No	ns	>0,9999	B	MPP 0,5mM
Controle vs. MPP 1,0 mM	8,250	No	ns	0,4947	C	MPP 1,0 mM
Controle vs. MPP 1,5 mM	14,75	Yes	*	0,0159	D	MPP 1,5 mM
Controle vs. MPP 2,0 mM	19,50	Yes	***	0,0005	E	MPP 2,0 mM
Controle vs. H2O2	8,250	No	ns	0,4947	F	H2O2
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff,	n1	n2	Z
Controle vs. MPP 0,5mM	22,00	15,75	6,250	4	4	1,250
Controle vs. MPP 1,0 mM	22,00	13,75	8,250	4	4	1,650
Controle vs. MPP 1,5 mM	22,00	7,250	14,75	4	4	2,950
Controle vs. MPP 2,0 mM	22,00	2,500	19,50	4	4	3,900
Controle vs. H2O2	22,00	13,75	8,250	4	4	1,650

Tabela A43: Teste para distribuição normal CCK-8 SH-SY5Y 3h Grupo 1

	Controle	MPP 0,5mM	MPP 1,0 mM	MPP 1,5 mM	MPP 2,0 mM	H2O2
Test for normal distribution						
D'Agostino & Pearson test						
K2	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Anderson-Darling test						
A2*	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Shapiro-Wilk test						
W	0,9483	0,9436	0,9609	0,9976	0,9576	0,9270
P value	0,7055	0,6762	0,7844	0,9922	0,7638	0,5769
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test						
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Number of values	4	4	4	4	4	4

Tabela A44: Teste para distribuição normal CCK-8 SH-SY5Y 4h Grupo 1

	Controle	MPP 0,5mM	MPP 1,0 mM	MPP 1,5 mM	MPP 2,0 mM	H2O2
Test for normal distribution						
D'Agostino & Pearson test						
K2	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Anderson-Darling test						
A2*	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Shapiro-Wilk test						
W	0,9776	0,9058	0,7369	0,9002	0,9627	0,9928
P value	0,8876	0,4602	0,0289	0,4320	0,7960	0,9712
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	*	ns	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test						
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Number of values	4	4	4	4	4	4

Tabela A45: Teste para distribuição normal CCK-8 SH-SY5Y 5h Grupo 1

	Controle	MPP 0,5mM	MPP 1,0 mM	MPP 1,5 mM	MPP 2,0 mM	H2O2
Test for normal distribution						
D'Agostino & Pearson test						
K2	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Anderson-Darling test						
A2*	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Shapiro-Wilk test						
W	0,8831	0,9270	0,8956	0,9886	0,6835	0,9367
P value	0,3519	0,5770	0,4095	0,9501	0,0073	0,6345
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	**	ns
Kolmogorov-Smirnov test						
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Number of values	4	4	4	4	4	4

Tabela A46: Testes de ANOVA de Brown-Forsythe e de Welch CCK-8 SH-SY5Y 3h Grupo 1

Brown-Forsythe ANOVA test

F* (DFn, DFd)	5,805 (5,000, 14,11)
P value	0,0041
P value summary	**
Significant diff. among means ($P < 0.05$)?	Yes

Welch's ANOVA test

W (DFn, DFd)	6,577 (5,000, 8,351)
P value	0,0092
P value summary	**
Significant diff. among means ($P < 0.05$)?	Yes

Data summary

Number of treatments (columns)	6
Number of values (total)	24

Tabela A47: Teste post-hoc de Tamhane's T2 CCK-8 SH-SY5Y 3h Grupo 1

Tamhane's T2 multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value	A-?
Controle vs. MPP 0,5mM	0,06733	-0,5346 to 0,6692	No	ns	0,9950	B MPP 0,5mM
Controle vs. MPP 1,0 mM	0,1658	-0,2717 to 0,6033	No	ns	0,6630	C MPP 1,0 mM
Controle vs. MPP 1,5 mM	0,3564	-0,02660 to 0,7394	No	ns	0,0671	D MPP 1,5 mM
Controle vs. MPP 2,0 mM	0,5725	0,2295 to 0,9155	Yes	**	0,0042	E MPP 2,0 mM
Controle vs. H2O2	0,1966	-0,1727 to 0,5659	No	ns	0,3924	F H2O2

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	t	DF
Controle vs. MPP 0,5mM	1,544	1,477	0,06733	0,1399	4	4	0,4811	4,409
Controle vs. MPP 1,0 mM	1,544	1,378	0,1658	0,1118	4	4	1,482	5,260
Controle vs. MPP 1,5 mM	1,544	1,188	0,3564	0,1014	4	4	3,516	5,675
Controle vs. MPP 2,0 mM	1,544	0,9715	0,5725	0,09265	4	4	6,180	5,953
Controle vs. H2O2	1,544	1,347	0,1966	0,09854	4	4	1,995	5,781

Tabela A48: Teste global de Kruskal-Wallis CCK-8 SH-SY5Y 4h Grupo 1

Kruskal-Wallis test

P value	0,0018
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	6
Kruskal-Wallis statistic	19,18

Data summary

Number of treatments (columns)	6
Number of values (total)	24

Tabela A49: Teste post hoc de Dunn CCK-8 SH-SY5Y 4h Grupo 1

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	A-?	
Controle vs. MPP 0,5mM	5,000	No	ns	>0,9999	B	MPP 0,5mM
Controle vs. MPP 1,0 mM	10,75	No	ns	0,1578	C	MPP 1,0 mM
Controle vs. MPP 1,5 mM	14,75	Yes	*	0,0159	D	MPP 1,5 mM
Controle vs. MPP 2,0 mM	19,25	Yes	***	0,0006	E	MPP 2,0 mM
Controle vs. H2O2	7,250	No	ns	0,7353	F	H2O2
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff,	n1	n2	Z
Controle vs. MPP 0,5mM	22,00	17,00	5,000	4	4	1,000
Controle vs. MPP 1,0 mM	22,00	11,25	10,75	4	4	2,150
Controle vs. MPP 1,5 mM	22,00	7,250	14,75	4	4	2,950
Controle vs. MPP 2,0 mM	22,00	2,750	19,25	4	4	3,850
Controle vs. H2O2	22,00	14,75	7,250	4	4	1,450

Tabela A50: Teste global de Kruskal-Wallis CCK-8 SH-SY5Y 5h Grupo 1

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0008
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	6
Kruskal-Wallis statistic	21,08
Data summary	
Number of treatments (columns)	6
Number of values (total)	24

Tabela A51: Teste post hoc de Dunn CCK-8 SH-SY5Y 5h Grupo 1

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	A-?	
Controle vs. MPP 0,5mM	4,750	No	ns	>0,9999	B	MPP 0,5mM
Controle vs. MPP 1,0 mM	10,50	No	ns	0,1786	C	MPP 1,0 mM
Controle vs. MPP 1,5 mM	16,25	Yes	**	0,0058	D	MPP 1,5 mM
Controle vs. MPP 2,0 mM	19,75	Yes	***	0,0004	E	MPP 2,0 mM
Controle vs. H2O2	8,750	No	ns	0,4006	F	H2O2
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff,	n1	n2	Z
Controle vs. MPP 0,5mM	22,50	17,75	4,750	4	4	0,9500
Controle vs. MPP 1,0 mM	22,50	12,00	10,50	4	4	2,100
Controle vs. MPP 1,5 mM	22,50	6,250	16,25	4	4	3,250
Controle vs. MPP 2,0 mM	22,50	2,750	19,75	4	4	3,950
Controle vs. H2O2	22,50	13,75	8,750	4	4	1,750

Tabela A52: Teste para distribuição normal CCK-8 SH-SY5Y 3h Grupo 2

	Controle	MPP 0,5mM	MPP 1,0 mM	MPP 1,5 mM	MPP 2,0 mM	H2O2
Test for normal distribution						
D'Agostino & Pearson test						
K2	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Anderson-Darling test						
A2*	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Shapiro-Wilk test						
W	0,9982	0,9119	0,8081	0,8968	0,8961	0,9270
P value	0,9942	0,4924	0,1175	0,4152	0,4120	0,5769
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test						
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Number of values	4	4	4	4	4	4

Tabela A53: Teste para distribuição normal CCK-8 SH-SY5Y 4h Grupo 2

	Controle	MPP 0,5mM	MPP 1,0 mM	MPP 1,5 mM	MPP 2,0 mM	H2O2
Test for normal distribution						
D'Agostino & Pearson test						
K2	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Anderson-Darling test						
A2*	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Shapiro-Wilk test						
W	0,8149	0,8283	0,8927	0,8021	0,8190	0,9928
P value	0,1318	0,1635	0,3955	0,1060	0,1408	0,9712
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test						
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Number of values	4	4	4	4	4	4

Tabela A54: Teste para distribuição normal CCK-8 SH-SY5Y 5h Grupo 2

	Controle	MPP 0,5mM	MPP 1,0 mM	MPP 1,5 mM	MPP 2,0 mM	H2O2
Test for normal distribution						
D'Agostino & Pearson test						
K2	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Anderson-Darling test						
A2*	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Shapiro-Wilk test						
W	0,9044	0,9603	0,9417	0,9979	0,9717	0,9367
P value	0,4535	0,7806	0,6649	0,9933	0,8519	0,6345
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test						
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value						
Passed normality test (alpha=0.05)?						
P value summary						
Number of values	4	4	4	4	4	4

Tabela A55: Testes de ANOVA de Brown-Forsythe e de Welch CCK-8 SH-SY5Y 3h Grupo 2

Brown-Forsythe ANOVA test

F* (DFn, DFd)	15,87 (5,000, 9,126)
P value	0,0003
P value summary	***
Significant diff. among means ($P < 0.05$)?	Yes

Welch's ANOVA test

W (DFn, DFd)	95,45 (5,000, 7,805)
P value	<0,0001
P value summary	****
Significant diff. among means ($P < 0.05$)?	Yes

Data summary

Number of treatments (columns)	6
Number of values (total)	24

Tabela A56: Teste post-hoc de Tamhane's T2 CCK-8 SH-SY5Y 3h Grupo 2

Tamhane's T2 multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value	A-?	
Controle vs. MPP 0,5mM	0,1614	-0,6046 to 0,9273	No	ns	0,8532	B	MPP 0,5mM
Controle vs. MPP 1,0 mM	0,5379	0,06018 to 1,016	Yes	*	0,0353	C	MPP 1,0 mM
Controle vs. MPP 1,5 mM	0,6373	0,3054 to 0,9692	Yes	**	0,0061	D	MPP 1,5 mM
Controle vs. MPP 2,0 mM	0,7929	0,6598 to 0,9261	Yes	****	<0,0001	E	MPP 2,0 mM
Controle vs. H2O2	0,2084	-0,2064 to 0,6233	No	ns	0,2984	F	H2O2

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	t	DF
Controle vs. MPP 0,5mM	1,556	1,395	0,1614	0,1361	4	4	1,186	3,093
Controle vs. MPP 1,0 mM	1,556	1,018	0,5379	0,08822	4	4	6,097	3,227
Controle vs. MPP 1,5 mM	1,556	0,9186	0,6373	0,06468	4	4	9,853	3,434
Controle vs. MPP 2,0 mM	1,556	0,7629	0,7929	0,03284	4	4	24,14	4,901
Controle vs. H2O2	1,556	1,347	0,2084	0,07800	4	4	2,672	3,293

Tabela A57: Testes de ANOVA de Brown-Forsythe e de Welch CCK-8 SH-SY5Y 4h Grupo 2

Brown-Forsythe ANOVA test	
F* (DFn, DFd)	25,09 (5,000, 3,664)
P value	0,0057
P value summary	**
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
Welch's ANOVA test	
W (DFn, DFd)	161,3 (5,000, 8,215)
P value	<0,0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
Data summary	
Number of treatments (columns)	6
Number of values (total)	24

Tabela A58: Teste post-hoc de Tamhane's T2 CCK-8 SH-SY5Y 4h Grupo 2

Tamhane's T2 multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value	A-?
Controle vs. MPP 0,5mM	0,2746	0,1050 to 0,4442	Yes	**	0,0056	B MPP 0,5mM
Controle vs. MPP 1,0 mM	0,7181	0,5486 to 0,8875	Yes	****	<0,0001	C MPP 1,0 mM
Controle vs. MPP 1,5 mM	0,8783	0,7057 to 1,051	Yes	****	<0,0001	D MPP 1,5 mM
Controle vs. MPP 2,0 mM	1,032	0,8588 to 1,204	Yes	****	<0,0001	E MPP 2,0 mM
Controle vs. H2O2	0,2788	-0,7603 to 1,318	No	ns	0,7385	F H2O2

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	t	DF
Controle vs. MPP 0,5mM	1,917	1,642	0,2746	0,04429	4	4	6,200	5,509
Controle vs. MPP 1,0 mM	1,917	1,199	0,7181	0,04418	4	4	16,25	5,489
Controle vs. MPP 1,5 mM	1,917	1,039	0,8783	0,04599	4	4	19,10	5,760
Controle vs. MPP 2,0 mM	1,917	0,8852	1,032	0,03951	4	4	26,11	4,289
Controle vs. H2O2	1,917	1,638	0,2788	0,1913	4	4	1,457	3,216

Tabela A59: Testes de ANOVA de Brown-Forsythe e de Welch CCK-8 SH-SY5Y 5h Grupo 2

Brown-Forsythe ANOVA test	
F* (DFn, DFd)	47,62 (5,000, 5,326)
P value	0,0002
P value summary	***
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
Welch's ANOVA test	
W (DFn, DFd)	210,3 (5,000, 8,240)
P value	<0,0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
Data summary	
Number of treatments (columns)	6
Number of values (total)	24

Tabela A60: Teste post-hoc de Tamhane's T2 CCK-8 SH-SY5Y 5h Grupo 2

Tamhane's T2 multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value	A-?	
Controle vs. MPP 0,5mM	0,3604	0,1180 to 0,6027	Yes	*	0,0104	B	MPP 0,5mM
Controle vs. MPP 1,0 mM	0,8214	0,5792 to 1,064	Yes	***	0,0003	C	MPP 1,0 mM
Controle vs. MPP 1,5 mM	1,048	0,9082 to 1,189	Yes	****	<0,0001	D	MPP 1,5 mM
Controle vs. MPP 2,0 mM	1,281	1,144 to 1,418	Yes	****	<0,0001	E	MPP 2,0 mM
Controle vs. H2O2	0,5616	-0,2272 to 1,350	No	ns	0,1279	F	H2O2
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	t DF
Controle vs. MPP 0,5mM	2,275	1,915	0,3604	0,05762	4	4	6,255 4,580
Controle vs. MPP 1,0 mM	2,275	1,454	0,8214	0,05758	4	4	14,26 4,581
Controle vs. MPP 1,5 mM	2,275	1,227	1,048	0,03799	4	4	27,59 5,998
Controle vs. MPP 2,0 mM	2,275	0,9942	1,281	0,03709	4	4	34,54 5,971
Controle vs. H2O2	2,275	1,714	0,5616	0,1452	4	4	3,866 3,216

Tabela A61: Teste para distribuição normal RTqPCR

	MPP+	Controle
Test for normal distribution		
D'Agostino & Pearson test		
K2	N too small	N too small
P value		
Passed normality test (alpha=0.05)?		
P value summary		
Anderson-Darling test		
A2*	N too small	N too small
P value		
Passed normality test (alpha=0.05)?		
P value summary		
Shapiro-Wilk test		
W	0,8474	0,8573
P value	0,1500	0,1800
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test		
KS distance	0,2665	0,2910
P value	>0,1000	>0,1000
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns
Number of values	6	6

Tabela A62: Teste t de Student não pareado com correção de Welch RTqPCR

Column B	Controle
vs.	vs,
Column A	MPP+
Unpaired t test with Welch's correction	
P value	0,0493
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Welch-corrected t, df	t=2,428, df=6,314
How big is the difference?	
Mean of column A	1,448
Mean of column B	0,8779
Difference between means (B - A) $\pm$ SEM	-0,5699 $\pm$ 0,2348
95% confidence interval	-1,138 to -0,002313
R squared (eta squared)	0,4828
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	7,477, 5, 5
P value	0,0455
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
Data analyzed	
Sample size, column A	6
Sample size, column B	6