



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

Modulação da Expressão e da Síntese de Actina por Citrato de Ródio II em Células de Câncer Mamário

DAISY DAYANE PEREIRA ALBERNAZ

Orientadora: Prof^a. Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro

Brasília-DF

2019

DAISY DAYANE PEREIRA ALBERNAZ

Modulação da Expressão e da Síntese de Actina por Citrato de Ródio II em Células de Câncer Mamário

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro

Brasília

2019

Dedico este trabalho a minha amada família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me guiar.

Agradeço à minha família, pelo apoio incondicional que sempre me deram. À minha madrasta Onilda, por ser um exemplo, por sempre me incentivar e encorajar. Ao meu pai, Eder, por sempre vibrar com as minhas vitórias, por todo amor e conselhos. Aos meus irmãos por todo carinho e conversas de incentivos.

À prof. Dra. Marcella Lemos pela orientação, oportunidade e confiança. Pela oportunidade de trilhar a minha vida acadêmica, por todas as palavras de incentivo e apoio.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e seus integrantes por terem me acolhido e ajudado nessa trajetória. Em especial a Yasmin, Ingrid, Ana Luisa, Natália, Diogo, Nihi, Melissa, Eloisio, Lais, Barbara, Stefanny, Thamís, Karen, Wellington, pela amizade, conselhos, risadas e incentivo de todos. Em especial a Bruna Guido pelo carinho, por todos os momentos de incentivo, pela ajuda nos experimentos. À Márcia pelas ideias e discussões, além da sua grande ajuda no Western Blot.

A todos do laboratório de Tecnologia para Terapia Gênica. Em especial à Fran, por toda a ajuda, prestatividade, amizade. Obrigada por sempre ter conselhos e me acompanhar nos ensaios que requeriam presteza e atenção a todo momento. Agradeço também ao Professor Ricardo Titze por toda colaboração, discussão e análise dos resultados de RT-qPCR.

Agradeço a professora Isabel pelas dicas e ajuda na parte estatística.

Aos professores do Bloco K Térreo e aos respectivos grupos de pesquisa, pela colaboração e prestatividade.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPDF pela viabilização do trabalho.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estimativa número de novos casos para o ano de 2018 das taxas brutas de incidência a cada 100 mil habitantes e segundo sexo e localização primária*.....	12
Figura 2: Estrutura do tecido mamário normal.....	13
Figura 3: Carcinoma ductal in situ (DCIS)	14
Figura 4: Carcinoma lobular in situ (DLIS)	15
Figura 5: Características comuns de células cancerosas.....	17
Figura 6: Linhagem de mama não tumoral MCF10A.....	18
Figura 7: Linhagem de mama tumoral MDA-MB-231.....	18
Figura 8: Estrutura química de carboxilato de ródio.....	22
Figura 9: Estrutura química do Citrato de ródio (II)	22
Figura 10. Expressão relativa de β -actina avaliada pelo método de qPCR (PCR qualitativa em tempo real) em células tumorais da linhagem MDA-MB-231.....	38
Figura 11. Expressão relativa de β -actina avaliada pelo método de qPCR em tempo real em células epiteliais de mama saudáveis da linhagem MCF-10A.....	39
Figura 12: Síntese de β -actina (42 KDa) na linhagem MDA-MB-231.....	41
Figura 13: Expressão proteica de β -actina (42 KDa) na linhagem MCF-10A.....	42
Figura 14: Distribuição estrutural de β -actina na membrana de células da linhagem MDA-MB-231.....	44
Figura 15: Distribuição e marcação de β -actina na membrana celular MCF10A.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS - American Cancer Society
AOF - *animal origin free*
BCA - Bicinchoninic Acid Protein Assay
BSA - Albumina sérica bovina
CDIS - Carcinoma ductal in situ
cDNA - DNA complementar
CLIS - Carcinoma lobular in situ
CR - Citrato de Ródio Livre (II)
DAPI - 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
DMEM/F-12 - *Dulbecos's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture Ham's F-12*
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido desoxirribonucleico
ECL – enhanced luminol-based chemiluminescent substrate
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético bipotássico
EFG - fator de crescimento epidermal humano
ER - Receptores de estrógeno
ERB-B2 – Receptor tirosina-quinase 2
INCA - Instituto Nacional do Câncer
MC - Nanopartículas de maghemita
MCF-10A - Linhagem de células epiteliais da mama humana
MDA-MB-231 - Carcinoma mamário humano
MRC - Nanopartículas de maghemita associadas ao citrato de ródio (II)
NMs - Nanopartículas magnéticas
NPs – Nanopartículas
PBS - Tampão fosfato salino
PR – Receptores de Progesterona
PTX - Paclitaxel
Rh₂(O₂CR)₄ - Carboxilatos de ródio (II)
RT-qPCR – Transcrição reversa qualitativos de PCR em tempo real
SFB - Soro fetal bovino
SFE - Soro fetal equino
WB - Western Blot

RESUMO

O câncer de mama é um dos mais frequentes no mundo e o que mais acomete o sexo feminino. A busca por novos alvos terapêuticos se faz necessária. Assim, recursos obtidos por meio da nanotecnologia têm se tornado promissores visto que apresentam potencial para solucionar algumas limitações da terapia convencional como toxicidade sistêmica. O Citrato de ródio (CR) é um complexo metálico que apresentou significativa atividade citotóxica, citostática e antitumoral em células de carcinoma mamário humano. O tratamento destas células com a formulação em que CR é associado a nanopartícula de maghemita (MRC) resultou na redução da toxicidade no organismo e aumentou a especificidade ao tecido alvo. O estudo de expressão gênica pode revelar se está havendo inibição ou superexpressão de genes específicos relacionados a metástase e apoptose. A actina é uma proteína presente no citoesqueleto que desempenha funções relevantes na manutenção da morfologia, mitose, e aumento da sensibilidade celular à indução de apoptose. Neste estudo foi avaliada a modulação gênica e síntese de actina em células de adenocarcinoma mamário tratadas com CR e MRC com o objetivo de se conhecer a biologia tumoral destas células, em relação ao seu perfil de produção de actina, para propor futuras intervenções biotecnológicas direcionadas à terapia do câncer de mama. A modulação da expressão gênica e da síntese de β actina mediada por CR e MRC, na dose de 250 μ M por 48 h, em células da linhagem de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231 e em linhagem saudável MCF-10A, foram avaliadas por meio de RT-qPCR, *western blot* e imunomarcacão por microscopia de fluorescência. Em células MDA-MB-231 observou-se redução na expressão de β actina de 0,7 e 0,5 nos tratamentos com CR e MRC, respectivamente. Observou-se também redução na síntese de β actina após tratamento com MRC. Estes efeitos foram associados a redução na viabilidade celular e a alterações morfológicas e estruturais no citoesqueleto de actina e núcleo celular. Contudo, em células epiteliais de origem normal, MCF-10A, não houve alteração na modulação gênica e/ou proteica de actina. Portanto, a actina pode ser um importante alvo para terapêutica de câncer de mama metastático mediada por CR e MRC.

Palavras-chaves: adenocarcinoma mamário; citrato de ródio; actina; expressão gênica; nanopartículas de maghemita, síntese proteica.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most frequent in the world and the one that most affects the female sex. The search for new therapeutic targets is necessary. Thus, resources obtained through nanotechnology have become promising since they present the potential to solve some limitations of conventional therapy as systemic toxicity. Rhodium citrate (CR) is a metal complex that showed significant cytotoxic, cytostatic and antitumor activity in human mammary carcinoma cells. Treatment of these cells with the formulation in which CR is associated with magnetite nanoparticle (MRC) resulted in reduction of toxicity in the organism and increased specificity to the target tissue. The study of gene expression may reveal whether there is any inhibition or overexpression of specific genes related to metastasis and apoptosis. Actin is a protein present in the cytoskeleton that plays important roles in maintaining morphology, mitosis, and increasing cellular sensitivity to induction of apoptosis. In this study, the gene modulation and actin synthesis in mammary adenocarcinoma cells treated with CR and MRC were evaluated in order to know the tumor biology of these cells, in relation to their actin production profile, to propose future biotechnological interventions directed to breast cancer therapy. Modulation of CR and MRC-mediated gene expression and synthesis of β -actin at a dose of 250 μ M for 48 h in MDA-MB-231 mammary adenocarcinoma cell line and healthy MCF-10A lineage were evaluated by RT-qPCR, western blot and immunoblotting by fluorescence microscopy. In MDA-MB-231 cells a decrease in β -actin expression of 0.7 and 0.5 was observed in the CR and MRC treatment, respectively. A reduction in the synthesis of β -actin was also observed after treatment with MRC. These effects were associated with reduced cell viability and morphological and structural changes in the actin cytoskeleton and cell nucleus. However, in normal epithelial cells, MCF-10A, there was no change in the gene and / or protein modulation of actin. Therefore, actin may be an important target for CR and MRC-mediated metastatic breast cancer therapy.

Key-words: breast adenocarcinoma; rhodium citrate; actin; gene expression; nanoparticles of maghemite, protein synthesis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1. Câncer.....	11
1.2. Câncer de Mama.....	12
1.3. Linhagens utilizadas como modelo experimental.....	17
1.4. Tratamentos empregados para o câncer de mama e suas limitações.....	19
1.5. Complexo de ródio.....	20
1.6. Nanotecnologia.....	22
1.6.1. Nanopartículas magnéticas.....	23
1.7. Citoesqueleto celular.....	24
1.8. Expressão gênica.....	25
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo geral.....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Condições de cultura celular.....	30
4.2. Tratamento das células.....	31
4.3. PCR em tempo real.....	31
4.3.1. Extração e quantificação de RNA total.....	31
4.3.2. Transcrição reversa (RT) para síntese do DNA complementar (cDNA).....	32
4.3.3. Amplificação e quantificação de β -actina por PCR.....	33
4.4. Western Blot (WB)	34
4.4.1. Extração e quantificação de proteínas.....	34
4.4.2. Gel SDS-PAGE e Western Blot.....	34
4.5. Ensaio de Imunomarcção de β -actina por microscopia de fluorescência.....	35
4.6. Análise estatística.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. Análise da expressão relativa de β -actina induzida por Citrato de Ródio livre associado a Nanopartículas de Maghemita.....	37
5.2. Síntese da proteína β -actina.....	40
5.3. Imunomarcção de β -actina.....	42
CONCLUSÃO	46

PERSPECTIVAS.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

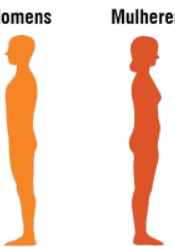
O câncer é um nome genérico dado a um conjunto de centenas de doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células. O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese ou oncogênese e surge a partir de alterações genéticas que podem gerar crescimento celular anormal. Esse crescimento desordenado de células transformadas pode invadir tecidos e órgãos e passa a ser denominado de tumor (ALMEIDA et al., 2005; INCA, 2018). Assim, o processo de carcinogênese ocorre lentamente e em três estágios sendo eles: (1) iniciação em que o agente carcinógeno, o *oncoiniciador*, induz mudanças na proliferação e na diferenciação celular; (2) promoção em que *oncopromotores* conduzem a transformação maligna e (3) progressão em que ocorre quando as células cancerosas já se multiplicaram descontroladamente levando a perda da função do tecido (ALMEIDA et al., 2005). O maior desafio para a terapêutica do câncer se deve pelo fato de células tumorais possuírem capacidade de migrar para tecidos adjacentes e se estabelecer em novos órgãos, processo denominado metástase (HANAHAN & WEINBERG, 2011; CAIRNS & MAK, 2016).

Diversas são as causas que originam o câncer podendo ser por desordens fisiológicas relacionadas a anomalias na expressão gênica das células e na resposta das células à estímulos internos ou externos ao organismo. Os fatores internos estão relacionados com os mecanismos epigenéticos, predisposição genética, desarranjos hormonais e fatores relacionados à imunidade (ALMEIDA et al., 2005; FLAVAHAN et al., 2016; YU et al., 2016). Os fatores externos são relacionados com o comportamento individual tais como sedentarismo, tabagismo, alcoolismo ou ainda exposição à agentes mutagênicos tais como radiação ultravioleta e exposição a compostos químicos ou vírus (HANAHAN & WEINBERG, 2011; LAUBY-SECRETAN et al., 2016).

Atualmente o câncer é uma das principais causas de morte no mundo e foram estimados para o ano de 2018 mais de 17 milhões de novos casos, excluindo o câncer de pele não melanoma e 9,6 milhões de mortes (BRAY et al., 2018). Aproximadamente 70% das mortes por câncer ocorrem em países em desenvolvimento. No Brasil, estima-se 600 mil novos casos de câncer para os anos de 2018 e 2019 (PLUMMER et al., 2016).

Estimativas apresentadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) indicam maior aumento de novos casos de câncer de mama em mulheres (**Figura 1**). O câncer de

mama é um dos principais carcinomas com maior prevalência no Brasil sendo a estimativa para o biênio 2018-2019 de 59.700 novos casos representando 29,5% dos novos casos a cada ano (INCA, 2018). Como fatores relacionados ao aumento da incidência desta doença destaca-se o envelhecimento da população assim com a ocorrência de fatores de riscos tais como tabagismo, excesso de peso, sedentarismo, consumo de alimentos industrializados, dentre outros (ELLISON et al., 2017; HEITZ et al., 2018).

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Homens Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Côlon e Reto	18.980	9,4%
Côlon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Número arredondado para múltiplos de 10.

Figura 1: Estimativa do número de novos casos para o ano de 2018 das taxas brutas de incidência a cada 100 mil habitantes e segundo sexo e localização primária*. Fonte: INCA, 2018.

1.2. Câncer de Mama

Para compreender melhor a origem e progressão do câncer de mama é necessário entender a organização da estrutura e o tecido glandular da mama normal. A mama humana é composta por um complexo de ductos ramificados a partir do mamilo, lóbulos e estroma (**Figura 2**). As glândulas mamárias se desenvolvem na puberdade feminina onde os ductos se ramificam e são responsáveis pelo transporte de leite advindo dos lóbulos aos mamilos. Os lóbulos representam a porção secretória da glândula enquanto o estroma consiste em tecidos adiposo e conjuntivo circundantes aos ductos, lóbulos, vasos sanguíneos e linfáticos (SCHIMITT & GOBBI, 2017; ACS, 2017).

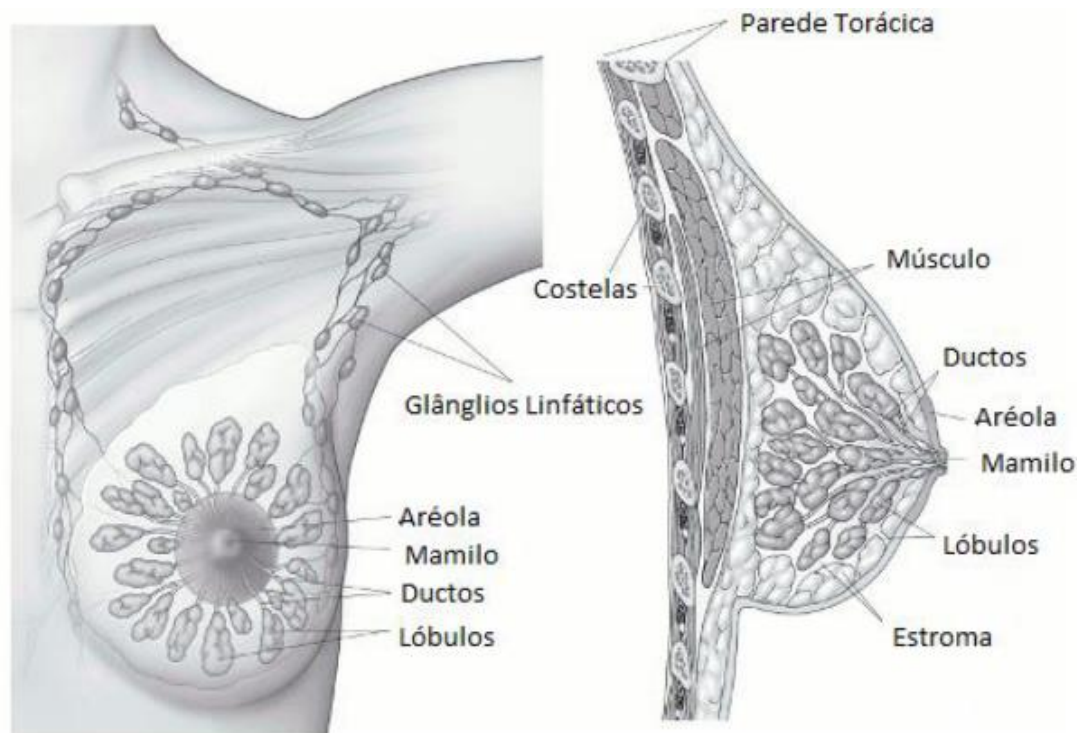


Figura 2: Estrutura do tecido mamário normal. A glândula mamária é formada por ductos, lóbulos e estroma circundados por tecido adiposo e de suporte. Fonte: Adaptado de <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>

Os lóbulos e ductos da glândula mamária são revestidos por células epiteliais, ambos apoiados em uma lâmina basal. Os lóbulos são revestidos por células luminiais que compõem a camada mais interna da glândula mamária e possuem a capacidade de secreção e de absorção de fluidos. Estas células expressam citoqueratinas, proteínas relacionadas ao leite e receptores para o estrogênio. Os ductos são revestidos por células mioepiteliais que formam a camada mais externa da glândula mamária (CICHON et al., 2010; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

No decorrer da vida feminina as células da mama sofrem alterações. Desta forma, é normal as glândulas mamárias passarem por alterações anatômicas e fisiológicas. Essas alterações podem causar um crescimento excessivo das células dos ductos e dos lóbulos, chamadas de hiperplasia e isto pode ocorrer em mulheres em todas as idades. Quando a hiperplasia ocorre nos ductos, ela é denominada de hiperplasia ductal e caso aconteça nos lóbulos, é chamada de hiperplasia lobular. Existem hiperplasias típicas e atípicas. As hiperplasias típicas abrangem alterações benignas das mamas enquanto que as atípicas, apesar de também serem benignas, indicam que as células estão se desenvolvendo de forma anormal e isto aumenta o risco do desenvolvimento de um carcinoma mamário.

Nas **figuras 3 e 4** estão representadas estruturas de ductos e lóbulos normais e anormais (ACS, 2017; SINGLETARY, 2003).

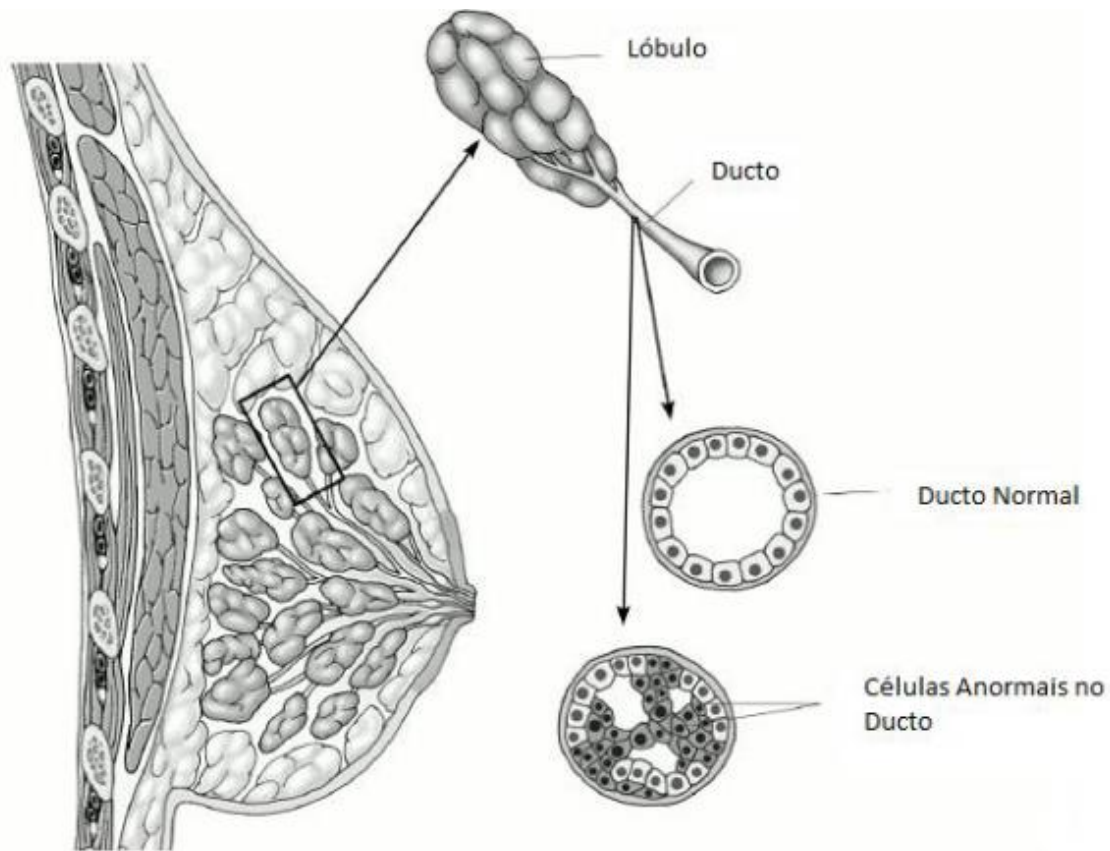


Figura 3: Carcinoma ductal *in situ* (DCIS). As células que revestem os ductos sofreram alterações e se tornaram células cancerosas. Fonte: Adaptado de American Cancer Society, 2017.

O câncer de mama é uma doença heterogênea que pode ser classificada em subtipos distintos com base nos padrões de expressão de genes ou marcadores tumorais. Neste contexto, existem vários tipos de câncer de mama e estes são denominados de acordo com o nome do tecido de onde se originam. Assim, a maioria dos cânceres de mama são denominados carcinomas por terem origem no epitélio (ACS, 2017, ALMEIDA *et al.*, 2005).

Os carcinomas mamários mais comuns são classificados em carcinoma ductal *in situ* (CDIS) (**Figura 3**) e o carcinoma lobular *in situ* (CLIS) (**Figura 4**). Estes carcinomas podem apresentar alterações genéticas e na expressão de genes que regulam funções essenciais como proliferação, morte e diferenciação celular. A célula que sofre mutação pode adquirir vantagem seletiva e passar por uma expansão clonal. Desse modo, cada uma das células-filhas tem potencial de adquirir novas alterações moleculares. Assim, os

sucessivos eventos de alterações moleculares, seleções e expansões clonais levam a um acúmulo de modificações genéticas e epigenéticas, induzindo a progressão do tumor (AXELROD *et al.*, 2006).

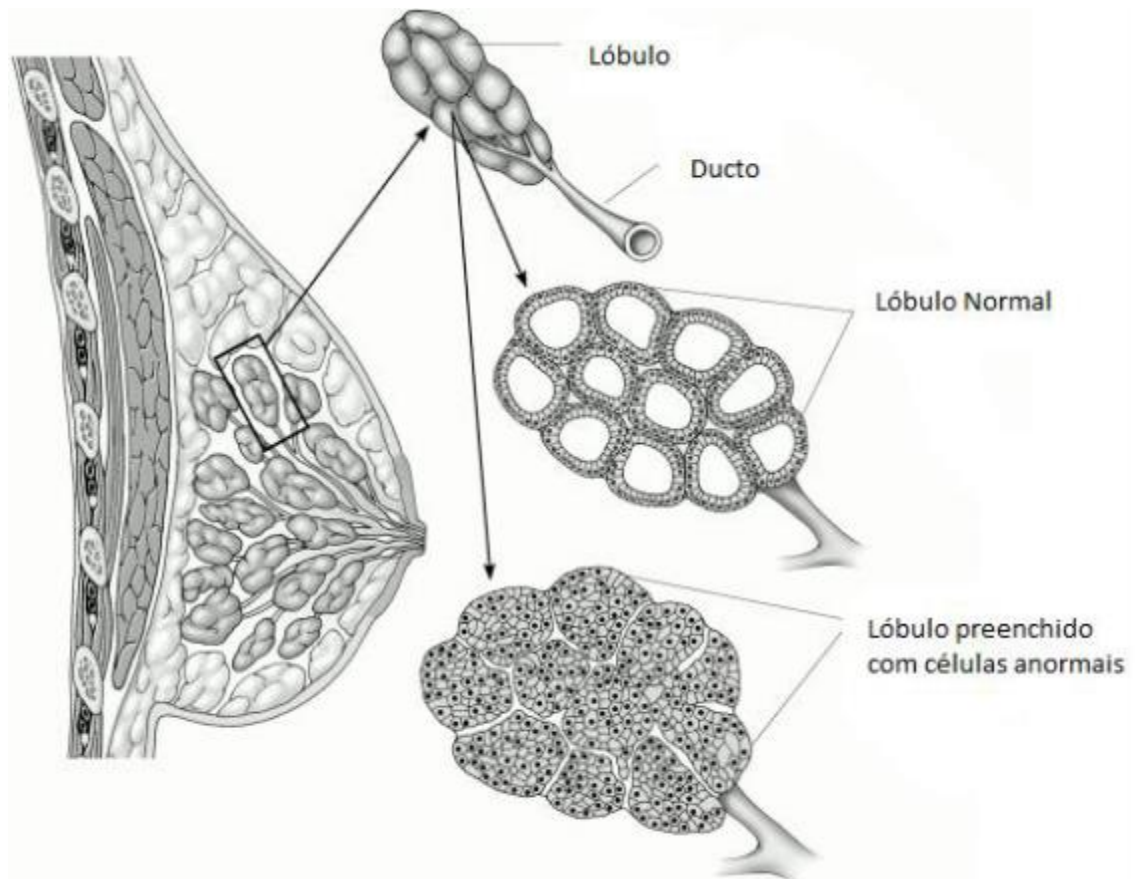


Figura 4: Carcinoma lobular *in situ* (DLIS). As células que revestem os lóbulos sofreram alguma alteração e se tornaram células cancerosas. Fonte: Adaptado de American Cancer Society, 2017.

Os carcinomas mamários podem ainda ser chamados de adenocarcinoma quando, além de apresentar alterações nas células epiteliais dos ductos, também apresentam alterações no padrão de crescimento glandular. A maioria dos cânceres de mama é classificada em adenocarcinoma (ROBBINS & COTRAN, 2005). Existem, ainda, os carcinosarcomas, denominados de tumores mistos malignos. Este tumor é composto por células semelhantes aos componentes epiteliais (luminais ou mioepiteliais) e mesenquimais. O tumor de origem epitelial é potencialmente metastático pois as células se disseminam pelos vasos linfáticos e sanguíneos para os linfonodos regionais e pulmões. Já aqueles de origem mesenquimal o fazem via hematogena para os pulmões (TEIXEIRA *et al.*, 1998; GOLDBIRSCHE *et al.*, 2011).

A capacidade de espalhar ou invadir o tecido circundante define o tipo invasivo ou metastático do carcinoma mamário. Deste modo, o deslocamento das células cancerosas para outros tecidos além daqueles originais depende do seu potencial metastático e do seu nível de invasibilidade. Geralmente as células cancerosas se movem através da corrente sanguínea ou por meio do sistema linfático para os ossos, pulmões, cérebro e fígado. Os tecidos e órgão perdem as suas funções conforme as células cancerosas vão substituindo as células normais “anfitriãs” (INCA, 2018).

Existem três principais biomarcadores que definem o potencial de desenvolvimento e invasibilidade do câncer de mama: receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) e o promotor de crescimento HER2. O resultado (positivo ou negativo) do teste para essas proteínas são fundamentais para a decisão do tratamento mais promissor para a doença. Usualmente, tumores testados como triplo-positivos são tratados com drogas hormonais e drogas que possuem como alvo o promotor de crescimento HER2. Já o câncer de mama diagnosticado como triplo-negativo não depende dessas proteínas para sua proliferação. Logo, os tratamentos baseados em hormonioterapia e em quimioterapia, que tem como alvo o HER2, não são eficazes. O subtipo de câncer de mama triplo-negativo prolifera e se espalha mais rapidamente do que a maioria dos outros subtipos (DUFFY et al., 2017; MARTINS et al., 2017).

As células cancerosas apresentam características específicas ao final do processo de evolução tumoral tais como: 1) sustentação da proliferação celular, 2) evasão de supressores de crescimento, 3) resistência à morte celular, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) indução da angiogênese, 6) invasão tecidual e metástase, 7) evasão do sistema imune, 8) desregulação do metabolismo energético da célula, 9) inflamação, 10) instabilidade genômica e mutação (HANAHAN & WEINBERG, 2011) (**Figura 5**).

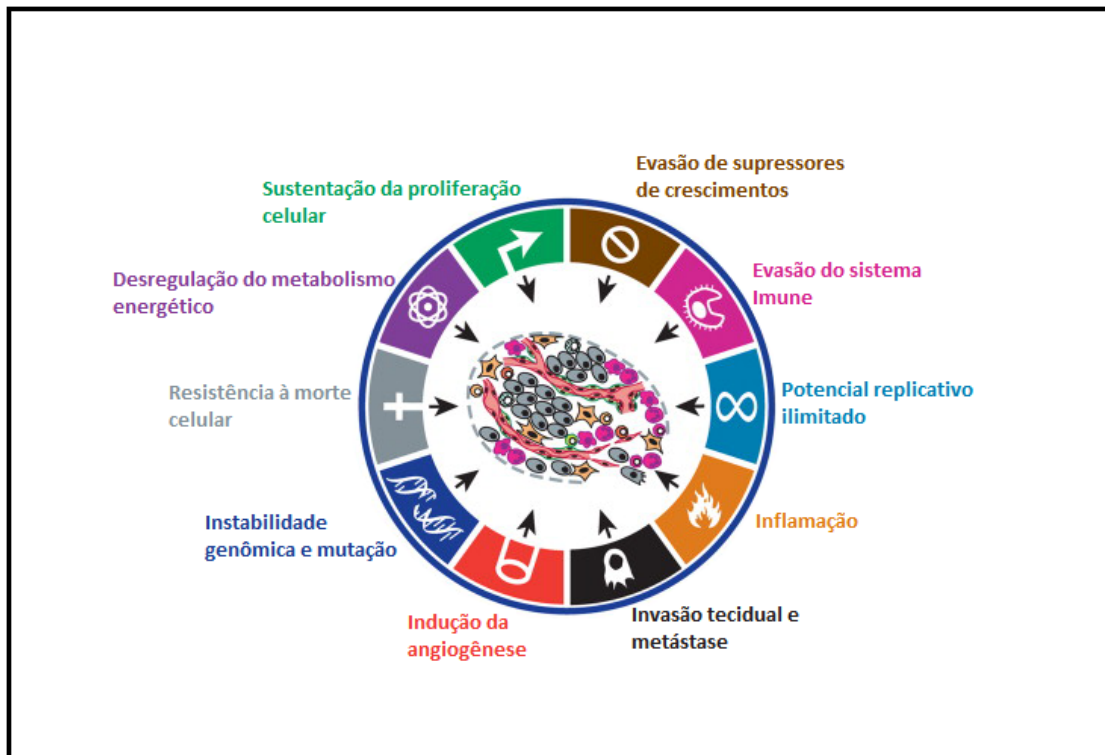


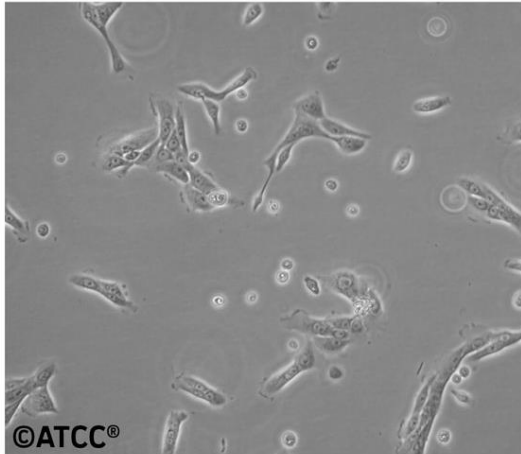
Figura 5: Características comuns de células cancerosas. Fonte: adaptação de HANAHAN & WEINBERG, 2011.

1.3. Linhagens utilizadas como modelo experimental

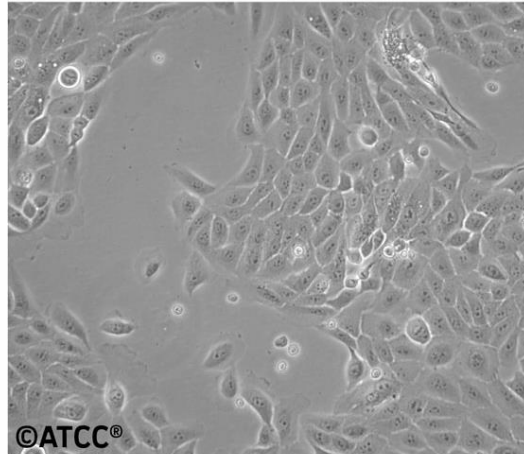
Linhagens de células humanas são modelos experimentais simplificados e informativos para pesquisas com diferentes finalidades. Neste trabalho avaliamos duas linhagens de mama. As células MCF-10A (**Figura 6**) pertencem a linhagem de células imortalizadas e não tumorigênicas, portanto saudáveis. Esta linhagem é considerada epitelial mamária não maligna apresentando características normais. Por isso, esta linhagem é largamente usada em estudos *in vitro* devido a possibilidade de caracterização de importantes eventos associados a morfogênese e alterações fenotípicas (SOULE et al., 1990).

A linhagem de mama triplo negativa - MDA-MB-231 (**Figura 7**) – origina-se de um adenocarcinoma. Esta linhagem deriva de um sítio metastático e não é responsiva a estrógeno (*American Type Culture Collection-ATCC*). A células MDA-MB-231 são bastante utilizadas em pesquisas científicas uma vez que possuem alterações nos padrões morfológicos e na expressão gênica representando assim, um modelo experimental.

Designation: **MCF-10A**



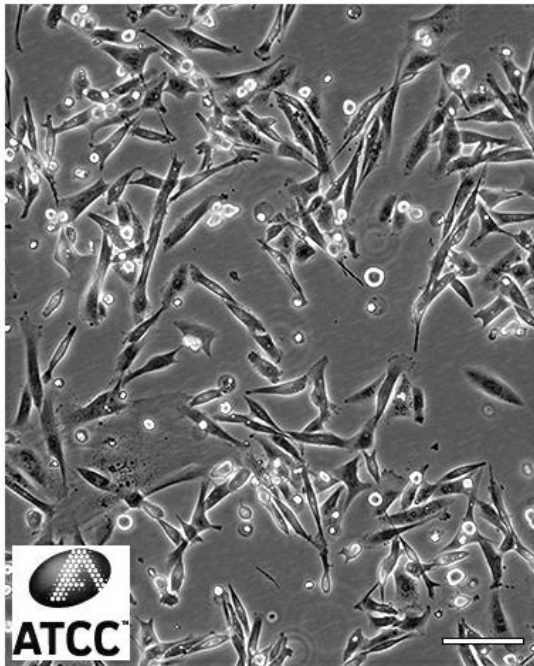
Low Density



High Density

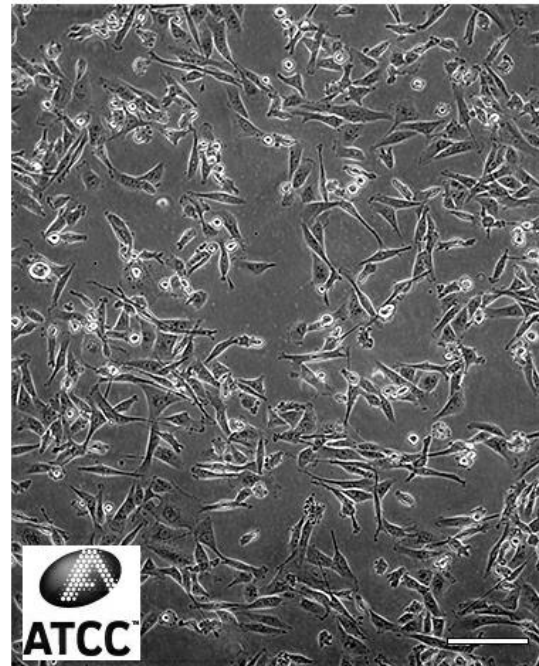
Figura 6: Linhagem de mama não tumoral MCF10A. Fonte: <https://www.atcc.org/~media/Attachments/Micrographs/Cell/CRL-10317%20Low%20High.ashx>.

Designation: **MDA-MB-231**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Figura 7: Linhagem de mama tumoral MDA-MB-231. Fonte: <https://www.atcc.org/~media/Attachments/Micrographs/Cell/HTB-26.ashx>

1.4. Tratamentos empregados para o câncer de mama e suas limitações

O tratamento para o câncer depende de algumas variáveis tais como o tipo, a localização, nível de estadiamento da doença no organismo além da condição de saúde e idade do paciente (BERGMANN et al., 2000). Geralmente, as estratégias terapêuticas de abrangência sistêmica consistem em quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia e os tratamentos loco-regionais envolvem o emprego de cirurgias e radioterapia (ACS, 2017).

Em estágios iniciais do câncer, onde somente a mama ou, ainda, em alguns casos mulheres com nódulo-positivo a cirurgia é um tratamento muito utilizado e normalmente se faz necessária associar terapia adjuvante como radioterapia a fim de prevenir recorrência (CTSU, 2005). No caso de metástase, as células neoplásicas estão dispersas no organismo o que o torna muitas vezes inacessíveis por cirurgia. Assim, o tratamento por quimioterapia é o mais utilizado e a administração do medicamento é realizada por via intravenosa a fim de promover o controle e a inibição da proliferação das células cancerosas. Porém, esse tratamento é bastante invasivo pois atua tanto em células normais como em células tumorais (OLIVEIRA & ALVES, 2002).

A radioterapia é empregada quando restam alguns resquícios de células tumorais, antes e/ou após a cirurgia ou quando a região cancerosa é inviável para realização da cirurgia. Esta terapia provoca alterações no material genético no intuito de impedir a proliferação celular. Esta terapia induz a ionização de substâncias em meio biológico por meio da remoção de elétrons formando espécies reativas de oxigênio que reagem com outras biomoléculas e ocasionam desordem celular em células dos tecidos circunvizinhos também. A radioterapia é bastante empregada na clínica sendo que aproximadamente de 70 a 83% de pacientes com câncer de mama passam por esse tipo de tratamento (BOYLE & LEVIN, 2008; GRAMINHA, 2010).

A hormonioterapia é um tratamento utilizado quando os tumores apresentam determinada expressão de receptores hormonais e consiste no uso de substâncias semelhantes ou supressoras de hormônios para inibir o crescimento do tumor. O tratamento é de longa duração e induz efeitos adversos como a supressão dos hormônios femininos (BARROS et al., 2001; BRITO, 2014).

Já a quimioterapia é utilizada em caso de doença sistêmica e a grande limitação do seu uso resulta dos efeitos adversos ocasionados pela baixa especificidade dos quimioterápicos, uma vez que estes agem tanto nas células tumorais quanto nas células sadias do organismo decorrendo em elevada toxicidade sistêmica. Por isso, pacientes

submetidos a quimioterapia apresentam, frequentemente, efeitos adversos como perda de cabelo, náuseas, fadiga e assim, baixa qualidade de vida (ASLAM et al., 2014). Outro fator que torna o tratamento ineficiente é a instabilidade genética e as altas taxas de mutações que ocorrem em células tumorais gerando heterogeneidade tumoral. Desta forma, podem existir no tumor, células cancerosas sensíveis ao tratamento e outras resistentes ao mesmo tratamento. Assim, quando expostas a um quimioterápico, as células sensíveis aos efeitos da droga são mortas e aquelas que são resistentes sobreviverão e se multiplicarão, o que pode resultar na reincidência do tumor e em um comprometimento da eficácia quimioterápica (WEINBERG, 2013; CHAVES, 2017).

Assim, entender como as células cancerosas se comportam e se dispersam no organismo ajudará a identificar alvos moleculares promissores para a terapia do câncer (VALASTYAN, 2011). No intuito de minimizar os fatores limitantes para o tratamento do câncer de mama, cientistas buscam novas abordagens terapêuticas que sejam mais seletivas às células cancerosas e que causem menos efeitos adversos aos pacientes. Nesse cenário, complexos metálicos representam potenciais fármacos antitumorais.

Entre novas abordagens terapêuticas estão os sistemas de entrega de drogas e a terapia gênica. Os sistemas de entrega (*delivery*) de fármacos por nanopartículas podem melhorar a eficácia dos tratamentos de câncer por favorecer o acúmulo do quimioterápico no tecido alvo, conservando fisiologicamente as células e tecidos saudáveis. Isto permite a potencialização da ação farmacológica do princípio ativo quimioterápico (SAFARI & ZARNEGAR, 2014).

Outro tipo de abordagem terapêutica promissora é a terapia gênica que consiste em alterações pontuais no gene ou modificações em sítios específicos que tenham como alvo o tratamento terapêutico, uma vez que otimiza o veículo de entrega, que podem ser plasmídeos, nanoestruturas ou vírus (WIRTH et al., 2013; GONÇALVES & PAIVA, 2017).

1.5. Complexo de ródio

Os complexos metálicos começaram a ser utilizados no século XX, quando a atividade antitumoral do complexo inorgânico cisdiaminodichloroplatina (II) (cisplatina) foi descoberta por Barnet Rosenberg. A cisplatina possui mecanismos de ação que induzem a citotoxicidade uma vez que esta possui a capacidade de induzir morte celular. Este complexo induz a formação de ligações covalentes cruzadas entre as guaninas do

DNA, causando distorção na estrutura helicoidal e impedindo sua transcrição e replicação (WING et al., 1984; KATSAROS & ANAGNOSTOPOULOU, 2002; PASETTO et al., 2006). A cisplatina é uma das drogas mais utilizadas no tratamento de diversos tipos de câncer. Entretanto a sua eficácia é comprometida uma vez que altas doses causam toxicidade afetando as células saudáveis e, assim, causando efeitos graves como nefrotoxicidade e neurotoxicidade (MILLER et al., 2010; ARUNKUMAR et al., 2011; WILMES et al., 2015; HU et al., 2017).

Assim, a descoberta de novos complexos metálicos tornou-se necessária e começou-se a busca por compostos com atividades terapêuticas semelhantes à cisplatina e que induzissem toxicidade específica. Assim, carboxilatos de ródio (II), fórmula molecular $[Rh_2(O_2CR)_4]$ (**Figura 8**), têm sido estudados desde 1972 com este objetivo e alguns estudos demonstram que estes complexos possuem atividade antineoplásica (REIBSHECHER et al., 1994; CARNEIRO et al., 2011; CHAVES, 2017).

Dentre promissores carboxilatos de ródio destaca-se o citrato de ródio (II) (**Figura 9**). Este complexo apresenta em sua estrutura química dois átomos de ródio ligados a duas moléculas de água (representados em “L”) e a quatro grupos de citrato, formando quatro carboxilas (-COOH) em sua estrutura molecular. Estas características químicas o tornam altamente solúvel em meio hidrofílico. Estes complexos metálicos têm sido bastante investigados nos últimos anos e foram demonstrados seus efeitos citotóxicos e antitumoral em células de câncer de mama tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo* (CARNEIRO et al., 2011; PEIXOTO 2012; CARNEIRO et al., 2013; NUNES et al., 2013; SIQUEIRA, 2016; CHAVES et al., 2017).

Apesar da promissora atividade citotóxica e antitumoral apresentada por este complexo, poucos estudos têm sido realizados para explorar seu potencial terapêutico e pouco se sabe sobre seu possível mecanismo de ação. Estudos conduzidos por Carneiro (2011) mostraram que o tratamento com citrato de ródio em células de adenocarcinoma mamário humano induziu uma expressiva redução qualitativa nos filamentos de actina. Estudos posteriores realizados por Chaves (2013 e 2017) mostraram que o citrato de ródio associado à nanopartículas induz alterações morfológicas, fragmentação e inibição da síntese de DNA, características relacionadas à apoptose celular.

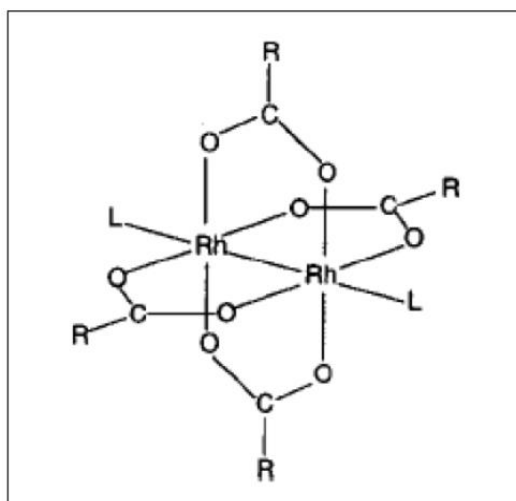


Figura 8: Estrutura química de carboxilato de ródio. Fonte: Carneiro et al., 2011.

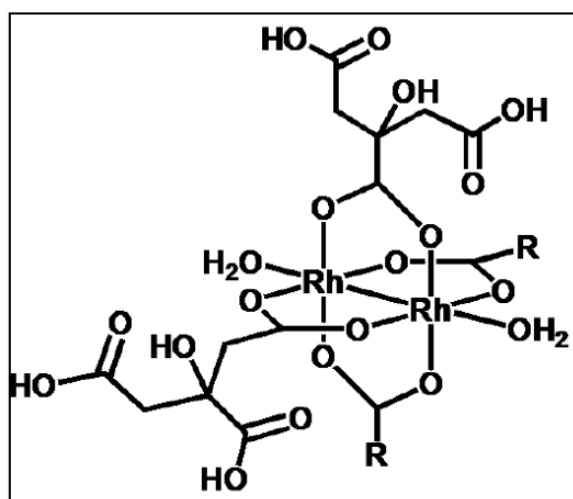


Figura 9: Estrutura química do Citrato de ródio (II). Fonte: Carneiro et al., 2011.

1.6. Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma área da ciência que tem sido bastante investigada nas últimas décadas para fabricação, caracterização, manipulação e aplicação de diversos materiais em áreas diversificadas (SAHOO *et al.*, 2007). Uma das aplicações mais promissoras refere-se ao uso de materiais em escala nanométrica para aplicação biomédica especialmente em sistemas de liberação controlada de fármacos para tratamento do câncer (BROCHADO *et al.*, 2013; ALVARENGA *et al.*, 2014).

Como sistemas de entrega de fármacos - as nanopartículas - vem se destacando tanto pela variedade de partículas possíveis como pela eficiência que vários modelos de nanoestruturas e/ou nanocarreadores demonstram (JAHANGIRIAN et al., 2017). Nanopartículas (NPs) podem apresentar tamanho entre 1 a 1000 nm a depender do tipo (origem) e estrutura química. Vários tipos de nanopartículas estão sendo testadas como sistema de entrega de fármacos e como agentes diagnósticos tais como nanopartículas de origens poliméricas, metálicas, lipídicas e de metais semicondutores (DARAEI et al., 2016). O uso de nanopartículas no câncer pode ser utilizado para fins de diagnóstico e/ou terapêutica. Quando possui finalidade diagnóstica, as nanopartículas são elaboradas a fim de identificar células tumorais e assim possibilitar a visualização da neoplasia (MISHRA, et al., 2017) e quando são produzidas para tratamento de câncer elas são terapêuticas. Considerando estas propriedades de NPs e a alta solubilidade do citrato de ródio nosso grupo de pesquisa desenvolveu um fluido magnético contendo citrato de ródio (II) associado a nanopartículas de maghemita para aplicação terapêutica em câncer de mama visando que esta associação resulte na redução da toxicidade no organismo e aumente a especificidade ao tecido alvo – células tumorais da mama.

1.6.1. Nanopartículas magnéticas

Nanopartículas magnéticas (NMs) têm se destacado nos últimos anos devido as suas promissoras potenciais aplicações em decorrência das suas propriedades. Estes materiais apresentam promissora aplicação visto que podem atravessar a barreira endotelial e se fixar especificamente nas células-alvo. Isto é possível devido a versatilidade dessas estruturas as quais podem ter as dimensões controláveis desde alguns nanômetros até dezenas de nanômetros e esta propriedade (controle do tamanho) afeta a sua atividade biológica. NMs podem, ainda, ser utilizadas para recobrir materiais biologicamente ativos como íons específicos, nucleotídeos, oligonucleotídeos, peptídeos, vitaminas, antibióticos, substratos análogos ou anticorpos, ou ainda serem encapsuladas em lipossomas e vesículas. A composição química da cobertura destes materiais deve incluir materiais que apresentem biocompatibilidade ao organismo (PANKHURST et al., 2003; XU et al., 2006; GUEDES et al., 2010; DUNCAN & GASPAR, 2011).

Nanopartículas magnéticas são compostas por óxidos de ferro. Dentre alguns tipos destas destaca-se a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) que podem ter tamanhos similares ao de muitas estruturas biológicas como vírus, bactérias, proteínas, DNA, RNA, etc.

Considerando estas propriedades de NMs e a alta solubilidade do citrato de ródio, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um fluido magnético contendo citrato de ródio (II) associado a nanopartículas de maghemita para aplicação terapêutica em câncer de mama visando que esta associação resultasse na redução da toxicidade no organismo e aumentasse a especificidade ao tecido alvo – células tumorais da mama. Em estudos preliminares foi demonstrado o efeito antitumoral deste fluido magnético e foi comprovado seu efeito potencializado em relação ao citrato de ródio livre (CARNEIRO et al., 2013; ROCHA et al., 2017). Além disso, foi demonstrado que essa formulação de fluido magnético contendo citrato de ródio foi mais captada por células de câncer de mama do que em células normais (CHAVES et al., 2017).

1.7. Citoesqueleto celular

O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica e complexa que participa de funções celulares essenciais tais como plasticidade fenotípica, transporte e sinalização celular, além de constituir principal componente o qual determina a morfologia celular (SCHMIDT & HALL, 1998).

O citoesqueleto é composto por três tipos principais de filamento de proteínas sendo eles microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários. Os microtúbulos estão relacionados com a polimerização e despolimerização das estruturas celulares e atuam na motilidade e divisão celular. Os filamentos intermediários não estão envolvidos diretamente com a motilidade celular, mas proporcionam resistência mecânica às células e tecido. E, por último, os microfilamentos, também chamados de filamentos de actina, estão espalhados por toda a célula e apresentam a função estrutural, de contração e de movimentação celular (KASP, 2005).

Os filamentos de actina são constituídos por proteínas contrácteis de actina que é a proteína globular mais abundante nas células dos mamíferos. A actina atua no transporte de organelas pelo citoplasma e desempenha funções relevantes na dinâmica celular tais como manutenção da morfologia, mitose e regulação da sinalização para sobrevivência (GOURLAY et al, 2005; DE ROBERTIS, 2006). Esta proteína é codificada por genes independentes e possui três principais isoformas: (1) α -actina, (2) β -actina e (3) γ -actina.

A isoforma α -actina está presente nas células musculares com função contrátil enquanto a β -actina e a γ -actina coexistem como componentes do citoesqueleto e contribuem para estabelecer a forma e motilidade das células não-musculares dos eucariotos (DE ROBERTIS, 2006).

A estrutura e organização da actina no citoesqueleto tem relação com diversos eventos de regulação e diferenciação celular e que podem desencadear a formação de neoplasia e progressão da capacidade de invasão (metástase) das células cancerosas no organismo (RAO & COHEN, 1991). A organização dos filamentos de actina é um processo dinâmico de polimerização e despolimerização que origina grandes alterações na estrutura de uma célula.

Assim, o conhecimento sobre a disposição não estática de constituintes do citoesqueleto da célula levou ao desenvolvimento de drogas antimitóticas no tratamento contra o câncer visto que o bloqueio da polimerização dos monômeros de actina, bem como da formação do fuso mitótico impedem a divisão celular (RAO E COHEN, 1991, RANG et al, 2011). Esse evento também é mediado por um amplo espectro de interações com proteínas da matriz extracelular, membranas celular, enzimas citoplasmáticas e até mesmo com o núcleo da célula (LODISH et al, 2000). A modulação da actina pode ser modificada por meio de ferramentas biotecnológicas a fim de se desencadear apoptose em células cancerosas (JORDAN & WILSON, 1998).

1.8. Expressão gênica

A expressão gênica diz respeito ao processo pelo qual as sequências de DNA (ácido desoxirribonucleico), que representam os genes, são moduladas até a síntese de proteína. O conhecimento sobre o fluxo de informação unilateral - do DNA a proteína - é conhecido como dogma central da biologia molecular o qual preconiza que a molécula de DNA é utilizada como molde para construção de molécula de RNA (ácido ribonucleico), a qual será usada como molde para a síntese de proteína (WRAY et al., 2003; ALBERTS et al., 2017).

A molécula de DNA tem duas principais funcionalidades: replicação e transcrição. A primeira é o mecanismo responsável pela transmissão da informação armazenada. Já a transcrição é a transformação da informação armazenada em “mensagens”. O produto desse processo dá origem a uma molécula intermediária denominada RNA mensageiro

(mRNA) que atua na transformação da “mensagem” para produção de uma dada proteína (MARTINS & MACIEL FILHO, 2012; ALBERTS et al., 2017).

A expressão gênica é a principal função relacionada com os mRNAs e o processo de transcrição. Ela define o perfil das proteínas específicas de cada tipo celular envolvido no processo de diferenciação celular. Existem vários mecanismos e fatores que regulam a expressão gênica tais como a condensação da cromatina, metilação do DNA, iniciação transcricional, “*splicing*” alternativo de RNA, estabilidade do RNA mensageiro (mRNA), controles traducionais, degradação de proteínas, dentre outros. Para cada gene, a iniciação da transcrição parece ser o determinante primário de controle da expressão gênica (CORDEIRO, 2003; GUINDALINI & TUFIK, 2007).

A heterogeneidade do câncer de mama e o grande número de genes potencialmente envolvidos no controle do crescimento, na morte e na divisão celular enfatizam a importância de se estudar as alterações genéticas e epigenéticas que podem ocorrer nas células tumorais. A análise de expressão gênica em células tumorais pode revelar se está havendo inibição ou superexpressão de genes específicos relacionados com o perfil celular e sua função tais como a actina. Assim, estudar o conteúdo gênico e de síntese de actina é importante para avaliar se esta proteína pode ser modulada por citrato de ródio livre (CR) e associado a nanopartículas de maghemita (MRC). A redução do nível de actina nos tratamentos poderia indicar a potencialidade destes em inibir a proliferação celular no tumor pelo fato de que a actina pode estar envolvida em vários processos tumorais tais como metástase e apoptose.

2. JUSTIFICATIVA

Sabendo que o câncer de mama tem uma alta taxa de incidência e prevalência mundial faz-se necessário elaborar alternativas terapêuticas mais eficientes e menos invasivas aos pacientes. O citrato de ródio livre (CR) e associado à nanopartículas de maghemita (MRC) vem sendo estudado pelo nosso grupo e estas formulações apresentaram promissor potencial terapêutico para o câncer de mama, visto ter apresentado, em estudos *in vitro* e *in vivo*, significativa atividade citotóxica e citostática em cultura de células de câncer de mama e atividade antitumoral em camundongos portadores de carcinoma mamário (CARNEIRO et al., 2011, CARNEIRO et al., 2013; PEIXOTO et al., 2014; CARNEIRO et al., 2015). Ainda, o efeito citotóxico destas formulações tem sido relacionado com a capacidade de induzir estresse oxidativo e fragmentação do DNA (CHAVES *et al.*, 2015), modulação da expressão e síntese de fibronectina e laminina (ROCHA et al., 2017) e também alterações morfológicas associadas ao citoesqueleto de actina em células da linhagem MCF-7 (CARNEIRO et al., 2011).

Alterações na dinâmica de polimerização e despolimerização do citoesqueleto de actina e alterações na morfologia celular, motilidade e adesividade são características peculiares das células cancerígenas transformadas (CARLIER & PANTALINI, 2007). Sabe-se que o citoesqueleto de actina é central para a homeostase celular e representa um importante ponto de intervenção para a quimioterapia no câncer. Alterações na polimerização da actina, por exemplo, desempenham um papel fundamental na regulação dos eventos morfológicos e fenotípicos de uma célula maligna. Por isso, filamentos do citoesqueleto são alvos de um número crescente de drogas anti-câncer (STEHN et al., 2013).

Fármacos antitumorais visando microtúbulos, tais como Taxol e compostos similares têm sido usados clinicamente com sucesso no tratamento de várias doenças malignas (WHITE et al., 2001). Porém, até o momento não foram desenvolvidos medicamentos clinicamente comprovados que tenham como alvo filamentos intermediários e microfilamentos de actina (BLAGOSKLONNY et al., 2000). O remodelamento da actina é o resultado da ativação das vias de sinalização da actina oncogênica ou da inativação de várias proteínas importantes de ligação à actina que possuem funções supressoras de tumor. Desta forma, padrões distintos da expressão gênica têm sido correlacionados com o progresso da doença (TRICHET et al. 2007).

Portanto, estudar o conteúdo gênico e de síntese de actina é bastante relevante para avaliar se esta proteína pode ser modulada por quimioterápicos como CR e MRC. A redução do nível de actina nos tratamentos pode indicar a potencialidade destes em inibir a proliferação celular e em reduzir sua capacidade metastática visto que a actina pode estar envolvida nestes processos biológicos. Neste estudo foi avaliada a modulação gênica e síntese de actina em células de adenocarcinoma mamário tratadas com CR e MRC com o objetivo de se conhecer a biologia tumoral destas células, em relação ao seu perfil de produção de actina, para propor futuras intervenções biotecnológicas direcionadas à terapia do câncer de mama.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar se o citrato de ródio (II) livre e associado à nanopartículas de maghemita induzem alterações na expressão e na síntese de actina em células de adenocarcinoma mamário.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar se o citrato de ródio (II) livre e associado à nanopartículas de maghemita:

- Alteram a expressão gênica das proteínas β -actina (genes ACTG1) em células de carcinoma mamário das linhagens MDA-MB-231 e em células não tumorais da linhagem MCF-10A, por meio de *Real Time-PCR*.
- Alteram a síntese das proteínas β -actina em MDA-MB-231 e MCF-10A, por meio de *Western Blotting*.
- Alteram a morfologia celular e a disposição estrutural e qualitativa de β -actina, por meio da imunomarcção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Condições de Cultura Celular

A linhagem de adenocarcinoma mamário humano MDA-MB-231 foi cedida pela Profa. Dra. Sônia Nair Bão, coordenadora do Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília. As células foram cultivadas em meio de cultura L-15 (*Leibovitz*) (L4386) (Sigma®, *St. Louis*, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1% de penicilina e estreptomicina, obtidos da empresa GIBCO™.

A linhagem de células saudáveis de origem epitelial, MCF-10A foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) (Código 0161). As células foram mantidas em meio de cultura *Dulbecos's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture Ham's F-12* (DMEM/F-12) na proporção de 1:1; suplementado com 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal humano (EFG) (Sigma®), 100 ng/mL de toxina colérica (Sigma®); 1 mg/mL de insulina *animal origin free* (AOF) (GIBCO™), 500 ng/mL de hidrocortisona (Sigma®) e 10% de soro fetal equino inativado (SFE) (Sigma®).

As duas linhagens celulares foram mantidas em frascos de cultura (totalmente fechados para a linhagem MDA-MB-231) com os meios de cultivo descritos acima e foram mantidas em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂. A visualização da taxa de crescimento foi feita por meio de análise em microscópio óptico invertido (Axio Vert. Al, Zeiss).

Após as células adquirirem confluência de mais de 70% realizava-se as passagens (repiques) das células. Para isso, as células eram lavadas com solução salina *Phosphate-Buffered Saline* (PBS 1x, GIBCO™) e depois submetidas a ação proteolítica de solução de tripsina-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (GIBCO™) e incubadas entre três a sete minutos a 37°C. A seguir, a ação enzimática era neutralizada com meio de cultivo e o meio em suspensão formado era homogeneizado. Deste meio, uma alíquota era usada para a quantificação do número de células para os experimentos por meio de contagem direta em Câmara de Neubauer utilizando-se o método de exclusão por corante Azul de Tripán (GIBCO™).

4.2. Tratamento das células

O complexo de Citrato de Ródio livre (CR), Citrato de Ródio associado a nanopartículas de Maghemita (MRC) e Nanopartículas de Maghemita associada a citrato (MC) foram sintetizados e cedidos pelo grupo do Professor Dr. Aparecido Ribeiro do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG). O Paclitaxel (PTX) (Accord Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil) foi cedido pela farmácia do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e este fármaco foi escolhido como controle positivo por apresentar mecanismo de ação no citoesqueleto celular, além de ser um quimioterápico empregado na clínica para tratamento de câncer de mama.

As concentrações estoques utilizadas neste estudo foram de 18,8 mM para o CR; 6,28 mM para MRC; 0,5 M de MC e 7,0 mM para o PTX. Para o uso as soluções estoques foram ajustadas para 250 μ M de CR e MRC, 50 nM para PTX. Para ensaios de RT-qPCR e Western Blot as linhagens celulares foram semeadas e, após 24 h foram tratadas e mantidas por 48 h até as análises.

No ensaio de RT-qPCR as células foram semeadas em placas de seis poços com densidade inicial de 5×10^5 e, após 24 h, foram tratadas com dose de 250 μ M de CR livre ou associado à NPs (MRC) ou mantidas apenas em meio de cultivo (controle negativo) por 48 h. Para o ensaio de Western Blot as células foram cultivadas em frascos de 25 cm² com 10^6 células para MDA-MB-231 e 5×10^5 para MCF-10A e, após 24 h, as células foram tratadas com CR, MRC, MC ou PTX (controle positivo) por 48 h. Nos ensaios de imunomarcção (fluorescência) utilizou-se placas de 24 poços e densidade celular de 7×10^4 e 1×10^5 células de MCF-10A e MDA-MB-231, respectivamente. Neste ensaio, as células foram mantidas com as soluções de tratamento com CR, MRC, MC ou PTX e o controle positivo por 24 h.

4.3. PCR em tempo real

4.3.1. Extração e quantificação de RNA total

O RNA total das células foi extraído através do *pellet* das linhagens celulares e, para isso, utilizou-se o kit comercial MirVanaTM (Ambion® by life technologiesTM, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA foi mantido a -20°C até o momento do uso. De forma geral, a extração de RNA foi feita utilizando 500 μ L de *Lysis/Binding Buffer* adicionado à amostra seguido de agitação vigorosa no vórtex até as células terem sido totalmente lisadas. Em seguida, 50 μ L de *Homogenate Additive miRNA*

foram adicionados e a solução foi homogeneizada em vórtex por 15 segundos e incubada por dez minutos em gelo. Em seguida, foram adicionados 500 µL de fenol-clorofórmio e a solução foi homogeneizada por mais 60 segundos e o lisado centrifugado a 10.000 rpm por sete minutos. Logo, a parte aquosa foi removida e transferida para um novo tubo. Neste, foi adicionado etanol 100% na proporção de 1/3 do volume recuperado. Em seguida, o volume final foi pipetado na coluna fornecida pelo kit e centrifugado por 30 segundos a 10.000 rpm. Logo, o líquido foi descartado e o filtro preservado. Este processo foi repetido até que todo o etanol fosse filtrado. Foram adicionados à coluna 700 µL da *Wash Solution 1* e a coluna foi centrifugado por 30 segundos. Então o líquido foi descartado e 500 µL da *Wash Solution 2/3* foram aplicados à coluna por 15 segundos e, logo, o líquido foi descartado e centrifugado novamente por 60 segundos. A coluna foi transferida para um novo tubo do kit e adicionou-se 100 µL da *Elution Solution* (pré-aquecido à 95°C). Em seguida, o material foi centrifugado por 30 segundos a 10.000 rpm e recuperou-se o RNA que foi armazenado à -20°C até o uso.

A quantificação foi realizada por meio do método de fluorimetria, utilizando o kit de quantificação para RNA total (Qubit® RNA BR Assay Kit) (Molecular Probes® by life technologies™, EUA) e o equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Califónia, EUA).

4.3.2. Transcrição reversa (RT) para síntese do DNA complementar (cDNA)

Utilizou-se o sistema de *primers* randômicos do kit comercial *GoScript™ Reverse Transcription System* (Proega, Wisconsin, EUA), seguindo instruções do fabricante com algumas adaptações. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 100 ng de RNA total. Inicialmente, foi adicionado 1 µL de *random primer* ao RNA total para cada amostra, RNA da amostra (volume depende da quantificação) e completado com água livre de nuclease para o volume final de 5 µL para cada amostra. Em seguida, este *mix* foi levado ao termociclador (MyCycler™ Thermal Cycler System, Bio-Rad) para desnaturação do RNA a 70°C por cinco minutos. Logo após, foi adicionado a cada amostra um *mix* contendo 4 µL de *GoScript™ Reaction Buffer*, 2 µL de MgCl₂, 0,5 µL *RNasin Ribonuclease Inhibitor*, 1 µL de *GoScript™ Reverse Transcriptase* e 6,5 µL de água livre de nuclease, totalizando 20 µL. Então, as amostras foram incubadas a 25°C por cinco minutos para anelamento e a 42°C por 50 minutos para a extensão da sequência nucleotídicas e, no final, as amostras foram armazenadas à -20°C até o uso.

4.3.3. Amplificação e quantificação de β -actina por PCR

Para esta reação, utilizou-se o kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (Madison, WI, USA) (Promega). As proporções dos reagentes utilizados no *mix* para cada amostra foram as seguintes: 10 μ L *GoTaq® qPCR Master Mix*, 7 μ L de água livre, 0,5 μ L de primer forward, 0,5 μ L de primer reverse e 2 μ L de cDNA, totalizando 20 μ L por poço. Os experimentos foram montados em placas de 96 poços (MicroAmp® Fast Optical, 0,1 ml 9 Applied, Fost, CA, USA) e foram conduzidos em triplicata para cada grupo experimental. Foi incluído um grupo controle negativo (*non-template control, NTC*) para monitorar possível contaminação de *primer* e evitar, assim, estimar resultados falsos positivos.

Para a reação de qPCR em tempo real) foram utilizados *primers* específicos para a sequência do RNA mensageiro (mRNA) de β -actina humano (ATCB) e primers de controle endógeno. Os primers de fita contínua e descontínua (*forward* e *reverse*) para β -actina foram 5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3' e 5'-AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA-3', respectivamente (Sigma®) (WEBER et al., 2015). Testes de *primers* endógenos foram previamente realizados (PAPOLA, GAPDH e GPB1) para escolha do gene que teve menores índices de variações entres as amostras. Para a linhagem MCF-10A e MDA-MB-231 foi usado o gene endógeno poli (A) polimerase alfa (PAPOLA) primers *forward* e *reverse*: 5'-GCTACGAAGACCAGTCCATTG-3' e 5'-TGTT GGTACAGATGCTGCT-3' (KWON et al., 2009).

Toda a reação foi realizada em termociclador *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Califórnia, USA). Os produtos de amplificação foram detectados por meio do marcador fluorescente *Fast SYBR™ Green Master Mix* (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) seguindo as especificações do fabricante. As condições das reações foram determinadas previamente em ciclos padronizados de 95°C por dois minutos para desnaturação, seguido de 40 ciclos de 95° por três segundos e 60°C por trinta segundos para anelamento e extensão.

O modelo matemático adotado foi de análise comparativa do material genético do gene alvo com um controle interno normalizado e o gene de controle endógeno. A quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) foi feita considerando a média das triplicatas, onde ΔC_T é a diferença entre os valores de C_T do gene endógeno e dos valores de C_T do gene alvo ($\Delta C_T = C_T$ do gene alvo - C_T do gene endógeno). A partir dos valores de ΔC_T dos grupos

CR, MRC e controle positivo foi possível subtrair a variação de ΔC_T das amostras controle por meio da média do ΔC_T (calibrador), obtendo o $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T - \text{calibrador}$.

4.4. Western Blot (WB)

4.4.1. Extração e quantificação de Proteínas

O ensaio de extração das proteínas ocorreu após as 48 h do tratamento. As células foram lavadas com solução de PBS (1 X) e, em seguida, foram adicionados 50 μL de Tampão de Lise contendo Inibidor de Protease (Roche); Tris-HCl 1M, pH 7,4; NaCl 5M; Triton (100 X) a 10% e água deionizada MilliQ e as células foram incubadas por dez minutos em gelo. Logo, as células foram lisadas com auxílio de um “rodo” (*cell scraper*) e coletadas em tubos eppendorf e incubadas por dez minutos no gelo, sendo homogeneizadas em vórtex a cada três minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por dez minutos a 14.000 rpm a 4°C e o sobrenadante transferido para novos tubos. As amostras de proteínas totais foram armazenadas a -20°C e quantificadas utilizando-se o kit BCA (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit) (Sigma®), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.4.2. Gel SDS-PAGE e Western Blot

Para o fracionamento das proteínas a técnica utilizada foi eletroforese em gel de SDS-policrilamida (SDS-PAGE) com gradiente de 5% a 12%. Primeiramente, as amostras para a desnaturação das proteínas foram fervidas por cinco minutos a 95°C. Para isso, foram aplicados 25 μg de proteínas totais de cada amostra e em um poço aplicou-se 5 μL de marcador molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards) (Bio-Rad) no gel. A eletroforese do gel foi realizada a 80 V até a amostra entrar no gel separador e 120 V no restante da corrida utilizando Tampão Tris-Glicina (125 mM Tris; 0,96 M Glicina e 0,5% SDS- pH 8,2).

Para realizar o Western Blot, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond® ECL™ nitrocellulose membranes) utilizando Tampão de Transferência gelado (24 mM Tris; 193mM Glicina e 20% Metanol) durante uma hora a 100 V em cuba de eletroforese (BIO-RAD). Em seguida, as membranas foram incubadas por uma hora com PBS/leite em pó molico (3%) para bloqueio das ligações inespecíficas e lavadas com PBS/Tween-20 (0,05%) por três vezes sendo cinco minutos cada lavagem.

A membrana então foi incubada com anticorpo primário anti- β -actina (Monoclonal Anti- β -Actin antibody produzido em rato) (Sigma-Aldrich) e anticorpo glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), *overnigh*, a -4°C em câmara fria. Em seguida, as membranas foram lavadas por três vezes por cinco minutos cada em solução de PBS/Tween-20 (0,05%). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado à HRP (*horseradish peroxidase*) diluído na proporção de 1:5.000 em solução de bloqueio inespecífico (PBS/leite em pó molico - 3%) por uma hora sob agitação de um homogeneizador elétrico, em temperatura ambiente. Logo, as membranas foram lavadas por três vezes por cinco minutos cada em solução contendo PBS/Tween-20 (0,05%) e reveladas utilizando 500 μL de cada solução do kit de quimioluminescência - ECL (GE Healthcare) (Amersham Biosciences). As bandas foram visualizadas por meio deste sistema de detecção enzimática que catalisa a oxidação do luminol em presença de peróxido, o que resulta em emissão de luz no equipamento ImageQuantTM LAS 4000 series (GE Healthcare Life Sciences).

4.5 Ensaio de Imunomarcção de β -actina por microscopia de fluorescência

O ensaio de Imunomarcção foi realizado para se visualizar a organização e distribuição da β -actina nas células das linhagens MCF-10A e MDA-MB-231. Previamente, lamínulas redondas (Perfect) (25,4 x 76,2 mm) foram lavadas e autoclavadas. As células de ambas as linhagens foram semeadas sobre estas lamínulas em placas de 24 poços e seguiu-se o protocolo de tratamento das células conforme item 4.2. Após 24 h, o meio de cultura foi retirado e, a cada etapa descrita a seguir, as células foram lavadas com 500 μL de PBS por três vezes seguidas.

Primeiramente, as células foram fixadas com Formaldeído (3,7%) por 15 minutos e procedeu-se a permeabilização das membranas celulares por meio da incubação das células com Triton (1%) por dez minutos sob temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se a solução de bloqueio inespecífico (leite desnatado a 1%; albumina sérica bovina - BSA - a 2,5 %; soro fetal bovino (SFB) a 8% em PBS - pH 7,2) por 30 minutos sob temperatura ambiente. Depois, adicionou-se, imediatamente, o anticorpo primário de β -actina (Monoclonal Anti- β -Actin antibody produced in mouse, Sigma-Aldrich) e incubou-se as células *overnight* a 4°C .

No dia seguinte, adicionou-se o anticorpo secundário Anti-Mouse IgG Alexa 546 (Invitrogen) na proporção de 1:500 em PBS para visualização do citoesqueleto e incubou-

se as lamínulas por uma hora a temperatura ambiente protegida da luz com papel alumínio. A seguir, as lamínulas foram incubadas por sete minutos com DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) (300 nM) para marcação do núcleo. Por fim, as lâminas foram montadas e analisadas em microscópio de fluorescência (ZEISS). Utilizou-se filtro verde e ultravioleta e objetiva de 40 X.

4.6. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. A expressão de β -actina, analisada por RT-qPCR, foi analisada pelo teste de *Kruskal Wallis* dado que os pressupostos da normalidade não foram observados. Os testes foram realizados no programa *GraphPad Prism* (versão 8.0.2 - GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA). Em relação ao ensaio de síntese da proteína β -actina as bandas foram quantificadas e os valores de “pixels” referentes às bandas foram transpostas em dados numéricos utilizando-se o programa *Image J* (*Image 1.45s, National Institutes of Health, USA*). Os níveis de significância foram estabelecidos quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise da expressão relativa de β -actina induzida por Citrato de Ródio livre e associado a Nanopartículas de Maghemita

O objetivo do ensaio de qRT-PCR foi avaliar se as formulações baseadas em citrato de ródio (CR e MRC, dose de 250 μ M) induziam redução no nível de expressão gênica de β -actina em células tumorais (MDA-MB-231) e normais (MCF-10A). Em células da linhagem tumoral MDA-MB-231 observou-se significativa redução na expressão de β -actina após os tratamentos com citrato de ródio livre – CR- e associado à nanopartículas – MCR (**Figura 10**).

Em um estudo conduzido por Chaves (2017) foi demonstrado que o tratamento com MRC inibe a proliferação de células tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) e induz apoptose. Ainda, foi mostrado, em estudo realizado por Carneiro (2011), que CR apresenta atividade citotóxica, citostática e antitumoral em células de adenocarcinoma mamário. Assim, estas formulações apresentaram-se promissoras como potenciais alvos terapêuticos para o câncer de mama.

O remodelamento da actina (processo de polimerização e despolimerização) pode estar associado a ativação de vias de sinalização oncogênica ou da inativação de várias proteínas importantes de ligação à actina que possuem funções supressoras de tumor. Padrões distintos de expressão proteica de alguns desses genes em células cancerosas e processos carcinogênicos têm sido correlacionados com o progresso da doença (RAO & LI, 2004).

Interessantemente, a linhagem MDA-MB-231 corresponde a uma linhagem de adenocarcinoma mamário caracterizada como triplo-negativa, ou seja, não responsiva a receptor de estrógeno, receptor de progesterona e à proteína HER-2 (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano), e em nosso ensaio pôde-se observar uma redução expressiva ($p < 0,05$) no conteúdo de β -actina de 0,7 no grupo de CR e 0,5 no grupo de MRC (**Figura 10**). Provavelmente, esta redução da expressão de actina está associada com a redução na produção de actina na linhagem MDA-MB-231. Estudos conduzidos por nosso grupo demonstraram que, na dose de 250 μ M, CR reduziu a viabilidade celular para cerca de 42% (0,53) e MRC para cerca de 21% (3,4) em células da linhagem MDA-MB-231 (dados não publicados).

A β -actina parece ter importante relação com a citotoxicidade induzida por CR e MRC. O efeito citotóxico induzido por CR e MRC está relacionado com alterações estruturais no citoesqueleto de actina em células de adenocarcinoma da linhagem MCF-7 (CARNEIRO et al, 2011). A dinâmica do citoesqueleto de actina está relacionada com a agregação desta proteína, que ocorre em virtude da sua despolimerização, e isto está correlacionado com o aumento da sensibilidade celular à indução de apoptose (MOLLI et al., 2009). O perfil de expressão de actina está associado com uma série de eventos celulares tais como migração celular invasiva. Assim, a redução do nível de actina nos tratamentos (CR e MRC) pode indicar a potencialidade destes em inibir a proliferação tumoral pelo fato de que actina pode estar envolvida em processos de metástase e indução de apoptose (KANTHOU & TOZER, 2002; KANG et al., 2015).

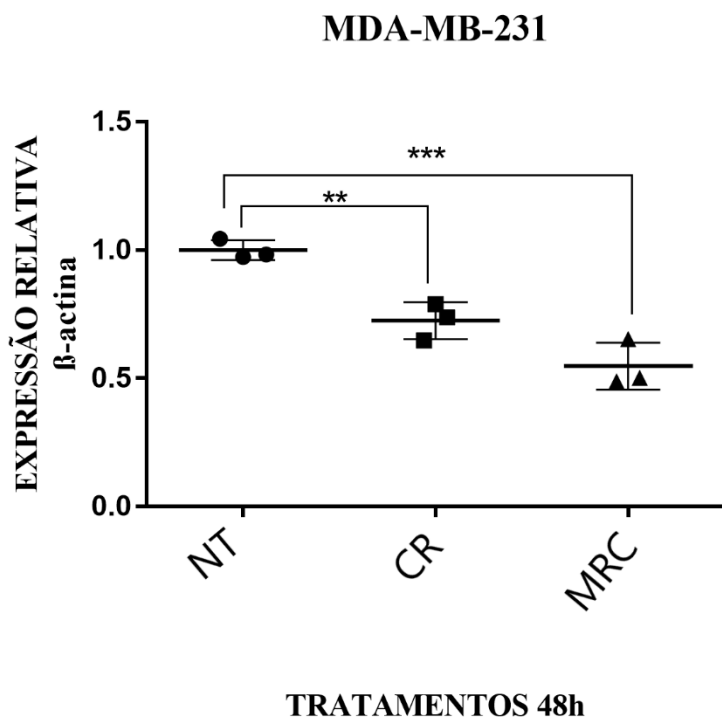


Figura 10. Expressão relativa de β -actina avaliada pelo método de qPCR (PCR qualitativa em tempo real) em células tumorais da linhagem MDA-MB-231. A expressão foi normalizada pelo gene endógeno poli (A) polimerase alfa (PAPOLA) (Δ Ct) e pela expressão do grupo não tratado (NT) ($\Delta\Delta$ Ct, arbitrariamente considerado 1,0 - 100% de expressão). As células foram tratadas por 48 h com Citrato de Ródio (CR) e Nanopartículas de Maghemita associada a Citrato de Ródio livre (MRC) na dose de 250 μ M de CR. A barra representa uma vez o erro padrão e foi realizada análise não paramétrica por meio de teste de Kruskal-Wallis. Todos os dados foram normalizados com o controle negativo (NT) e expressos como média \pm desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicatas. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao controle negativo ($p < 0.05$).

Em relação a linhagem MCF-10A, células de origem epitelial normal, observou-se grande variação na expressão relativa de β -actina em todos os grupos experimentais, inclusive no controle. Assim, não foi possível obter resultados conclusivos acerca da expressão desta proteína, visto que esta oscilação na expressão relativa de β -actina decorre das variações que ocorreram na expressão gênica do controle endógeno que é utilizado para normalizar os dados (**Figura 11**). Sobretudo, observou-se que a maior variação ocorreu em células tratadas com MRC. Assim, novos ensaios devem ser realizados a fim de se obter resultados mais confiáveis. Para isso, será necessário testar outros *primers* de genes endógenos que resultem em menor variação.

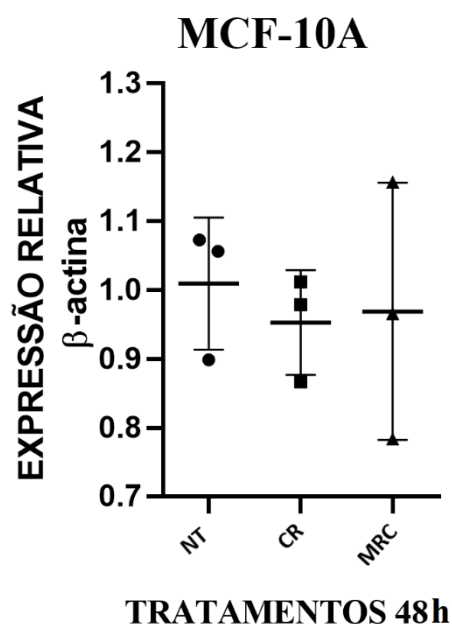


Figura 11. Expressão relativa de β -actina avaliada pelo método de qPCR (PCR qualitativa em tempo real) em células epiteliais de mama saudáveis da linhagem MCF-10A. A expressão foi normalizada pelo endógeno PAPOLA (Δ Ct) e pela expressão do grupo não tratado (NT) ($\Delta\Delta$ Ct, arbitrariamente considerado 1,0 (100% de expressão)). As células foram tratadas por 48 h com Citrato de Ródio (CR) e Nanopartículas de Maghemita associada a Citrato de Ródio livre (MRC) na dose de 250 μ M de CR. A barra representa uma vez o erro padrão e foi realizada análise não paramétrica por meio de teste de *Kruskal-Wallis*. Todos os dados foram normalizados com o controle negativo (NT) e expressos como média \pm desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata ($p < 0.05$).

5.2. Síntese da proteína β -actina

A técnica de *Western blot* foi empregada para avaliar se havia modulação da síntese de β -actina induzida pelas formulações de citrato de ródio em células das linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A após 48 horas de tratamento.

Em relação a linhagem MDA-MB-231 foi observado que apenas o tratamento com citrato de ródio associado a nanopartícula de maghemita (MRC) houve significativa redução no conteúdo de actina em relação ao controle (NT- não tratado). Os tratamentos com PTX e com MCR reduziram ligeiramente a síntese de β -actina quando comparado com o controle (NT), mas esta redução não foi significativa. O conteúdo de β -actina em células tratadas com CR foi igual ao do controle (**Figura 12**).

Os filamentos de actina desempenham um papel fundamental na regulação dos eventos morfológicos e fenotípicos de uma célula maligna, tais como a linhagem MDA-MB-231 que apresenta elevado potencial metastático (INSALL & MACHESKY, 2009). Nos ensaios de qPCR foi observada uma redução significativa da expressão relativa de β -actina nesta linhagem celular (Figura 10), corroborando, assim, nossos resultados.

Há evidências de que a redução quantitativa de actina esteja associada a eventos celulares relacionados à apoptose. A despolimerização da actina pode ser desencadeada pela agregação da proteína em decorrência da redução da sua expressão e isto desempenha um papel importante na abertura de canais iônicos na mitocôndria que regula a apoptose. (WHITE et al., 2001; GOULAY & AYSCOUGH, 2005). Estudos ainda realizados por Santos (2007) demonstraram que a oxidação de espécies reativas de oxigênio (EROs) está relacionada a despolimerização e inibição dos filamentos de actina, uma vez que o peroxinitrito (ONOO^-) oxida a actina, provocando oxidação da cisteínas e das metioninas. Assim, a actina está envolvida em uma série de eventos celulares que regulam a proliferação celular (RIDLE & PARDEE, 1980) e, assim, a redução na expressão e síntese de actina representa um resultado promissor já que este efeito está associado a citotoxicidade em células tumorais.

Ainda, a actina interage com proteínas da matriz extracelular, membrana celular, RNAm, enzimas citoplasmáticas e núcleo, promovendo diversas alterações no citoesqueleto (RAO & COHEN, 1991). Estudos preliminares conduzidos por nosso grupo demonstraram que CR e MRC induziram atividade antitumoral em camundongos portadores de adenocarcinoma mamário de uma linhagem com elevado potencial metastático (linhagem 4T1). Este efeito foi associado a uma redução na expressão de

fibronectina e laminina (Rocha et al., 2017). Vários estudos têm demonstrado que estas duas proteínas da matriz extracelular estão superexpressas em tumores metastáticos (LAI et al., 2019; REITHMEIER et al., 2017). A redução na expressão das mesmas revela o elevado potencial do tratamento de CR e MRC para o câncer de mama metastático, visto que apresentam potencial de induzir redução na expressão de importantes proteínas relacionadas ao processo de migração celular – actina, fibronectina e laminina.

Quando se analisou as células da linhagem MCF-10A observou-se, de forma geral, que não houve diferença significativa na síntese da β -actina entre os grupos de tratamento (**Figura 13**). Este resultado é bastante interessante visto que esta linhagem é originada de células epiteliais saudáveis. Ainda, em estudos preliminares nosso grupo de pesquisa demonstrou que CR e MRC foram mais citotóxicos em células tumorais do que em células saudáveis (CARNEIRO et al, 2011; CHAVES et al, 2017; ROCHA et al, 2017). Desta forma, parece coerente não termos encontrado redução na síntese de actina em células saudáveis da linhagem MCF-10A.

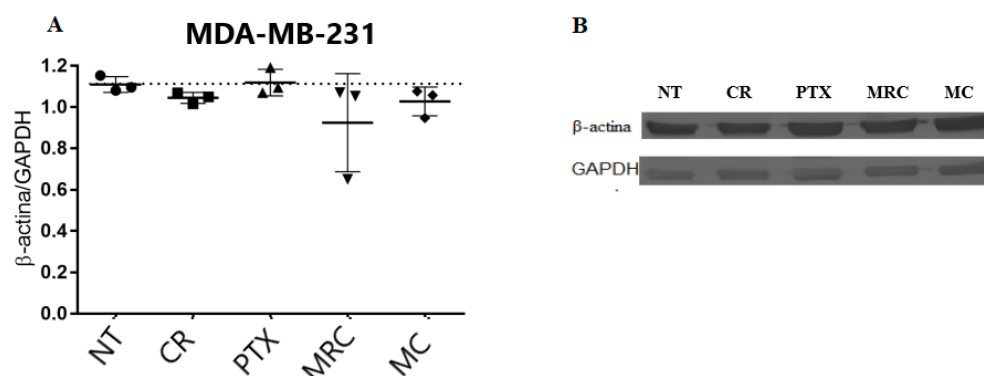


Figura 12: Síntese de β -actina (42 KDa) na linhagem MDA-MB-231. Células da linhagem MDA-MB-231 foram semeadas com densidade inicial de 10^6 células e, após 24 h, tratadas com as doses de 50 nM de paclitaxel (PTX) e 250 μ M de citrato de ródio livre (CR) e associado a nanopartículas de maghemita (MRC) e nanopartículas de maghemita recoberta com citrato (MC) em dose equimolar de ferro de MRC. Utilizou-se 25 μ g por poço de proteína total em cada poço e utilizou-se o GAPDH como controle interno (endógeno). A quantificação do conteúdo de β -actina foi normalizada em relação a expressão de GAPDH (controle endógeno). Realizou-se análise não paramétrica com teste de Kruskal-Wallis. (A). Representação de análise quantitativa do nível de β -actina encontrado em B (ensaio de *western blot* - WB). A quantificação de intensidade de pixels foi feita por meio do programa *Image J* e as médias e desvio padrão foram plotados em A (Image 1.45s, National Institutes of Health, USA). (B). Imagem de um ensaio representativo de WB. A análise das proteínas foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida (12 %) seguidas de transferência em membrana de nitrocelulose. * redução da síntese proteica de MRC. Todos os dados foram normalizados com o controle negativo (NT) e expressos como média \pm desvio padrão da média de três experimentos independentes. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao controle negativo ($p < 0.05$).

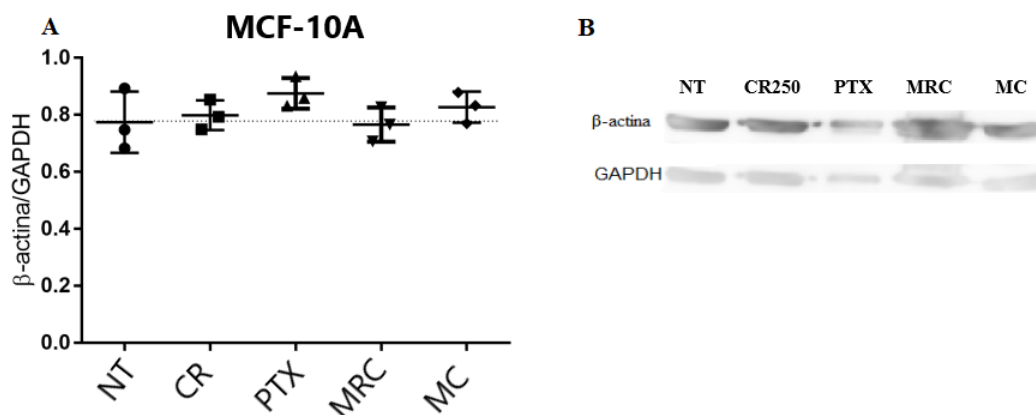


Figura 13: Expressão proteica de β -actina (42 KDa) na linhagem MCF-10A. Células da linhagem MCF-10A foram semeadas com densidade inicial de 10^6 células e, após 24 h, tratadas com as doses de 50 nM de paclitaxel (PTX) e 250 μ M de citrato de ródio livre e associado a maghemita (MRC) e com maghemita recoberta com citrato (MRC) em dose equimolar de ferro de MC. Foram realizados três experimentos independentes. Utilizou-se 25 μ g por poço de proteína total em cada poço e utilizou-se o GAPDH como controle interno (endógeno). Quantificação normalizada de β -actina em relação a expressão de GAPDH, análise não paramétrica, com teste de Kruskal-Wallis (A). Representação de análise quantitativa do nível de β -actina encontrado em B, quantificação dos pixels pelo programa Image J (Image 1.45s, National Institutes of Health, USA). (B) Análise das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (12 %) seguidas de transferência em membrana de nitrocelulose. Todos os dados representados em A foram normalizados com o controle negativo (NT) e expressos como média \pm desvio padrão da média de três experimentos independentes. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais analisados ($p < 0.05$).

5.3. Imunomarcação de β -actina

A fim de se visualizar a configuração estrutural de β -actina nas células MDA-MB-231 e MCF-10A, após tratamento com CR e MRC, foi realizada a imunomarcação dessa proteína e as células foram analisadas em microscópio de fluorescência. A actina é uma das proteínas mais abundantes em células eucarióticas, o que confere a morfologia característica das células (LODISH et al., 2000). De forma geral, observou-se mudanças morfológicas e estruturais relacionadas a actina e ao núcleo em ambas as linhagens e para todos os tratamentos. Estas alterações foram associadas ao efeito citotóxico induzido pelas formulações (**Figuras 14 e 15**).

Células da linhagem MDA-MB-231 apresentaram mudanças morfológicas e estruturais como fragmentação e condensação nuclear e agregação dos filamentos de actina após os tratamentos com CR e MRC e com paclitaxel - PTX (**Figura 14**).

Por outro lado, em células da linhagem MCF-10A tratadas com PTX, MRC e MC foi observada agregação dos filamentos de actina, característica demonstrada por pontos focais com maior intensidade de fluorescência (**Figura 15**). As mudanças estruturais no

citoesqueleto de actina também foram associadas às alterações estruturais no núcleo celular. Notou-se, no tratamento com MRC uma redução do número das finas protrusões de membrana (**Figura 15**).

Em estudos prévios foi demonstrado que CR e MRC induziram alterações estruturais do citoesqueleto de actina de células da linhagem MCF-7 (dose de 500 μ M) e estas alterações resultaram na redução dos filamentos de actina, evento associado à sua despolimerização (Carneiro, 2011). Estímulos provenientes do interior das células, como por exemplo, lesões no RNA ou DNA, desestruturação do citoesqueleto, alterações no retículo endoplasmático ou modificações citoplasmáticas são capazes de induzir apoptose (Carvalho, 2009). Assim, é possível que CR e MRC induzam apoptose por mecanismos relacionados ao citoesqueleto, de forma direta, ou por mecanismos indiretos tais como produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que desencadeiam alterações estruturais na actina (SANTOS, 2007).

MDA-MB-231

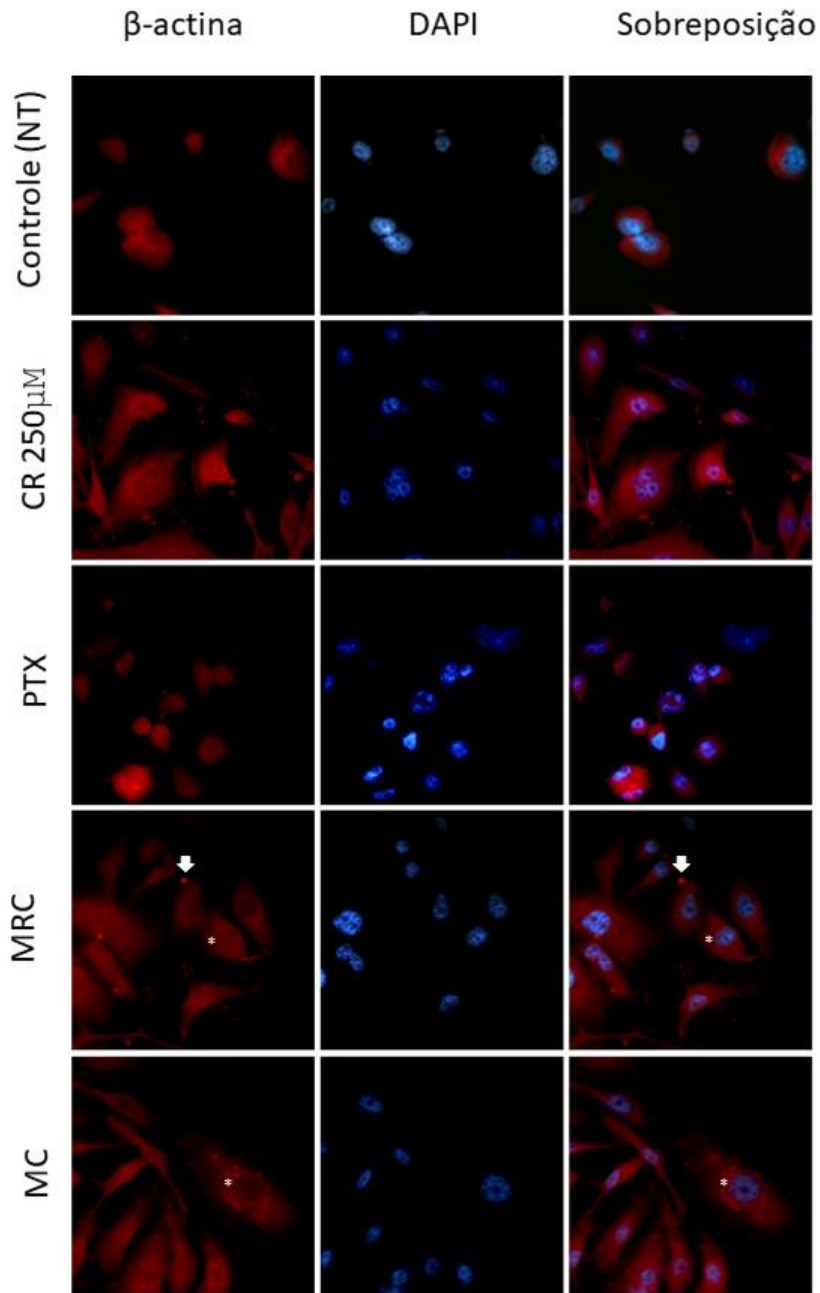


Figura 14: Distribuição estrutural de β -actina na membrana de células da linhagem MDA-MB-231. As células foram tratadas com as doses de 50 nM de paclitaxel (PTX) e 250 μ M de citrato de ródio livre (CR) e associado a nanopartículas de maghemita (MRC) e nanopartículas de maghemita recobertas com citrato (MC) em dose equimolar de ferro de MRC por 24 h. As células MDA-MB-231 foram marcadas com anticorpo Anti-Mouse IgG Alexa 546 para marcação da actina (vermelho) e o núcleo das células foram marcados com *4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride* (DAPI) (azul). A setas representam a agregação da actina e os asteriscos representam os filamentos de actina concentrados ao redor do núcleo. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência (ZEISS) utilizando objetiva no aumento de 40 X.

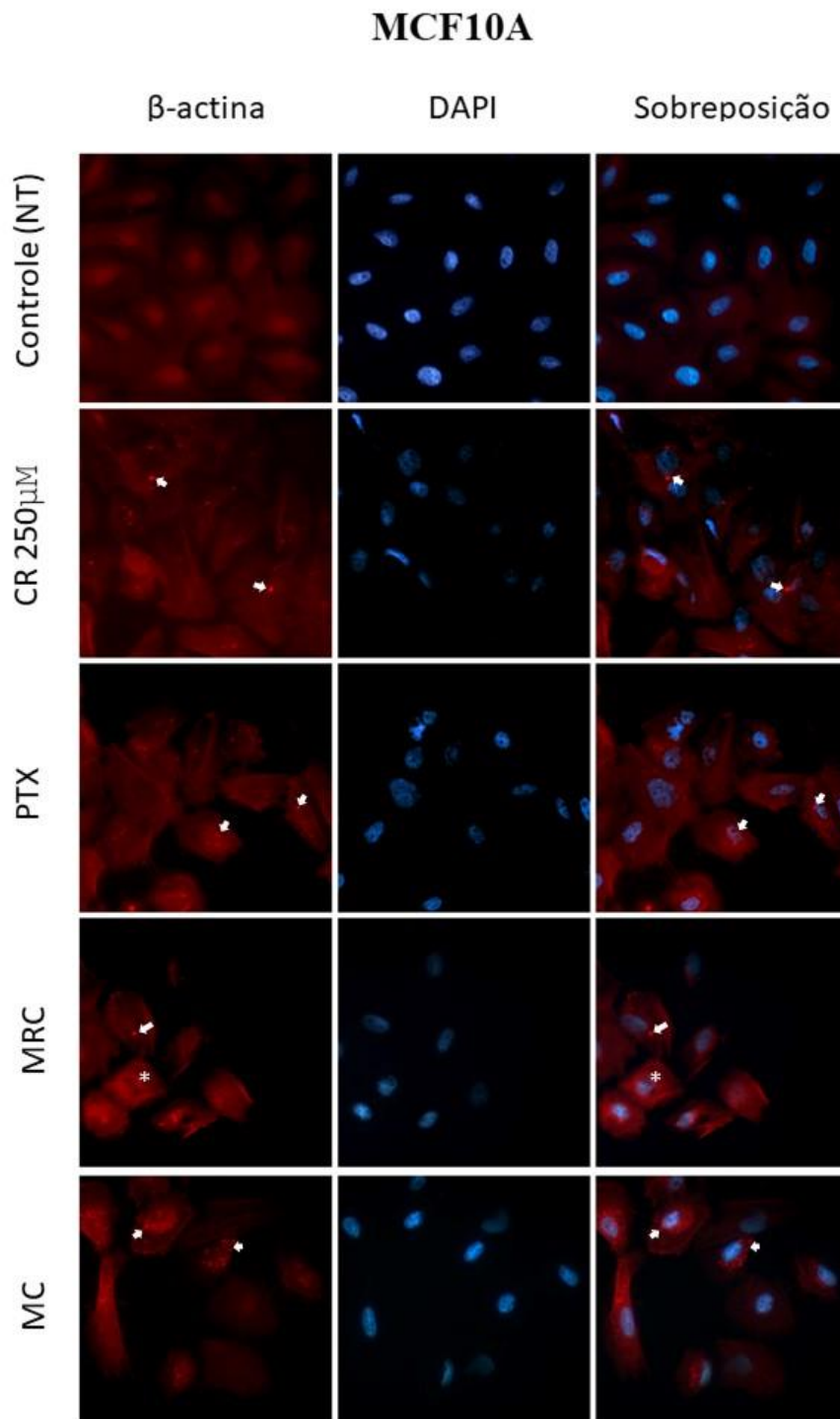


Figura 15: Distribuição e marcação de β -actina na membrana celular MCF10A. As células foram tratadas com as doses de 50 nM de paclitaxel (PTX) e 250 μ M de citrato de ródio livre (CR) e associado a nanopartículas de maghemita (MRC) e nanopartículas de maghemita recobertas com citrato (MC) em dose equimolar de ferro de MRC por 24 h. As células MCF10A foram marcadas com anticorpo Anti-Mouse IgG Alexa 546 para marcação da actina (vermelho) e o núcleo das células foram marcados com *4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride* (DAPI) (azul). As setas representam a agregação da actina. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência (ZEISS) utilizando objetiva no aumento de 40 X.

CONCLUSÕES

Os tratamentos com Citrato de Ródio livre (CR) e associado a nanopartículas de maghemita (MRC) – dose de 250 μ M por 48 h - induziram modulação negativa de expressão e síntese de β actina em células da linhagem de adenocarcinoma mamário metastático (MDA-MB-231). Contudo, em células epiteliais de origem normal, ou seja, saudáveis, não houve alteração na modulação gênica e/ou proteica de actina nas condições experimentais testadas. A redução na expressão e síntese de β actina está associada a redução na viabilidade e a alterações morfológicas e estruturais no citoesqueleto de actina e núcleo celular. Assim, podemos concluir que a actina pode ser um alvo importante para terapêutica de câncer de mama metastático mediada pelas formulações baseadas em citrato de ródio.

PERSPECTIVAS

As perspectivas propostas para a continuidade desse trabalho são:

1. Investigar a dinâmica de regulação da despolimerização da actina por outras proteínas citosólicas uma vez que os tratamentos mostraram morfologia alterada.
2. Avaliar a expressão e síntese β -actina em outras linhagens tumorais a fim de confirmar a sua redução.
3. Analisar novos endógenos para avaliação de expressão gênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSON, J.; HUNT, T. *Biologia molecular da célula*. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ALMEIDA, V. L. DE; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

ALVARENGA, E.C.; CAIRES, A.; LADEIRA, L.O.; GAMERO, E.J.P.; ANDRADE, L.M.; PAZ, M.T.L.; LEITE, M.F. Potenciais alvo terapêuticos contra o câncer. *Ciência e Cultura*, v. 66, n. 1, p. 43-48, 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). Breast Cancer. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

ARUNKUMAR, P. A.; MUKUND, H.; RADHESHYAM, N.; BELLİYAPPA, M. S. Clinical Evaluation of Cisplatin Induced Nephrotoxicity Characterized By Electrolyte Disturbances. **Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**. v. 1, n. 4, p.100-104, 2011.

ASLAM, M. S.; NAVEED, S.; AHMED, A.; ABBAS, Z.; GULL, I.; ATHAR, A. M. Side Effects of Chemotherapy in Cancer Patients and Evaluation of Patients Opinion about Starvation Based Differential Chemotherapy. *Journal of Cancer Therapy*, v. 5, p. 817-822. 2014.

AXELROD, R.; AXELROD, D. E.; PIENTA, K. J. Evolution of cooperation among tumor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 36, p. 13474–13479, 2006.

BARROS, A.C.S.D; BARBOSA, E.M.; GEBRIM, L. H. Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mam. AMB/CFM-Projeto Diretrizes, p.1-15, 2001.

BERGMANN, A.; MATTOS, I. E.; KOIFMAN, R. J. Morbidade após o tratamento para câncer de mama. *Fisioterapia Brasil*, v.1, n. 2, p. 101-108, 2000.

BLAGOSKLONNY, M. V.; BISHOP, P. C.; ROBEY, R. Loss of Cell Cycle Control Allows Selective Microtubule-active Drug-induced Bcl-2 Phosphorylation and Cytotoxicity in Autonomous Cancer Cells. **Cancer Research**, v. ;60, p. 3425-3428, 2000.

BOYLE, P.; LEVIN, B. World cancer report 2008. IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2008.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BRITO, C.; PORTELA, M. C.; VASCONCELLOS, M.T.L. Fatores associados à persistência à terapia hormonal em mulheres com câncer de mama. **Revista Saúde Pública**, v. 8, n. 2, p. 284-295, 2014.

BROCHADO, P.M.D.S.C. Nanotecnologia e a sua aplicação à terapêutica oncológica. Dissertação de mestrado: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

CAIRNS, R. A.; MAK, T. W. The current state of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, v. 16, n. 10, p. 613–614, 2016.

CARLIER, M-F & PANTALONI, D. Control of Actin Assembly Dynamics in Cell Motility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 23005-23009, 2007.

CARNEIRO, M. L. B.; NUNES, E. S.; PEIXOTO, R. C.; OLIVEIRA, R. G.; LOURENÇO, L. H.; DA SILVA, I. C.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; DE SOUZA, A. R.; LACAVALA, Z. G.; BÁO, S. N. Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, p.11-27, 2011.

CARNEIRO, M. L.; PEIXOTO, R. C. A.; JOANITTI, G. A.; OLIVEIRA, R. G. S.; TELLES, L. A. M.; MIRANDA-VILELA, A. L.; BOCCA, A. L.; VIANNA, L. M. S.; DA SILVA, I. C. R.; DE SOUZA, A. R.; LACAVALA, Z. G. M.; BÁO, S. N. Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 11, p. 4, 2013.

CARNEIRO, M.L.B. Efeitos Biológicos de citrato de ródio II livre e de sua associação a nanopartículas magnéticas e a magnetolipossomas em células de carcinoma mamário: estudos in vitro e in vivo. Tese de doutorado em Biologia Molecular. Universidade de Brasília. Brasília. 2011.

CARVALHO, E. Morte celular induzida pelo manganês em linhagens tumorais. Rio de Janeiro: Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Oncologia, 2009.

CHAVES, N. L. Estudo da interação entre nanopartículas de maghemita associadas ao Citrato de ródio e células de câncer de mama. Tese de doutorado em Biologia Animal. Universidade de Brasília. Brasília. 2017.

CHAVES, N. L. Estudo de morte celular em células MCF-7 tratadas com citrato de ródio associado a nanopartículas de maghemita. Dissertação de mestrado em Biologia Animal. Universidade de Brasília. Brasília. 2013.

CHAVES, N. L.; LOPES, C. A. P.; CARNEIRO, M. L. B. C.; DE SOUZA, A. R.; DA SILVA, M. O.; CORRÊA, J. R.; BÃO, S. N. Rhodium Citrate Associated with Maghemite Nanoparticles Causes DNA Fragmentation Independently of Caspases 3 and Mediated by Reactive Oxygen Species. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 6, n.5, p.1000312, 2015.

CHAVES, N.; ESTRELA-LOPIS, I.; BÖTTNER, J.; LOPES, C. A. P.; CÂNDIDO GUIDO, B.; SOUZA, A.; BAO, S. Exploring cellular uptake of iron oxide nanoparticles associated with rhodium citrate in breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, v. Volume 12, p. 5511-5523, 2017.

CICHON, M. A.; DEGNIM, A. C.; VISSCHER, D. W.; RADISKY, D. K. C. Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 15, n. 4, p. 389–97, 2010.

CORDEIRO, M.C.R. Engenharia Genética: conceitos básicos, ferramentas e aplicação. DF: Embrapa, documento 86, p. 9-22, 2003.

CTSU (Clinical Trial Service Unit), Radcliffe Infirmary (RI). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. v. 365, p. 1687-1717, 2005.

DARAEI, H.; EATEMADI, A.; ABBASI, E.; FEKRI, A. S.; KOUHI, M.; AKBARZADEH, A. Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, v. 44, n. 1, p. 410-422, 2016.

DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. De Robertis – Bases da Biologia Celular e Molecular. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **2006**.

DUFFY, M. J.; HARBECK, N.; NAP, M.; MOLINA, R.; NICOLINI, A.; SENKUS, E.; CARDOSO, F. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). **European journal of cancer** (Oxford, England : 1990), v. 75, p. 284–298, 2017.

DUNCAN, R. & GASPAR, R. Nanomedicine(s) under the microscope. **Molecular pharmaceutics**, v. 8, n.6, p. 2101-2141, 2001.

ELLISON, L. M.; MAN, YANGAO, Y.; STOJADINOVIC, A.; XIN, H.; AVITAL, I. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in treatment of gastric cancer with peritoneal carcinomatosis. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*, v. 29, n. 1, p. 86–92, 2017.

FLAVAHAN, W. A.; DRIER, Y.; LIAU, B. B.; GILLESPIE, S. M.; VENTEICHER, A. S.; STEMMER-RACHAMIMOV, A. O.; SUVÀ, M. L.; BERNSTEIN, B. E. Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. **Nature**, v. 529, n. 7584, p. 110–114, 2016.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W. C.; COATES, A. S.; GELBER, R. D.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H-J. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, v. 22, n. 8, p. 1736–47, 2011.

GONÇALVES, G. A & PAIVA, R. M. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. *Einstein (São Paulo)*, v. 15, n. 3, p. 369-375, 2017.

GOURLAY, C.W & AYSCOUGH KR. The actin cytoskeleton in ageing and apoptosis. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n.12, p.1193-1198, 2005.

GOURLAY, C.W. & AYSCOUGH, K.R. A role for actin in aging and apoptosis. *Biochemical Society Transactions*, v. 33, p. 1260-1264, 2005.

GRAMINHA, A. E. Complexos de Ru e Pd com bases de Schiff de ditiocarbazatos com interesse bioinorgânico e quimioterápico. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

GUEDES, G. P.; ALLÃO, R. A.; MERCANTE, L. A.; VAZ, M. G. F. Compostos magnéticos moleculares - o desenvolvimento de novos materiais magnéticos nanoestruturados. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1756-1764, 2010.

GUINDALINI, C. & TUFIK, S. Uso de microarrays na busca de perfis de expressão gênica - aplicação no estudo de fenótipos complexos. **Revista Brasileira Psiquiatria**, v. 29, n. 4, p. 370-374, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HEITZ, A. E.; BAUMGARTNER, R. N.; BAUMGARTNER, K. B.; BOONE, S. D. Healthy lifestyle impact on breast cancer-specific and all-cause mortality. **Breast cancer research and treatment**, v. 167, n. 1, p. 171–181, 2018.

HU, J.; WU, T.-M.; LI, H.-Z.; ZUO, Z.-P.; ZHAO, Y.-L.; YANG, L. The synthesis, structure-toxicity relationship of cisplatin derivatives for the mechanism research of cisplatin-induced nephrotoxicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.27, n.15, p.3591–3594, 2017.

INSALLI, R. H. & MACHESKY, L. M. Actin Dynamics at the Leading Edge: From Simple Machinery to Complex Networks. *Developmental Cell*, v. 15, p.310-322, 2009.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Mama. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 2 out. 2018.

JAHANGIRIAN, H.; LEMRASKI, E.G.; WEBSTER, T.J.; RAFIEE-MOGHADDAM, R.; ABDOLLAHI, Y. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. *International journal of nanomedicine*. *International journal of nanomedicine*, v. 12, p. 2957-2978, 2017.

JORDAN, M.A., WILSON L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for câncer chemotherapy. *Curr Opin Cell Biol*, v. 10, n.1, p.123-30. **1998**.

JUNQUEIRA, L. L. & CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 12ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KANG, J. I.; HONG, J. W.; LEE, H. J.; BAE, S. Y.; JUNG, C.; PARK, H. J.; LEE, S. K. Anti-Tumor Activity of Yuanhuacine by Regulating AMPK/mTOR Signaling Pathway and Actin Cytoskeleton Organization in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLOS ONE*, v. 11, p. 1-17, 2015.

KANTHOU, C. & TOZER, G. M. The tumor vascular targeting agent combretastatin A–4-phosphate induces reorganization of the actin cytoskeleton and early membrane blebbing in human endothelial cells. *BLOOD*, v. 99, n. 6, p2060-2069, 2002.

KARP, G.- *Biologia celular e molecular*. 3ª Ed. São Paulo: Mamole, p. 333-396, 2005.

KATSAROS, N. & ANAGNOSTOPOULOU, A. Rhodium and its compounds as potential agents in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, n. 3, p.297-308, 2002.

KWON, M. J.; OH, E.; LEE, S.; ROH, M. R.; KIM, S. E.; LEE, Y.; CHOI, Y. L.; IN, Y. H.; PARK, T.; KOH, S. S.; SHIN, Y. K. Identification of novel reference genes using multiplatform expression data and their validation for quantitative gene expression analysis. **PLoS One**, v. 4, n. 7, p. e6162, 2009.

LAI, T. Y.; CHEN, I. J.; LIN, R. J.; LIAO, G. S.; YEO, H. L.; HO, C. L.; WU, J. C.; CHANG, N. C.; LEE, A. C.; YU, A. L. Fucosyltransferase 1 and 2 play pivotal roles in breast cancer cells. *Cell death discovery*, v. 5, n. 74, 2019.

LAUBY-SECRETAN, B.; SCOCCIANTI, C.; LOOMIS, D.; GROSSE, Y.; BIANCHINI, F.; STRAIF, K. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. *New England Journal of Medicine*, v. 375, n. 8, p. 794–798, 2016.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P. *Molecular Cell Biology*. Capítulo 18. Cell Motility and Shape I: Microfilaments. 4ª ed., Freeman, New York. Microfilaments. 4ª ed., Freeman, New York. **2000**.

MARTINS, E. A. C. & MACIEL FILHO, P. R. Mecanismos de expressão gênica em eucariotos. *Revista da Biologia*, v. 4, p.1-5, 2012.

MARTINS, L. A. C. & MACIEL FILHO, P. R. Padrão de metástase no câncer de mama triplo negativo. *Rev Bras Mastologia*, p. 8–14, 2017.

MILLER, R.P.; TADAGAVADI, R.K.; RAMESH, G.; REEVES, W.B. Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. **Toxins**. v. 2, p. 2490-2518, 2010.

MISHRA, P.K.; MISHRA, H.; EKIELSKI, A.; TALEGAONKAR, S.; VAIDYA, B. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. *Drug discovery today*, v. 22, n. 12, p. 1825-1834, 2017.

MOLLI, P. R.; LI, D. Q.; BRION, B.; RAYALA, S. K.; KUMAR, R. PAK Signaling in Oncogenesis. *Oncogene*, v. 28, n. 28, p. 2545–2555, 2009.

OLIVEIRA, R. B. & ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. *Química Nova*, v. 25, n. 6. P. 976-984, 2002.

PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 36, n. 13, p. 167–181, 2003.

PASETTO, L. M.; D'ANDREA, M. R.; BRANDES, A. A.; ROSSI, E.; MONFARDINI, S. The development of platinum compounds and their possible combination. *Crit Rev Oncol Hematol*, v. 60, n. 1, p. 59-75, 2006.

PEIXOTO, R. C. A. Avaliação toxicológica e antitumoral do tratamento sistêmico com citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas de maghemita em modelo experimental de câncer de mama. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular. Universidade de Brasília, 2012.

PLUMMER, M.; DE MARTEL, C.; VIGNAT, J.; FERLAY, J.; BRAY, F.; FRANCESCHI, S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **The Lancet Global Health**, v. 4, n. 9, p. e609–e616, 2016.

RANG, H.P., DALE, M. M.; RITTER, J.M.; MOORE, P. K. Farmacologia. Capítulo 5. Proliferação, Apoptose, Reparo e Regeneração Celular 7ª ed., Elsevier, Rio de Janeiro. **2011**.

RAO, J. Y. & LI, N. Microfilament Actin Remodeling as a Potential Target for Cancer Drug Development. **Current Cancer Drug Targets**, v. 4, n. 4, p. 345-354, 2004.

RAO, K.M. & COHEN, H.J. Actin cytoskeletal network in aging and cancer. **Mutation Research/ DNAging**, v. 256, n. 2-6, p. 139-148, 1991.

REIBSCHEID, E. M.; ZYNGIER, S.; MARIA, D. A.; MISTRONE, R. J.; SINISTERRA, R. D.; COUTO, L. G.; NAJJAR, R. Antitumor effects of rhodium (II) complexes on mice bearing Ehrlich tumors. Brazilian journal of medical and biological research. Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica, v. 27, n. 1, p. 91-94, 1994.

REITHMEIER, A.; PANIZZA, E.; KRUMPEL, M.; ORRE, L. M.; BRANCA, R.; LEHTIÖ, J.; EK-RYLANDER, B.; ANDERSSON, G. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP/ACP5) promotes metastasis-related properties via TGFβ2/TβR and CD44 in MDA-MB-231 breast cancer cells. *BMC cancer*, v. 17, n. 1, 2017.

RIDDLE, V. G. H. & PARDEE, A. B. Quiescent Cells but not Cycling Cells Exhibit Enhanced Actin Synthesis Before They Synthesize DNA. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY*, v. 103, p. 11-15, 1980.

ROBBINS & COTRAN. Bases Patológicas das Doenças. 8ª Ed. Elsevier Editora Ltda, Rio de Janeiro, **2005**.

ROCHA, M.; ARCANJO, R.; LOPES, C.; CARNEIRO, M.; SOUZA, A.; BÁO S. Modulation of fibronectin and laminin expression by Rhodium (II) citrate-coated maghemite nanoparticles in mice bearing breast tumor. *Scientific Reports*, v.7, p. 1-11, 2017. 7

SAFARI, J & ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: nanotechnology of health design A Review. *J. Saudi Chem. Soc.* v. 18, n. 2, p. 85-99, 2014.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, Oxford, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SANTOS, A. G. A. Estudo da reversão das alterações funcionais da actina após processo de oxidação/redução. Relatório de Estágio da Licenciatura em Bioquímica. Universidade do Algarve, 2007.

SCHIMITT, F & GOBBI, H. Mama. In: Brasileiro-filho, G. (Ed). *Bogliolo: Patologia*. Guanabara Koogan. p. 613-643, 2018.

SCHMIDT, A., & HALL, M. N. Signaling to the actin cytoskeleton. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 14, n. 1, p. 305–338, 1998.

SINGLETERY, S. E. Rating the risk factors for breast cancer. *Annals of surgery*, v. 237, n. 4, p. 474–82, 2003.

SIQUEIRA, J. L. N. SIQUEIRA. Alterações estruturais e metabólicas induzidas por citrato em células tumorais (MCF-7) e não tumorais (Fibroblastos) in vitro. Dissertação de mestrado em Biologia Animal. Universidade de Brasília, 2016.

SOULE, H. D.; MALONEY, T. M.; WOLMAN, S. R.; PETERSON JR., W. D.; BRENZ, R.; MCGRATH, C. M.; RUSSO, J.; PALEY, R. J.; JONES, R. F.; BROOKS, S. C. Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10. **Cancer Research**, v.50, n. 10, p. 6075-6086, 1990.

STEHN, J. R.; HAASS, N. K.; BONELLO, T.; DESOUZA, M.; KOTTYAN, G.; TREUTLEIN, H.; ZENG, J.; NASCIMENTO, P. R.B.B.; SEQUEIRA, V.B.; BUTLER, T. L.; ALLANSON, M.; FATH, T.; HILL, T. A. A Novel Class of Anticancer Compounds Targets the Actin Cytoskeleton in Tumor Cells. *Cancer Research*, v. 73, n. 16, p. 5169-5182, 2013.

TEIXEIRA, M. R.; QVIST, H.; BØHLER, P. J.; PANDIS, N.; HEIM, S. Cytogenetic analysis shows that carcinosarcomas of the breast are of monoclonal origin. *Genes, chromosomes & cancer*, v. 22, n. 2, p. 145–51, 1998.

TRICHET, L.; CAMPÀS, O; SYKES, C.; PLASTINO, J.; VASP governs actin dynamics by modulating filament anchoring. **Biophys Journal**, v. 92, n. 3, p.1081-9, 2007.

VALASTYAN, S. Roles of microRNAs and other non-coding RNAs in breast cancer metastasis. **Journal Mammary Gland Biol Neoplasia**, v 17, n.1, p.23-32, 2011.

WEBER, R.; BERTONI, A. P. S.; BESSESTIL, L. W.; BRASIL, B. M. A. A.; BRUM, I. S.; FURLANETTO, T. W. Validation of Reference Genes for Normalization Gene Expression in Reverse Transcription Quantitative PCR in Human Normal Thyroid and Goiter Tissue. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-5, 2014.

WEINBERG, R.A. The biology of cancer. Capítulo 2. The nature of cancer. Garland Science, 2^a ed. 2013

WHITE, S. R.; WILLIAMS, P.; WOJCIK, K. R.; SUN, S.; HIEMSTRA, P. S.; RABE, K. F.; DORSCHIED, D. R. Initiation of Apoptosis by Actin Cytoskeletal Derangement in Human Airway Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 24, p. 282–294, 2001.

WILMES, A.; BIELOW, C.; RANNINGER, C.; BELLWON, P.; ASCHAUER, L.; LIMONCIEL, A.; et al. Mechanism of cisplatin proximal tubule toxicity revealed by integrating transcriptomics, proteomics, metabolomics and biokinetics. **Toxicology in Vitro**, v.30, n.1, p.117–127, 2015.

WING, R. M.; PJURA, P.; DREW, H. R.; DICKERSON, R. E. The primary mode of binding of cisplatin to a B-DNA dodecamer: C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G. *The EMBO Journal*, v. 3, n. 5, p. 1201-1206, 1984.

WIRTH, T.; PARKER, N.; YLÄ-HERTTUALA, S. History of gene therapy. **Gene**, v. 525, n.2, p. 162–169, 2013.

WRAY, G. A.; MATTHEW, W. H.; EHAB, A.; BALHOFF, J. P.; PIZER, M.; MATTHEW V. R.; ROMANO, L. A. The evolution of transcriptional regulation in Eukaryotes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 9, p. 1377-1419, 2003.

XU, X. P.; ZENG, Q. H.; LU, G. Q.; YU, A. B. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n.3, p. 1027-1040, 2006.

YU, M.; AL-DALLAL, S.; AL-HAJ, L.; PANJWANI, S.; MCCARTNEY, A. S.; EDWARDS, S. M.; MANJUNATH, P.; WALKER, C.; AWGULEWITSCH, A.; HENTGES, K. E. Transcriptional regulation of the proto-oncogene Zfp521 by SPI1 (PU.1) and HOXC13. **Genesis**, v. 54, n. 10, p. 519–533, 2016.